

РЕЗИДЕНТНЫЕ ПРОГЕНИТОРНЫЕ КАРДИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ У ПАЦИЕНТОВ С ДИЛАТАЦИОННОЙ КАРДИОМИОПАТИЕЙ И ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

Т.Г. Куликова, О.В. Степанова*, М.П. Валихов, А.Ю. Щедрина,
А.Н. Самко, В.П. Масенко, С.Н. Терещенко

Российский кардиологический научно-производственный комплекс.
121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, 15а

Цель. Изучить содержание резидентных прогениторов кардиомиоцитов в эндомикардиальных биоптатах и клинические характеристики пациентов с дилатационной кардиомиопатией (ДКМП) и хронической сердечной недостаточностью (ХСН) на разных стадиях заболевания.

Материал и методы. Работа была проведена на эндомикардиальных биоптатах 14 пациентов (возраст от 26 до 52 лет) с ДКМП и ХСН. Резидентные прогениторные кардиомиоциты были выявлены методом иммунофлуоресценции. Результаты анализировали индивидуально по каждому пациенту.

Результаты. В биоптатах пациентов с ДКМП и ХСН были выявлены резидентные прогениторные кардиомиоциты, экспрессирующие одновременно маркеры стволовых клеток c-kit, MDR-1 и маркеры ранней кардиомиоцитарной дифференцировки Nkx 2.5, GATA-4. Прогениторные резидентные клетки, выявленные по этим маркерам, были обнаружены у всех пациентов, на всех стадиях заболевания и всех возрастных групп.

Заключение. Содержание резидентных прогениторов кардиомиоцитов сохраняется при развитии ДКМП на разных стадиях ХСН, что может подтверждать наличие регенеративных процессов в миокарде на всех стадиях развития этого заболевания.

Ключевые слова: резидентные прогениторные кардиомиоциты, дилатационная кардиомиопатия, хроническая сердечная недостаточность.

Рациональная фармакотерапия в кардиологии 2014;10(2):203-211

Resident progenitor cardiac cells in patients with dilated cardiomyopathy and congestive heart failure

T.G. Kulikova, O.V. Stepanova*, M.P. Valihov, A.Ju. Shhedrina, A.N. Samko, V.P. Masenko, S.N. Tereshhenko
Russian Cardiology Research and Production Complex. Tretya Cherepkovskaya ul. 15a, Moscow, 121552 Russia

Aim. To study content of resident progenitor cardiomyocytes in endomyocardial biopsy samples of patients with dilated cardiomyopathy (DCM) and heart failure (HF) at different disease stages and relate it to patient clinical characteristics.

Material and methods. Resident progenitor cardiomyocytes were studied in endomyocardial biopsy samples from 14 patients (age from 26 to 52 years old) with DCM and HF by immunofluorescence method. Results were analyzed individually for each patient.

Results. Resident progenitor cardiomyocytes expressing simultaneously stem cell markers c-kit, MDR-1 and early cardiomyocyte differentiation markers GATA-4 and Nkx2.5 were found in endomyocardial biopsy samples from patients with DCM and HF. Resident progenitor cardiomyocytes detected by these cell markers were found in all patients at all disease stages.

Conclusion. Results show that the myocardial regenerative processes exist at all stages of the disease progression.

Key words: resident progenitor cardiomyocytes, dilated cardiomyopathy, heart failure.

Ration Pharmacother Cardiol 2014;10(2):203-211

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author): sms-34@yandex.ru

В настоящее время особое внимание привлекает дилатационная кардиомиопатия (ДКМП) как неуклонно прогрессирующее заболевание, являющееся одной из наиболее частых причин развития хронической сердечной недостаточности (ХСН). В последние десятилетия отмечается тенденция к увеличению распространенности ХСН, при этом 5-летняя смертность больных составляет 45-60%, сопоставима со смертностью от онкологических заболеваний и практически неотличима от таковой при ДКМП [1-3]. Как известно,

ключевым патогенетическим звеном прогрессирования ХСН является миокардиальное ремоделирование – сложный патологический процесс ультраструктурной перестройки сердца [4]. Основными особенностями миокардиального ремоделирования являются патологическая гипертрофия кардиомиоцитов, атрофия кардиомиоцитов, их гибель, изменения внеклеточного матрикса, фиброз, реактивация фетальной генетической программы [5-8]. Уменьшение вследствие этих процессов количества жизнеспособных функциональных кардиомиоцитов приводит к сократительной дисфункции сердца. В медицине многие годы существовало представление о том, что регенеративные процессы в постнатальном периоде в сердце человека не происходят, и что в сердце нет кардиальных прогениторных клеток, способных поддерживать гомеостаз или восстанавливать сердце после острых или хронических заболеваний. Замечательные открытия последних лет о том, что кардиомиоциты человека обновляются в течение жизни [9,10], изменили представление о сердце как терминально дифференцированном органе. Примерно 1% кардиомиоцитов человека обновляется ежегодно в возрасте 20 лет, и это чис-

Сведения об авторах:

Куликова Татьяна Гавриилловна – н.с. отдела нейрогуморальных и иммунологических исследований РКНПК

Степанова Ольга Владиславовна – к.б.н., с.н.с. того же отдела

Валихов Марат Петрович – аспирант того же отдела

Щедрина Анна Юрьевна – аспирант отдела заболеваний миокарда и сердечной недостаточности РКНПК

