

ГЛАВА 3

ИНФАРКТ МИОКАРДА. КАРДИОМИОПЛАСТИКА ИНФАРКТА МИОКАРДА МУЛЬТИПОТЕНТНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ

Направление использования стволовых клеток в кардиологии интенсивно разрабатывается в последние 5–7 лет благодаря тому, что в 1999 г. появились работы, в которых удалось получить КМЦ из мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (Makino et al., 1999). Были получены настолько удачные экспериментальные данные, что уже через 2–3 года данную клеточную технологию начали использовать в клинике. Было доказано, что МСК костного мозга человека обладают способностью стимулировать рост новых сосудов (ангиогенез) и усиливать питание кровью ишемизированных участков миокарда. Однако является ли этот эффект прямым действием МСК или опосредованным, через продукцию цитокинов и ростовых факторов — остается неясным. Продолжаются исследования по совершенствованию методов выделения и очистки МСК, получения из них прогенераторных клеток для кардиомиогенеза и ангиогенеза. Так как манипуляции на уровне ДНК стволовых клеток с целью встраивания генов, отвечающих за формирование КМЦ, запрещены ВОЗ для клинического применения, то в настоящее время акценты делаются на поиске чётких химических индукторов дифференцировки и получении "чистой" функционирующей ткани сердечной мышцы. Следует отметить, что фундаментальные работы в данной области медицины отстают от попыток использования клеточных технологий в практической кардиологии. Отсутствие четких патогенетических представлений о механизме

действия стволовых и вспомогательных клеток на миокард при его повреждении может привести не только к дискредитации самого метода, но и к возникновению серьезных осложнений вплоть до летального исхода. Мы считаем, что для того, чтобы лучше понять эту тему, надо рассмотреть общие вопросы, связанные с патогенезом острого инфаркта миокарда и возможными механизмами его регенерации.

3.1. ИНФАРКТ МИОКАРДА

Как уже отмечалось ранее, распространенность ишемической болезни сердца (ИБС) в последнее время приобрела характер эпидемии, что сделало ее основной проблемой здравоохранения многих экономически развитых стран мира, включая Россию (Бокерия, Гудков, 2001).

Инфаркт миокарда (ИМ) – это ограниченный некроз сердечной мышцы. Некрозы в большинстве случаев бывают коронарные или ишемические. Реже встречаются некрозы без коронарного повреждения: при стрессе, дисбалансе в эндокринной системе, действии цитостатиков, нарушениях электролитного баланса. В большинстве случаев ИМ рассматривают как результат ишемического некроза сердечной ткани из-за полной или частичной обтурации венечных артерий (Новиков, 2000). Наиболее частой причиной ИМ является гипертоническая болезнь, сочетающаяся с атеросклерозом коронарных сосудов и образованием тромба, реже – эмбола (Гоги, 1997; Жданов и др., 2002). При наличии атеросклеротических бляшек изменяется гемодинамика. Возникающие при этом гидродинамические нагрузки могут спровоцировать активацию свертывающей системы и локальную коагуляцию крови с образованием тромба. Разрыв или изъязвление атеросклеротической бляшки является достаточно частым явлением при прогрессировании атеросклеротического процесса в сосудах. Дестабилизация бляшки иногда может протекать без выраженных симптомов, либо, напротив, вызывать бурную клиническую картину с развитием острого коронарного спазма и даже смерти больного (Мазур, 1985; Зайчик, 2000). Почему так происходит, до конца остается не ясным. Часто отмечают несоответствие между патологоанатомическими данными и клиническими проявлениями заболевания, что затрудняет использование структурных изменений сосудов в качестве критерия оценки тяжести и прогноза у этой категории больных. Тем не менее, данная патология часто зависит не только от морфоло-

гических повреждений сердечной ткани, но и от степени вовлечения в этот процесс других сосудистых бассейнов и патогенетических механизмов. К ним можно отнести разную степень активации вазоактивных и тромбогенных агентов в ответ на повреждение бляшки и/или различия в индивидуальной реактивности на протромбогенный стимул. С другой стороны, повреждение бляшки не обязательно приводит к ИМ или острому коронарному спазму (ОКС), является частью механизма его прогрессирования и не обязательно связано с развитием ОКС (Жданов и др., 2002; Libby, 1995).

Ряд проведенных эпидемиологических исследований свидетельствует о наличии связи некоторых факторов свертывания с риском атеротромбоза, причем риск развития сердечно-сосудистых осложнений при повышении фибриногена плазмы, фактора свертывания VII (Ф VII) даже выше, чем при росте холестерина (Hultin, 1991). Среди других факторов свертывания следует выделить тканевой активатор плазминогена (ТАП), ингибитор активатора плазминогена первого типа (ИАП-1), фактор фон Виллебранда (ФВБ), которые играют важное значение в оценке риска развития рецидива инфаркта миокарда и его повторного возникновения (Jansson et al., 1991; Pedersen et al., 1993). Мелкоочаговый инфаркт миокарда составляет примерно 20% всех случаев инфаркта миокарда. Нередко (примерно в 30% случаев) мелкоочаговый инфаркт миокарда может трансформироваться в крупноочаговый, в связи с чем он может быть расценен как прединфарктное состояние. К мелкоочаговому инфаркту миокарда относят случаи возникновения у больных ишемической болезнью сердца мелких очагов некроза сердечной мышцы, характеризующиеся более легким по сравнению с крупноочаговым инфарктом миокарда клиническим течением. При мелкоочаговом инфаркте миокарда отсутствуют такие тяжелые осложнения, как аневризма сердца, разрыв сердца и др. Значительно реже возникает сердечная недостаточность, фибрилляция желудочков, асистолия тромбоэмболии и т.д.

Крупноочаговый инфаркт миокарда – острое заболевание, возникающее при развитии в сердечной мышце крупноочагового некроза вследствие окклюзии атеросклеротически измененных (одной или нескольких) венечных артерий тромбом или атеросклеротической бляшкой. То есть непосредственно причиной развития инфаркта миокарда является остро наступающее несоответствие коронарного кровообращения запросам миокарда вследствие окклюзии коронарной артерии или резкого уменьше-

ния притока крови по ней с последующей ишемией и некрозом. Крупноочаговый инфаркт миокарда в зависимости от локализации делят на передний, задний, боковой и различные комбинации между этими тремя локализациями. От этого зависит доступ, через который планируется осуществить клеточную терапию (Матусова, Боровков, 1999; Сорока, 2003).

ИМ, как тяжелая острая стрессовая реакция, сопровождается рядом изменений в работе нейрогуморальных систем – гипоталамико-надпочечниковой, опиоидной, симпатoadреналовой, ренин-ангиотензиновой, иммунной, калликреин-кининовой, отражающих состояние пластических, катаболических и анаболических процессов, протекающих в поврежденном миокарде (Чазов, 1976; Меерсон, 1977, 1993; Саркисов, 1977; Лишманов и др., 2003).

Однако на раннем этапе развития наибольшее значение в диагностике этого заболевания имеет гиперферментемия за счет аспарагиновой и аланиновой трансаминаз или аминотрансфераз: АСТ и АЛТ, лактатдегидрогеназы ЛДГ и ее изоферментов, креатинфосфокиназы, а также воспалительно-некротические процессы (Селье, 1961, 1977; Меерсон, 1991; Непомнящих, 1991; Матусова, Боровков, 1999; Елисеев, Сапронов, 2000).

Риск возникновения ИМ возрастает у лиц с повышенной свертываемостью крови. Кроме того, процесс тромбообразования может быть инициирован распадом атеросклеротической бляшки, развитием аневризмы аорты, поражением артерий инфекционными процессами. Эмболия коронарных сосудов может возникнуть при травмах крупных костей, например бедра, хирургических вмешательствах, сепсисе и др.

Мы уже отмечали, что инфаркт миокарда – достаточно распространенное заболевание сердечно-сосудистой системы – является самой частой причиной внезапной смерти. Проблема инфаркта до конца не решена, смертность от него продолжает увеличиваться. Сейчас все чаще инфаркт миокарда встречается в молодом возрасте. В возрасте от 35 до 50 лет инфаркт миокарда встречается в 50 раз чаще у мужчин, чем у женщин, что, по-видимому, обусловлено разницей в гормональном статусе (Хоффбауэр, 2002).

У 60–80% больных инфаркт миокарда развивается не внезапно, а имеет место прединфарктный (продромальный) синдром, который встречается в четырех вариантах:

- 1) стенокардия в первый раз, с быстрым течением – самый частый вариант;

- 2) стенокардия протекает спокойно, но вдруг переходит в нестабильную (возникает при других ситуациях, не стало полного снятия болей);
- 3) приступы острой коронарной недостаточности;
- 4) стенокардия Принцметала.

Инфаркт миокарда – очень тяжелое заболевание с частым летальным исходом, особенно часты осложнения в I и II периодах (Новиков, 2000; Сорока, 2003).

К ранним осложнениям, развивающимся в первые дни заболевания, относятся нарушения ритма и проводимости, кардиогенный шок, острая сердечная недостаточность, разрывы сердца. К поздним, возникающим через 2–3 недели от начала заболевания, относят постинфарктный синдром, хроническую недостаточность кровообращения. Такие осложнения, как аневризма сердца, тромбоэмболии, наблюдаются как в ранних, так и в поздних стадиях крупноочагового инфаркта миокарда (Добронраво, 2002).

Нарушение ритма и проводимости сердца – наиболее частые осложнения острого крупноочагового инфаркта миокарда. Иногда они могут быть первыми и единственными проявлениями заболевания, особенно при повторных инфарктах миокарда. Из нарушений ритма сердца особенно опасны желудочковая форма пароксизмальной тахикардии и политропные желудочковые экстрасистолы. Это может привести к фибрилляции желудочков (клиническая смерть) и к остановке сердца. Следует отметить, что фибрилляция желудочков может произойти и в прединфарктный период. Считается, что если на ЭКГ регистрируются политропные, групповые и ранние желудочковые экстрасистолы, то возникает опасность развития пароксизмальной желудочковой тахикардии и фибрилляции желудочков. Примерно у 25% больных регистрируется предсердная экстрасистолия, которая может быть предвестником пароксизмальной предсердной тахикардии, мерцания или трепетания предсердий. У некоторых больных наблюдается узловая предсердно-желудочковая тахикардия. Длительно существующая пароксизмальная тахикардия или тахикардития ведет к образованию сердечной недостаточности и аритмогенному шоку. При развитии крупноочагового инфаркта миокарда наблюдаются все виды нарушений проводимости. Значительную опасность для больных представляет предсердно-желудочковая блокада и особенно асистолия, которая может явиться непосредственной причиной смерти (Новиков, 2000; Хоффбауэр, 2002).

Кардиосклероз постинфарктный развивается при очаговом или диффузном разрастании соединительной ткани в сердечной мышце после гибели в ней мышечных волокон. Это уже исход инфаркта миокарда, связанный с формированием рубца. Иногда его еще называют ишемической кардиопатией. Основные проявления: нарушения ритма, проводимости, сократительной способности миокарда. Наиболее частая локализация – верхушка и передняя стенка. Как правило, при кардиосклерозе гибель мышечных волокон сопровождается их замещением соединительной тканью, что приводит к нарушению нормального кровотока в венечных артериях с развитием ишемии и некроза мышечных волокон.

После инфаркта миокарда формируется очаговый постинфарктный кардиосклероз. Чаще поражается левый желудочек. Обширность рубцовых полей зависит от величины зоны инфаркта миокарда.

Заместительный кардиосклероз наблюдается при стенозирующем атеросклерозе венечных артерий сердца при отсутствии очаговых некротических изменений в миокарде в силу постепенной, медленно развивающейся дистрофии, атрофии и гибели отдельных мышечных волокон в связи с гипоксией и нарушением метаболизма миокарда, сопровождающимися огрубением стромы.

Миокардиальный кардиосклероз – главный компонент желудочного ремоделирования после инфаркта миокарда. Кроме нарушений в гемодинамике постишемический фиброз может развиваться и в более отдаленных от первичного и вторичного некроза миокарда районах, вероятно, за счет изменений в экстрацеллюлярном матриксе и усиления продукции коллагена I, III и IV типов и β -ТФР, стимулирующих фибробласты (Новиков, 2000; Гороховский, 2001).

По А.Л. Мясникову, существует 3 варианта кардиосклероза:

- 1) ишемический, развивающийся медленно с диффузным поражением сердечной мышцы;
- 2) постинфарктный (постнекротический) на месте бывшего некроза вследствие перенесенного инфаркта миокарда;
- 3) переходный или смешанный, при котором на фоне медленно диффузного развития соединительной ткани периодически образуются крупные очаги после повторных инфарктов миокарда.

Сердечная недостаточность является результатом снижения

насосной функции сердца. Она может быть острой и хронической, левого (левожелудочковая) и правого (правожелудочковая) типов. При прогрессировании сердечной недостаточности левого типа к ней присоединяется правожелудочковая сердечная недостаточность, т.е. сердечная недостаточность становится тотальной.

Причиной сердечной недостаточности является атеросклеротическое или постинфарктное атеросклеротическое поражение сердечной мышцы, приводящее к нарушению сократительной способности миокарда. При доминировании поражения левых отделов сердца развивается сердечная недостаточность левого типа, при преимущественном поражении правых отделов сердца – сердечная недостаточность правого типа. При диффузном повреждении миокарда, как правило, развивается тотальная сердечная недостаточность с преимущественными симптомами правожелудочковой недостаточности, так как в первую очередь нарушается сократительная способность более слабых (правого по сравнению с левым) отделов сердца (Матусова, Боровков, 1999; Добронраво, 2002; Сороки, 2003).

3.2. МОДЕЛИРОВАНИЕ ОСТРОГО ИНФАРКТА МИОКАРДА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Экспериментальное моделирование острого инфаркта миокарда в сочетании с современными и классическими методами исследования незаменимо в решении проблемы для понимания патогенетических механизмов развития данного заболевания у людей и разработки новых способов его лечения. После анализа многочисленных способов моделирования ОИМ (фармакологические, воздействие низких или высоких температур, ультразвук, лазера, КВЧ, токсинов, стресса и т.п.), мы остановились на общепринятой хорошо воспроизводимой технике, которая достаточно просто и полно имитирует ситуацию, возникающую при данной патологии, путем перевязки коронарной артерии – коронароокклюзии (Непомнящих, 1981, 1991).

Нами проведено исследование динамики тканевых и функциональных свойств миокарда у крыс (обоих полов массой 200–240 г породы "Вистар") и мышей (линии СВА, С57В1/6, F₁(СВАх С57В1/6)) после проведения коронароокклюзии в нижней трети передней левожелудочковой коронарной артерии (рис. 3.1).

Через 24 часа после моделирования ОИМ в зоне ишемии наблюдаются все признаки, характерные для стадии альтерации



Рис. 3.1. Этап наложения лигатуры в области нижней трети передней левожелудочковой коронарной артерии у мыши линии C57Bl/6

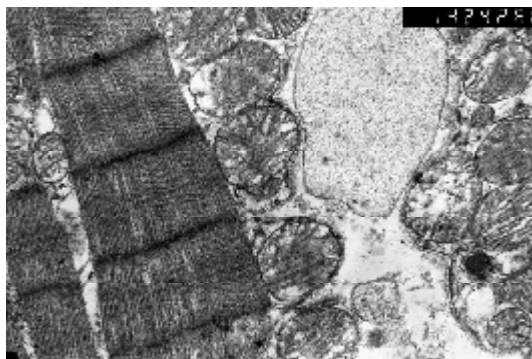


Рис. 3.2. Фрагмент кардиомиоцита крысы на 1-е сутки после коронароокклюзии. На препарате хорошо видно начало набухания митохондрий, нарушение строения крипты, деформация мышечных волокон, изменения в сократительном аппарате и появление вакуоль. Ув. 14200х

при наблюдаемой воспалительной реакции, сопровождающиеся отеком и набуханием КМЦ, появлением дистрофических и дегенеративных признаков. КМЦ начинают терять свою поперечную исчерченность (рис.3.2). Четких границ зоны некроза в этот период выявить не удалось (рис. 3.3). В интерстициальной соединительной ткани и между мышечными волокнами появляются

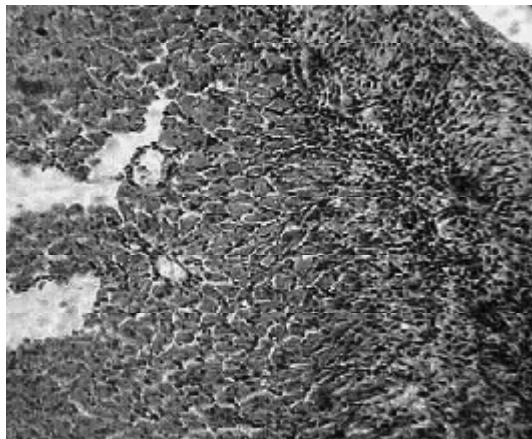


Рис. 3.3. Миокард крысы на 1-е сутки после коронароокклюзии. Зона инфаркта не имеет четких границ и инфильтрирована лейкоцитами (правая часть препарата). Мышечные волокна в периинфарктной зоне набухшие. В сосудах видно пристеночное стояние лейкоцитов. Четких границ между зонами некроза не наблюдается. Ув. 200х, окраска гематоксилином

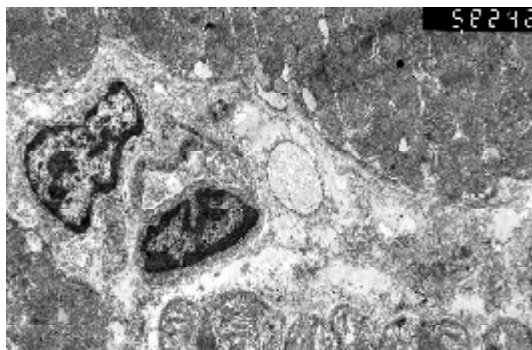


Рис. 3.4. Миокард крысы на 2-е сутки после коронароокклюзии. В интерстициальном слое между кардиомиоцитами видны мигрирующие лейкоциты, фагоцитирующие клеточные обломки. В нижней части представлен КМЦ с явными признаками дегенерации — набухание и деструкция крипт в митохондриях, изменение структур мышечных волокон. Ув. 5800х

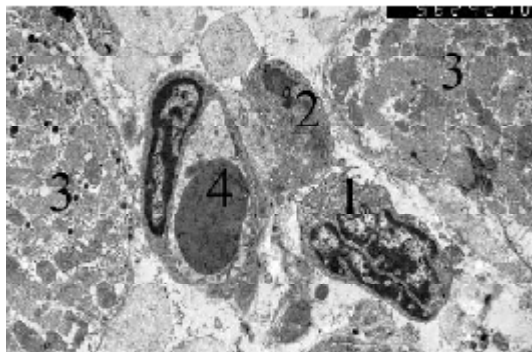


Рис. 3.5. Миокард крысы на 3-е сутки после коронароокклюзии. Наблюдается выход нейтрофила (1), лимфоцита (2) в интерстициальный слой между кардиомиоцитами (3) из сосуда (4). Нейтрофилы фагоцитируют клеточные обломки. Ув. 5800х

клеточные инфильтраты, содержащие нейтрофилы, моноциты и лимфоциты (рис. 3.4, 3.5). Выраженность некротических нарушений во многом зависела от степени развития изменений в гемодинамике. В тех участках, где они были более выражены, там наблюдался и более обширный некроз мышечных волокон. Нарушения со стороны сосудов и микроциркуляции сопровождались появлением отека, стаза клеток крови, кровоизлияний и лейкоцитарной инфильтрации. Все эти нарушения в миокарде соответствуют тем данным, которые наблюдали при аналогичных ситуациях и другие авторы (Саркисов, 1970; 1977; 1987; Чазов и др., 1976; Непомнящих, 1991, 1996)

К 3–7-м суткам можно более определенно судить о площади инфаркта, т.к. начинают появляться четкие границы некроза. В периинфарктной зоне все еще наблюдается скопления лейкоцитов, хотя их количество начинает снижаться (рис. 3.5, 3.6). Капилляры вокруг поврежденных КМЦ часто остаются тромбированными или подвергаются разрушению. Мышечные клетки начинают подвергаться резорбции, очевидно, за счет фагоцитоза и выделения лизосомальных ферментов (рис. 3.7) (Маянский, Маянский, 1989). В патологический процесс включаются ткани, расположенные в верхней и средней стенках левого желудочка. В миокарде появляются недифференцированные мезенхимальные клетки со стромальным фенотипом (рис. 3.8). Следует подчеркнуть, что пролиферативная реакция со стороны соеди-

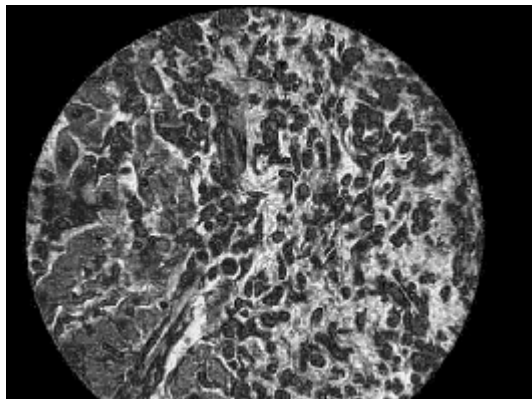


Рис. 3.6. Миокард крысы на 3-и сутки после коронароокклюзии. Кардиомиоциты набухшие, отечные, часть из них подвергнута деструкции. Между мышечными волокнами определяются многочисленные лейкоциты. Ув. 400х, окраска гематоксилином

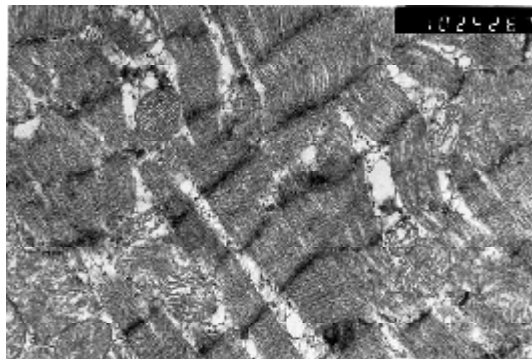


Рис. 3.7. Фрагмент кардиомиоцита в перинфарктной зоне миокарде крысы на 7-е сутки после коронароокклюзии. Видны нарушения в строении миофибрилл, они деформированы, митохондрии деградируют. Ув. 10240х

нительной ткани возникает именно в тот период, когда вместо гранулоцитов в миокарде начинают преобладать мононуклеарные клетки (моноциты, макрофаги, лимфоциты), что наблюдали и другие авторы (Непомнящих, 1981, 1991).

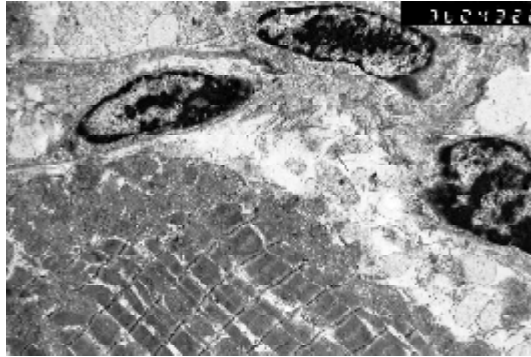


Рис. 3.8. Электронная микроскопия миокарда мыши линии СВА в околоинфарктной зоне на 7-е сутки после коронароокклюзии. В нижней части расположен кардиомиоцит с умеренными признаками дегенерации, над которыми обнаруживаются три фибробласта, начинающих продуцировать коллагеновые волокна. Ув. 3600х

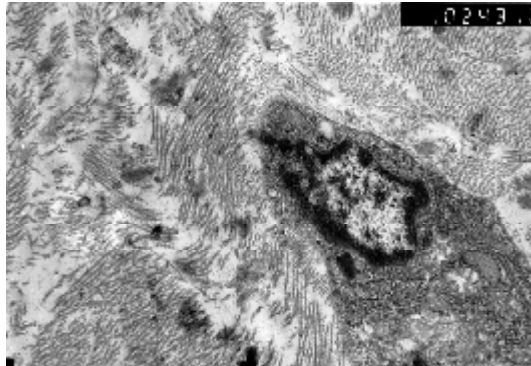


Рис. 3.9. Электронная микроскопия миокарда крысы в зоне развития кардиосклероза на 12-е сутки после коронароокклюзии. В центре расположен фибробласт, секретирующий коллагеновые волокна. Ув. 10200х

На 10–14-е сутки наблюдения в периинфарктной зоне обнаруживаются гетерогенные по своему составу КМЦ. Часть из них несет признаки атрофии – внутриклеточного некроза и лизиса органелл (рис. 3.7). Фибробласты активно продуцируют колла-

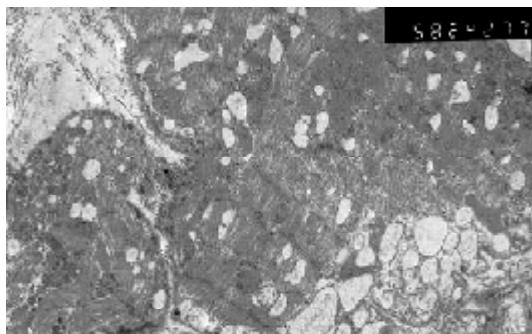


Рис. 3.10. Электронная микроскопия. Пограничная зона между зоной инфаркта и кардиомиоцитами на 14-е сутки после моделирования острого инфаркта миокарда. Видны многочисленные фрагменты дегенерирующих КМЦ. Ув. 5800х

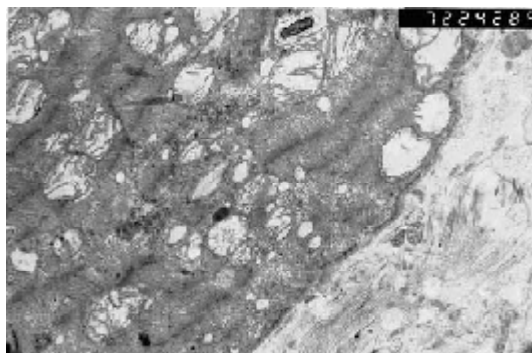
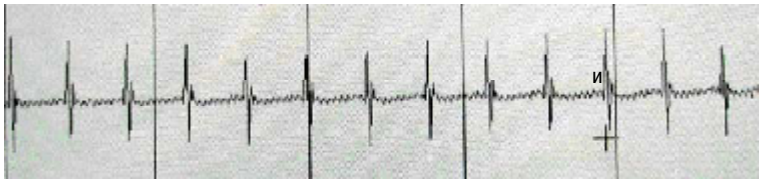


Рис. 3.11. Электронная микроскопия пограничного участка между зоной кардиосклероза (правая часть препарата) и миокардом (левая часть препарата) у крыс на 18-е сутки после коронароокклюзии. Часть КМЦ несут признаки атрофии – внутриклеточного некроза, деструкции и лизиса митохондрий. Ув. 7200х

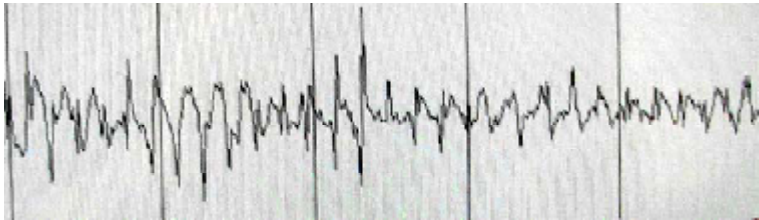
ген (рис. 3.9, 3.10). Между зоной некроза и мышечной тканью прослеживается достаточно четкая граница (рис. 3.11).

На 30-е сутки в миокарде подопытных животных наблюдается развитие рубцовой ткани, занимающей до 60–70% от площади левого желудочка, сочетающейся с гипертрофией сердца на 230–240% от исходного уровня.

Исследование функциональных свойств миокарда показало, что изменения со стороны ЭКГ выявляются только у части животных в первые сутки опыта в виде нарушений ритма, появления экстрасистол, изменений в зубце QRS (рис. 3.12).



а



б

Рис. 3.12. Электрокардиограмма сердца здоровых (а) и после коронароокклюзии (1-е сутки) (б) крыс. На рис. (б) видно развитие нарушения ритма и мерцательной аритмии сердца

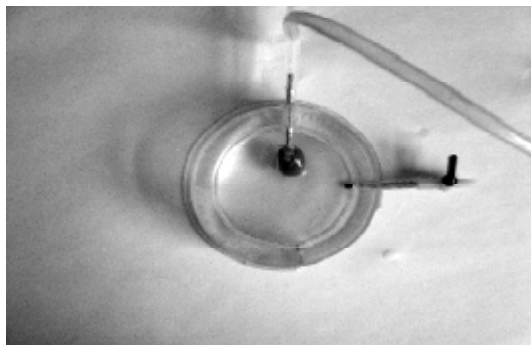


Рис. 3.13. На фотографии представлен фрагмент установки для изучения сократительной способности изолированного сердца

Спустя 2 недели мы не обнаружили каких-либо отклонений в ЭКГ по сравнению со здоровыми животными.

Измерение порога фибрилляции желудочков показало, что он снижается на 30–40% по сравнению с контролем.

Опыты на изолированном сердце показали, что у животных с кардиосклерозом и гипертрофией миокарда отмечается снижение сократительной функции миокарда (рис. 3.13).

Таким образом, проведенные исследования показали, что при моделировании острого инфаркта миокарда методом коронаро-окклюзии можно воспроизвести картину ИФ, наблюдаемого у человека, с развитием характерных для данного заболевания морфофункциональных изменений.

Для того чтобы перейти к следующему этапу исследований, необходимо рассмотреть вопросы, связанные с особенностями развития репаративных процессов в сердечной ткани при остром инфаркте миокарда.

3.3. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ КАРДИОМИОПЛАСТИКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Концепция регенеративной медицины, базирующаяся на использовании собственных стволовых клеток для восстановления поврежденных тканей, сосудов и органов, в последние годы привлекает внимание большого количества кардиологов. Данный метод является альтернативой многим известным методам лечения заболеваний сердца (медикаментозных, хирургических, вплоть до пересадки сердца). Однако многие критерии проведения клеточной терапии, ее показания и противопоказания при конкретной патологии все еще остаются на уровне интуитивных догадок, без серьезных экспериментальных и теоретических обоснований.

Следует отметить, что возможности клеточных технологий в кардиологии остаются малоизученными и нереализованными. Одной из причин этого является отсутствие ясности в представлениях о регенераторных возможностях миокарда (Потапов и др., 2001).

Общепризнанной догмой считается, что во взрослом организме животных и человека КМЦ утрачивают способность к регенерации (см. главу 1). В отличие от скелетной мускулатуры и гладкомышечных волокон, миокард не содержит стволовых или сателлитных клеток, способных к пролиферации и замещению образовавшегося дефекта. Вместо мышечной ткани при инфарк-

те миокарда активируется стромогенез и формируется рубец (Новиков, 2000; Kajstura et al., 1998). Иными словами, если возникает повреждение сердечной мышцы, то оно необратимо приводит к развитию кардиосклероза, а при обширном инфаркте миокарда – к нарушению его функциональных и биомеханических свойств, компенсаторной гипертрофии, что часто заканчивается развитием СН в течение нескольких месяцев или лет (Болл и др., 1995; Бокерия, Гудкова, 2001).

Следует подчеркнуть, что фибробласты, принимающие участие в образовании рубца, являются производными МСК. Почему эти клетки, обладающие чрезвычайно широкими пластическими свойствами, не превращаются в кардиомиоциты – остается неясным, т.к. явных ограничений для их превращения в мышечные и сосудистые элементы нет. Можно предположить, как минимум, два варианта развития событий. Согласно одному из них, клетки-предшественницы фибробластов и эндотелия необратимо встали на путь терминальной дифференцировки и не могут образовывать иные типы клеток, а МСК не попадают в поврежденный миокард, т.к. не происходит их мобилизация из депо, в частности, костного мозга. Согласно другому сценарию, в поврежденном миокарде не формируются соответствующие условия для реализации пластических свойств МСК в направлении кардиомиогенеза.

Мнения о том, что в сердечной ткани отсутствуют клетки, способные к кардиомиогенезу, в последние годы пересматривается. Данные последних лет свидетельствуют в пользу того, что в сердечной ткани сохраняются клеточные элементы, способные к пролиферации и образованию новых КМЦ. Так, в работах коллектива авторов, представленных Л.В. Полежаевым (1965, 1995), было показано, что в некротическом миокарде при введении биомодуляторов и ингибиторов его рубцевания на короткий срок появляются клетки, которые можно морфологически идентифицировать как слабо дифференцированные миобласты. Кроме того, под влиянием указанной терапии уменьшались размеры новообразованной рубцовой ткани по сравнению с контролем. Однако происхождение "миобластоподобных клеток" осталось невыясненным: являлись ли они КМЦ или относились к другим мышечным элементам, например гладкомышечным клеткам, предшественники которых обнаруживаются в предсердиях. Позднее Л.В. Полежаевым (2000) было показано, что миокард кроликов обладает способностью к восстановлению своей структуры под действием гидролизата сердечной мышцы, гомогенатов скелет-

ных мышц и других биопрепаратов. По-видимому, в данном случае мы имеем пример, когда индукция морфогенеза происходила под действием иРНК, факторов роста мышечной ткани типа MyoD и т.п., которые способны вызывать мышечную экспрессию, в том числе и в фибробластах (Tam et al., 1995; Murry et al., 1996). Так, Salvatori et al. (1995) показали, что если фибробласты линии 10T1/2 культивировать совместно с миоцитами линии C2C12 или скелетными миоцитами, то они дифференцируются в мышечные трубочки (1–10% от всей популяции).

По мнению П.П. Румянцева (1982), КМЦ не могут пролиферировать, так как строго ориентированные агрегаты сократительных белков в КМЦ и наличие вставочных дисков создают препятствия для цитокинеза при митозе.

Именно поэтому для внедрения новых КМЦ в структуру миокарда необходимо индуцировать обратимую деструкцию (разборку) его миофибрилл, т.е. вызывать умеренную дедифференцировку сердечной ткани. По-видимому, из-за отсутствия условий для реализации этих процессов, в частности при ИМ, митотическое деление в КМЦ обычно не идет дальше кариокинеза, и регенерация заканчивается формированием полиплоидных КМЦ (Бродский, 1995). Кроме того, в ткани миокарда взрослого организма в обычных условиях не найдены структуры, подобные МСК, сателлитным клеткам скелетных мышц, миоцитами или незрелые кардиомиоциты, сохраняющие способность к делению. Обнаруженные в желудочках крыс популяции КМЦ (около 10%), обладающие способностью накапливать ^3H -тимидин, очевидно, можно отнести к клеткам, остановившимся на стадии кариорексиса с формированием полиплоидных (двуядерных) клеток. Они, по-видимому, играют важную роль в адаптивной перестройке миокарда при его гипертрофии. Довольно редко можно наблюдать митозы КМЦ в перинфарктной зоне, которые, как правило, заканчиваются цитокинезом. Они, как, впрочем, и циркулирующие МСК, не способны к репарации в полном объеме, восстановлению миокарда и инволюции рубца (Румянцев, 1982; Гуриев, 1989). Согласно мнению Д.С. Саркисова (1979), уменьшение размеров рубца, показанное в опытах Л.В. Полежаева (1965), связано не с репаративной регенерацией, а с предотвращением вторичных волн некроза в миокарде. С позиций разработанной им теории внутриклеточной регенерации, сердце относится к органам, в которых при повреждении преобладают не пролиферативные процессы в паренхиме, а фибропластические реакции стромы, которые почти необратимы. Иными словами, следует счи-

тать, что дефицит функции КМЦ в миокарде возмещается не за счет их пролиферации, а посредством внутриклеточных гиперпластических реакций (Саркисов, 1979).

3.3.1. Каскадоподобный механизм адаптации и репарации сердечной ткани при инфаркте миокарда

Ранее нами было показано, что при стрессе, травмах, повреждении кроветворной и опорно-двигательной систем, в организме включается универсальный механизм адаптации, развивающийся по каскадоподобию механизму (КПМА) (Дыгай, Шахов, 1989; Шахов, 1996; 1997; Карлов, Шахов, 2001). Анализ литературных и экспериментальных данных позволяет предположить, что и при инфаркте миокарда имеет место КПМА. Рассмотрим некоторые ключевые понятия КПМА.

КПМА – выработанный в процессе эволюции механизм взаимозависимой последовательной активации ключевых гомеостатических систем (нейроэндокринной, иммунной, ретикулоэндотелиальной (РЭС), кроветворной, мезенхимальной и др. систем), направленный на поддержание и восстановление постоянства внутренней среды организма в ответ на действие экстремальных, в том числе повреждающих, факторов. Концепция КПМА базируется на учении Г. Селье об общем адаптационном синдроме (1961, 1977), а также работах Ф.З. Меерсона (19), П.К. Анохина (1975), П.Д. Саркисова (1977), К.В. Судакова (1997) и других авторов. Физиологической основой КПМА являются биоритмы (циркадные, суточные и т.п.). Каскадоподобный характер данного механизма заключается в том, что возбуждение от одной системы к другой передается последовательно по типу эстафеты с помощью специфических и неспецифических мессенджеров. Следует отметить, что КПМА может реализовываться по иерархическому типу. Например, стресс, анемия или повреждение тканей вызывают активацию нервной, затем эндокринной, Т-лимфоцитарной, РЭС, кроветворной систем. В результате этого происходит активация стромальных элементов, ответственных за формирование гемопоэзиндуцирующего микроокружения, усиливающая процессы пролиферации и деления стволовых клеток. В конечном итоге развиваются гиперплазия кроветворения, увеличение количества эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитов, циркулирующих СК в периферической крови, и повышение устойчивости организма к гипоксии, воспалению и разнообразным повреждениям (Дыгай, Шахов, 1989; Гольдберг и др., Дыгай и др., Шахов, 1991, 1996). При этом не исключается, что этот процесс

может протекать и по сетевому принципу, т.е. одновременному развитию по нескольким направлениям. В частности, параллельно вышеуказанному гипофизарно-гипоталамо-адреналовому пути стимуляция кроветворения может осуществляться с помощью симпатических, парасимпатических и адренергических механизмов, что позволяет более гибко реагировать на изменяющиеся условия жизнедеятельности. В любом случае директивная, идущая от вышестоящих отделов КПМА к нижестоящим информация (сигнал) имеет адресный характер.

Включение КПМА зависит от силы, характера и частоты действия экстремального фактора и исходного состояния как всего организма, так и звеньев самого адаптационного механизма.

Для каждого уровня КПМА существует свой специфический регулятор. Так, для передней доли гипофиза кортиколиберина в передней доле гипофиза вырабатывается АКТГ. АКТГ, в свою очередь, стимулирует выработку глюкокортикоидов в надпочечниках. Глюкокортикоиды вызывают миграцию Т-лимфоцитов из тимуса. Т-клетки вырабатывают колониестимулирующие факторы, ИЛ-3 и другие факторы, активирующие миелогенез, стромогенез и клетки РЭС. Каждый уровень КПМА работает по принципу функциональной системы (Анохин, 1975), которая осуществляет восприятие и переработку идущей к ней специфической и неспецифической информации, с последующей интегральной оценкой и передачей ее к следующему звену КПМА. Блокада любого уровня КПМА при прохождении через него специфического сигнала приводит к супрессии, деформации или полной отмене адекватного реагирования. Так, удаление надпочечников, тимуса или блокада РЭС или Т-клеток с помощью антител полностью отменяет стимуляцию мезенхимальных стволовых клеток, отвечающих за перенос гемопоэзиндуцирующего микроокружения и КОЕф (см. главу 2; Шахов, 1991). Коррекция вышеуказанных повреждений, в частности за счет введения тимоцитов, восстанавливает вышеуказанные повреждения (Шахов, 1991, 1996). Специфические сигналы определяют общий вектор развития КПМА.

Неспецифические регуляторы переводят отдельные звенья КПМА в режим ожидания (включения/выключения) и создают общую его гармонику. Специфические регуляторы могут стать неспецифическими, если будут действовать не адресно, т.е. не на свою специфическую мишень. Таковым становится АКТГ, если действует не на Т-клетки, а на фагоцитирующие мононуклеары (Маянский, 1981). Вместе специфические и неспецифические

регуляторные механизмы создают единую голографическую картину работы КПМА с учетом реального времени и перспективы его развития, позволяющей объединить многочисленные гомеостатические реакции в единую функциональную гиперсистему. Если инициация КПМА обычно не превышает одни сутки, то его развитие и реализация занимает от 2 недель (гемопоз) до нескольких месяцев (костная ткань) (Шахов, 1997; Карлов, Шахов, 2001).

Анализ имеющейся информации и собственных данных позволяет предположить, что развитие острого инфаркта миокарда также происходит по типу реализации КПМА. Так, после ишемии, некроза миокарда, сопровождающегося выраженным болевым синдромом, происходит активация нервной, гипоталамической, иммунной и ретикулоэндотелиальной систем (Меерсон, 1977; Судаков, 1997). В поврежденную ткань устремляются нейтрофилы, моноциты и лимфоциты (Новиков, 2000) (рис. 3.3–3.5, 3.14). В результате в миокарде изменяется микроокружение. Очевидно, именно в этот период происходит выработка разнообразных ростовых и дифференцирующих факторов, готовых включить механизмы локальной регенерации в поврежденном миокарде. Однако в силу того, что в сердечной ткани нет КМЦ или МСК, способных дифференцироваться в кардиомиоциты, то вме-

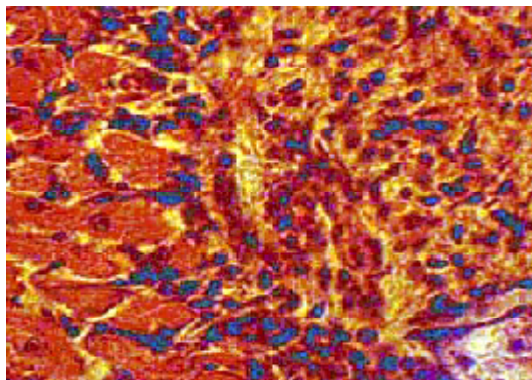


Рис. 3.14. Микрофотография среза перинфарктной зоны миокарда крысы Вистар на 3-и сутки после коронароокклюзии. Между разрыхленными волокнами КМЦ видны многочисленные моноциты, лимфоциты и нейтрофилы, образующие небольшие скопления. Гематоксилин, ув. 400х

сто кардиомиогенеза происходит активация стромальных и сосудистых клеток, которые присутствуют в интерстициальном слое между мышечными волокнами и около сосудов. Попадают ли циркулирующие МСК в миокард, и, если такой факт имеет место, то почему они не дифференцируются в КМЦ? Если предположить, что МСК все-таки мигрируют в сердце, то, возможно, они по каким-то причинам не могут реализовать свою репаративную миссию. Может быть, это происходит из-за того, что их количество недостаточно для включения механизмов регенерации миокарда. С другой стороны, нельзя исключить и того, что они не подготовлены к дифференцировке в направлении миогенеза. Кроме того, нельзя исключить, что микроокружение и биомеханика поврежденного миокарда не создают необходимых условий для развития МСК в кардиомиоциты. Однако последний довод опровергается в опытах, когда МСК трансплантируют в сердечную ткань, о чем будет идти речь ниже.

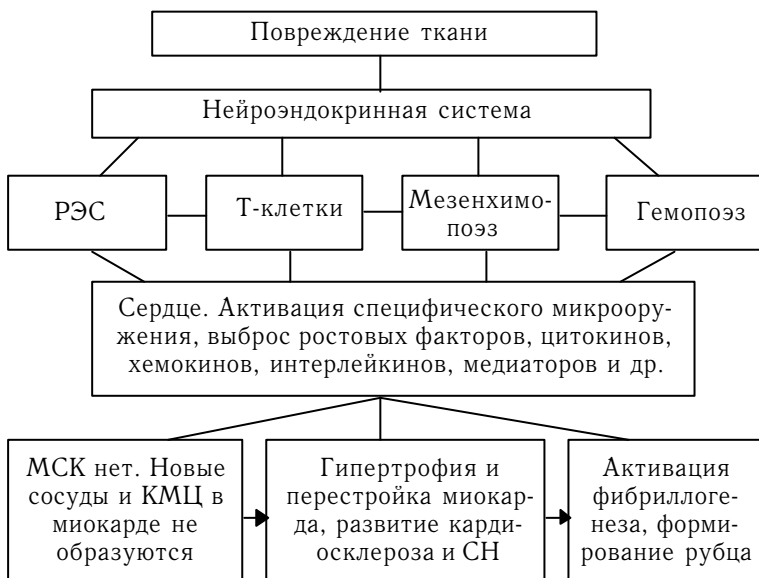


Рис. 3.15. Схема развития КПМА при инфаркте миокарда: РЭС – ретикулоэндотелиальная система, МСК – мезенхимальные стволовые клетки, СН – сердечная недостаточность

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что при инфаркте миокарда может иметь место развитие КПМА (рис. 3.15). В то же время, в силу особенностей формирования сердца, терминальной дифференцировки КМЦ и отсутствия в них соответствующих стволовых клеток, вместо включения механизмов репаративной регенерации включается регенерация на уровне гипертрофии миокарда и возникновения полиплоидных, с повышенной функциональной активностью клеток. Параллельно образующийся дефект необратимо замещается рубцовой тканью, что может привести к развитию разнообразных осложнений, включая и сердечную недостаточность.

Теоретически изменить ход необратимых изменений в сердечной ткани при инфаркте миокарда можно, если в каскадоподобный механизм адаптации включить экзогенные МСК, обладающие миогенным и ангиогенным потенциалом (рис. 3.16). Тог-

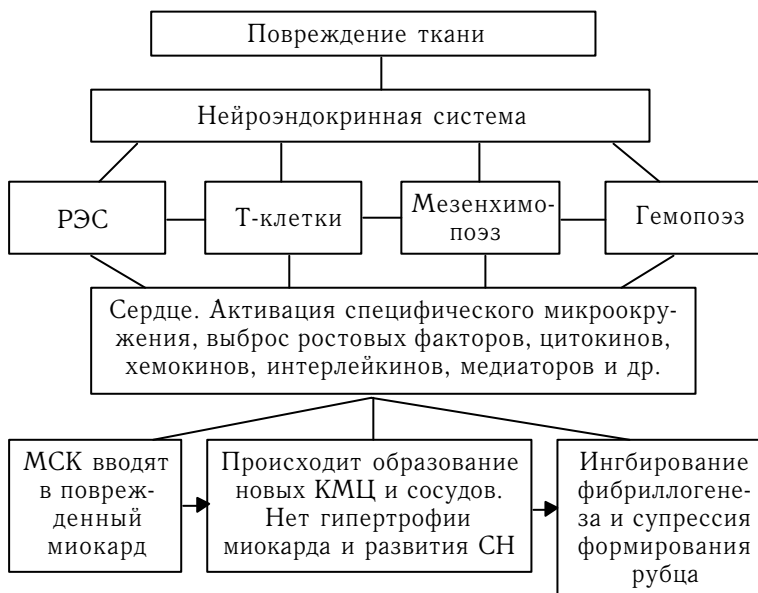


Рис. 3.16. Принципиальная схема коррекции развития кардиосклероза и сердечной недостаточности с использованием КПМА при инфаркте миокарда: РЭС – ретикулоэндотелиальная система, МСК – мезенхимальные стволовые клетки, СН – сердечная недостаточность

да вместо кардиосклероза, образования рубцов и развития сердечной недостаточности будет включен механизм репаративной регенерации с восстановлением поврежденного миокарда. Во многом подобная идея высказывалась неоднократно в прошлом столетии. Этот вопрос достаточно неплохо освещен в обзоре И.В. Потапова с соавт. (2001). Так, было отмечено, что для активного участия пересаженных клеток в систоле левого желудочка (ЛЖ) должно соблюдаться несколько условий:

- клетки должны обладать способностью дифференцироваться в кардиомиоциты, содержать сократительные структуры;
- между клетками должны присутствовать вставочные диски с щелевыми контактами для проведения потенциалов возбуждения к пересаженным клеткам от КМЦ хозяина;
- должна отсутствовать реакция отторжения;
- необходимо свести до минимума ишемические повреждения, шок, некроз и апоптоз пересаженных клеток;
- пересаженные клетки должны способствовать репарации поврежденного участка (замещение соединительной ткани и формирование полноценной биомеханической архитектоники сердечной ткани).

Большинству вышеперечисленных критериев соответствуют мезенхимальные стволовые клетки. Однако ввиду того, что процесс превращения МСК костного мозга в кардиомиоциты и сосудистые клетки был открыт только в 1999–2000 гг., многие вопросы, связанные с возможностью применения данных клеток в кардиологической практике, остаются открытыми. Так, S. Maki-но с соавт. (1999) получили кардиомиогенную клеточную линию из мышинных клеток стромы костного мозга, в которых после обработки 5-азациитидином *in vitro* были индуцированы процессы дифференцировки в КМЦ. Эффективность обработки составила около 30%. Полученные клетки экспрессировали множество специфических для КМЦ генов, имели фенотип фетальных желудочковых КМЦ. Дифференцированные таким образом КМЦ были связаны между собой вставочными дисками, формировали мышечные трубочки, спонтанно сокращались, имели КМЦ-подобную ультраструктуру, включая типичные саркомеры, центрально расположенное ядро, множественные гранулы гликогена и митохондрии. Мышечные трубочки генерировали потенциалы действия, напоминающие таковые у желудочковых КМЦ. Во многом аналогичные данные были получены S. Tomita и др. (1999), которые вызывали повреждение миокарда с помощью жидкого

азота. Кроме того, было установлено, что МСК наряду с образованием КМЦ формировали эндотелиальные и гладкомышечные клетки, что улучшало функцию сердца (Шумаков и др., 2003; Davani et al., 2003). Интересно, что если МСК из костного мозга взрослого человека или фетальной печени ввести в плод овцы, то большинство донорских клеток обнаруживаются в сегментах волокон Пуркинье. Их уровень достигает 43,2%, в то время как среди кардиомиоцитов доля меченных клеток не превышала 0,01%. Это свидетельствует о том, что МСК принимают участие в морфогенезе не только мышечного компонента сердечной ткани, но и ее проводящей системы (Airey et al., 2004).

Не имея стройной теории механизма ремоделирующего действия трансплантированных клеток, многие авторы сходятся в том, что в результате проведенной клеточной кардиомиопластики можно достичь следующих эффектов:

- 1) предупреждения развития постинфарктной аневризмы;
- 2) ускорения процессов регенерации миокарда;
- 3) предотвращения распространения очага некроза и рубцовой ткани;
- 4) улучшения диастолических свойств миокарда и нагнетательной функции сердца;
- 5) стимуляции процессов ангиогенеза и оксигенации миокарда.

T. Wang et al. (2000) выдвинули гипотезу, что микроокружение в миокарде создает определенные условия и сигналы для кардиомиогенной дифференцировки МСК. В их исследованиях крысиные МСК после культивирования и удаления большинства гемопоэтических стволовых клеток были пересажены в миокард и дифференцировались в КМЦ, образовывали щелевые контакты. С другой стороны, в опытах на крысах с использованием меченных DAPI МСК и мононуклеаров костного мозга было показано, что стволовые, но не мононуклеарные элементы встраиваются в сердечную ткань после коронароокклюзии. При этом через 2 месяца они образовывали компактные клеточные агрегаты в миокарде, которые не были тесно связаны с окружающими клетками синтиция. Интересно, что в обычных условиях МСК утрачивали способность включаться в процессы клеточной репарации миокарда (Zu et al., 2004), что косвенно свидетельствует об индукции кардиомиогенеза в сердечной ткани только при экстремальных состояниях. МСК взаимодействуют с КМЦ в сердце через C43 и C40 области межклеточных контактов с образованием симметричных гомотипичных и ассиметричных (гетероти-

пических, гетеромерных) каналов с переходной проводимостью. Клеточная трансплантация фетальных КМЦ, меченных геном зеленой флюоресценции, в сердце показала, что они способны формировать функциональный синтиций, встраиваясь в поврежденный миокард животных (Rubart et al., 2003). Однако данные о том, что МСК обладают такой способностью, крайне противоречивы, и часто нельзя сказать, является ли улучшение функции работы сердца результатом процессов образования и интеграции новых КМЦ, или они развиваются в результате стимуляции ангиогенеза и гипертрофии миокарда.

Наряду с кроветворными и мезенхимальными СК в костном мозге присутствуют и другие элементы, способные играть активную роль в ремоделировании инфаркта миокарда, в частности, речь идет о клетках-предшественницах эндотелиального ряда. Они способны при попадании в поврежденный миокард формировать новые сосуды и капилляры, улучшая оксигенацию ткани. В связи этим рассматривается вопрос о целесообразности применения гетерогенной популяции клеток костного мозга, способной патогенетически воздействовать на различные механизмы репарации КМЦ и влияния на рубцовую ткань. Кроме того, МСК и вспомогательные клетки (типа эндотелия, макрофагов, лимфоцитов, стромальных механоцитов) способны секретировать многочисленные цитокины, ростовые факторы и создавать необхо-

Таблица 3.1

**Достоинства и недостатки практического использования
ЭСК и МСК в кардиологии**

ЭСК	МСК костного мозга
Плюрипотентность	Мультипотентность
Высокая способность к репликации, самоподдержанию и дифференцировке	Умеренная способность к репликации, самоподдержанию и дифференцировке
Трудности в получении ЭСК	Нет трудностей в получении МСК
Высокий риск возникновения тератокарциномы	Злокачественная трансформация клеток не выявлена
Умеренные антигенные свойства, требует применения иммуносупрессивных средств	Высокая биосовместимость, иммуносупрессивные препараты не нужны
Аритмогенный потенциал	Аритмогенный потенциал не выявлен
Этические проблемы	Этических проблем нет
Возможность изменения пути дифференцировки в многочисленных направлениях	Возможность изменения пути дифференцировки по 5–6 направлениям

димое микроокружение для прогениторных клеток (Orlic et al., 2001). По сравнению с ЭСК мезенхимальные стволовые клетки имеют ряд преимуществ, некоторые из них приведены в табл. 3.1.

Как уже говорилось выше, многие недостатки и проблемы при использовании МСК для клеточной терапии связаны с тем, что ещё недостаточно изучены факторы их дифференцировки *in vitro*, их трудно получить в достаточном количестве для развития клинического эффекта после трансплантации. С возрастом их количество и терапевтический потенциал уменьшаются. Кроме того, МСК при трансплантации в организм показывают достаточно низкую приживляемость, что снижает их эффективность в системе *in vivo* (Mangi et al., 2003).

3.3.2. Исследование наличия МСК в сердечной ткани новорожденных животных

Содержит ли сердечная ткань новорожденных животных кардиомиоциты, способные к делению?

Считается, что после рождения сердце млекопитающих утрачивает способность к делению, а КМЦ находятся в стадии постмитотического развития в течение всего периода жизни организма. Однако, вероятно, существует незначительная популяция клеток в миокарде, обладающих свойствами стволовых клеток. По крайней мере, при повреждении сердца в нем обнаруживаются митотически активные кардиомиоциты. Доля их настолько мала, что они не способны участвовать в процессах ремоделирования миокарда (Румянцев 1982; Nadal-Ginard et al., 2003). Остается неясным вопрос, сохраняются ли после рождения в сердечной ткани МСК.

В связи с этим мы решили изучить, могут ли клетки сердца новорожденных животных формировать в системе *in vitro* колонии мезенхимальных клеток.

Опыты были проведены на 20 одно- и двухсуточных новорожденных крысах породы Вистар. В контроле использовали сердечную ткань от 1-месячных крысят. Для выделения мононуклеарных клеток из миокарда сердце новорожденных крысят измельчали на небольшие фрагменты. Затем обрабатывали 0,1 % раствором коллагеназы ("Sigma") и 0,1 % ДНКазы ("Sigma") в течение 40–45 мин при 37 °С. Фракционировали в градиенте фиколл-гипак ("Pharmacia") с плотностью 1,077 г/см³ и центрифугировали в силиконизирующих пробирках 20 мин при 2000 об/мин и культивировали в течение 3 суток в полной среде D-MEM, содержащей 20% ЭТС, 40 мкг/мл гентамицина, 200 мкг/мл L-глю-

тамина в культуральных флаконах. Среди выделенных клеток $95,1 \pm 1,1\%$ приходилось на бластные клетки, $2,0 \pm 0,7\%$ – на кардиомиоциты, $2,9 \pm 0,5\%$ – на другие типы, включая кардиомиобласты и фетальные клетки. Около $1,0 \pm 0,1\%$ кариоцитов находилось в стадии деления.

Клетки культивировали в течение 8–9 суток при 37°C с заменой полной среды через 3 суток. После чего с помощью $0,2\%$ раствора трипсина и версена выделяли прилипшие клетки из флаконов и вводили подопытным животным. Из одного сердца в среднем было выделено около $(3,6 \pm 0,1) \times 10^6$ /мл мононуклеаров (рис. 3.17) при жизнеспособности $95,0 \pm 0,2\%$. Эффективность клонирования сердечной ткани была ниже, чем у костного мозга, и составила около $(2,1 \pm 0,9) \times 10^7$. Около 30% клеток в колониях давали положительную реакцию на щелочную фосфатазу – фермент, как принято считать, являющийся маркером данной категории прогениторных клеток. Мононуклеары одномесячных крысят и взрослых животных такой способностью не обладали.

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что в сердце новорожденных крысят сохраняется пул МСК, отличных по своим морфологическим характеристикам от способных к делению нормальных, фетальных КМЦ и кардиомиобластов. Эти клетки наделены свойствами МСК, т.к. могут *in vitro*

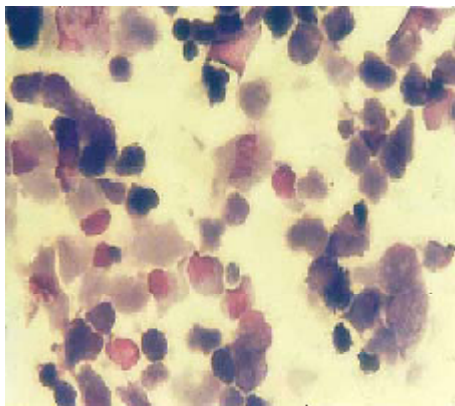


Рис. 3.17. Фракция мононуклеаров, выделенных из сердца новорожденных крысят. Окраска азур II-эозином, ув. 900х

формировать фибробластоподобные колонии и, по-видимому, обладают кардиогенным потенциалом (Shahov et al., 2002).

3.4. КАРДИОМИОПЛАСТИКА ОСТРОГО ИНФАРКТА МИОКАРДА С ПОМОЩЬЮ МСК, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КОСТНОГО МОЗГА

Для того, чтобы осуществить патогенетическую кардиомиопластику с помощью МСК, мы поставили перед собой ряд задач:

1. Выбрать источник мезенхимальных стволовых клеток (МСК) и определить их морфофункциональные свойства.
2. Разработать методы изменения дифференцировки МСК в сторону кардиомиогенеза и ангиогенеза в культуре ткани *in vitro*.
3. Выбрать оптимальные сроки, количество, частоту и путь доставки МСК в поврежденный миокард.
4. Разработать критерии оценки эффективности клеточной терапии (электрофизиологические, радиоизотопные, рентгенологические, функциональные и др. пробы).

Учитывая вышесказанное, необходимо ответить на ряд принципиальных вопросов:

- Какое количество МСК, способных к кардиомиогенной и ангиогенной дифференцировке, содержится в используемом материале?
- Как увеличить количество МСК с нужными свойствами?
- Сколько МСК следует вводить для проведения клеточной терапии?
- Когда следует трансплантировать МСК?
- Какой использовать способ доставки МСК в поврежденный миокард, чтобы получить выраженный клинический эффект?

Опыты были проведены на 40 половозрелых крысах-самцах породы "Вистар" (массой 180–220 г) и 50 самцах мышей линии СВА, С57Bl/6, гибридах F1 (СВАхС57Bl/6) (массой 18–21 г). Для моделирования постинфарктного кардиосклероза крысам (мышам) под эфирным наркозом в пятом межреберье пересекали два ребра. Затем осуществляли перикардотомию и перевязку в верхней части левой передней нисходящей коронарной артерии. Затем рану послойно ушивали, предварительно удалив воздух из сердечной сумки. Через 3–18 суток животных повторно наркотизировали, вскрывали сердечную сумку и в сердце в область бассейна левой передней нисходящей коронарной арте-