Самко Анатолий Николаевич – д.м.н., проф., руководитель лаборатории рентгеноэндоваскулярных методов лечения РКНПК

Масенко Валерий Павлович – д.м.н., профессор, руководитель отдела нейрогуморальных и иммунологических исследований РКНПК

Терещенко Сергей Николаевич – д.м.н., профессор, руководитель отдела заболеваний миокарда и сердечной недостаточности РКНПК

ло уменьшается до 0,3% к 75 годам [10]. Около 50% или немного меньше кардиомиоцитов обновляется в течение всей жизни человека [10]. Процесс обновления происходит либо за счет кардиальных резидентных прогениторных клеток, либо за счет пролиферации уже существующих кардиомиоцитов. Эти недавно появившиеся данные дали возможность развития миокардиальной клеточной регенеративной терапии, направленной на восполнение необходимого количества жизнеспособных функциональных кардиомиоцитов взамен погибших вследствие острого или хронического повреждения миокарда, и, как результат – не только остановки прогрессирования заболевания, но и его регресса. Необходимость поиска резидентных кардиальных прогениторных клеток обусловлена и тем, что многочисленные клинические исследования по введению в сердце человека стволовых клеток костного мозга, скелетных миобластов для регенерации и репарации миокарда не привели к значимым позитивным результатам [11-16]. Хотя результаты работы по регенерации миокарда после инфаркта введением стволовыми клетками костного мозга на животных моделях были успешными [17], дальнейшие изучения показали, что эти клетки не дифференцируются в кардиомиоциты, и, что, вероятнее всего, происходят межклеточные слияния [18]. По-видимому, незначительные позитивные сдвиги в клинических испытаниях по использованию стволовых клеток костного мозга для регенерации миокарда связаны либо с малоизученными паракринными эффектами этих клеток [19], либо с межклеточными слияниями [18]. Для применения в регенеративной клеточной терапии идеальными являются резидентные прогениторные кардиомиоциты. Эти клетки являются аутологичными, прекоммитированными, тканеспецифичными, способными к дифференцировке в зрелые кардиомиоциты [20-24]. Резидентные прогениторы кардиомиоцитов человека были выявлены и выделены из эндомикардиальных биоптатов здорового человека [21], но сохраняются ли эти клетки при развитии таких хронических прогрессирующих заболеваний, как ДКМП и ХСН, неизвестно.

Цель исследования

Изучить содержание резидентных прогениторов кардиомиоцитов в эндомикардиальных биоптатах и клинические характеристики пациентов с ДКМП и ХСН на разных стадиях заболевания.

Материал и методы

В пилотное исследование включены 14 больных ДКМП с I-IV ФК (NYHA), в возрасте от 26 до 52 лет, с фракцией выброса (ФВ) <40% и/или конечным диастолическим размером (КДР) левого желудочка (ЛЖ) >6,0 см, с длительностью заболевания ≥6 мес. В ис-

следование не включали пациентов с вторичным поражением миокарда (ИБС, артериальная гипертензия, влияние токсических веществ, болезни накопления, приобретенные пороки сердца и т.д.), наличием в анамнезе гемодинамически значимой устойчивой желудочковой тахикардии, врожденными пороками сердца. Также к критериям исключения относили наличие острых или обострение хронических воспалительных заболеваний, клинически значимые поражения печени (АСТ и АЛТ >3 раз верхних значений нормы) и почек (креатинин плазмы >260 мкмоль/л), наличие злокачественных новообразований, серьезных гематологических и неврологических расстройств.

Диагноз ДКМП верифицировали на основании тщательного анализа клинических данных и клинико-инструментальных исследований. Всем пациентам выполнено ЭКГ исследование в 12 отведениях, рентгенография органов грудной клетки. Трансторакальную эхокардиографию (Эхо-КГ) проводили по стандартной методике в М и В режимах при помощи ультразвукового аппарата «VIVID 9» фирмы «General Electric», США, имеющего электронные секторные датчики 1,7/3,4 МГц. 24-часовое мониторирование ЭКГ проводили с трехканальной записью ЭКГ в отведениях V1, V2 и V5 с использованием программного обеспечения Astrocord Holter2F. Всем пациентам проводили коронароангиографию (КАГ) феморальным доступом с контрастированием препаратами «Оптирей» или «Омнипак» в количестве 5-7 мл на каждую инъекцию в коронарную артерию (КА). Ангиографическое исследование выполняли на установке «Аллюра ХР» («Филипс» Германия). Селективное контрастирование КА проводили катетерами «Кордис» размерами 6F. При контрастировании выбирали минимум 4 проекции для левой коронарной артерии (ЛКА) и 2 проекции для правой коронарной артерии (ПКА). При анализе коронароангиограмм оценивали тип кровоснабжения, калибр, контуры коронарных артерий. Для количественной оценки использовали коронарную программу «HICOR». При отсутствии гемодинамически значимых стенозов в коронарных артериях пациентам выполняли эндомикардиальную биопсию. По установленному в полости желудочка направляющему катетеру (7-8 F) вводили Cordis bioptome. В среднем брали 4-5 биоптатов из правого желудочка (ПЖ), преимущественно из межжелудочковой перегородки (МЖП), как наиболее толстой стенки камеры сердца. Процедуру проводили в рентгеноперационной под контролем флюороскопии, ЭКГ, регистрации давления с кончика катетера (кривая давления позволяла убедиться, что направляющий катетер находится в желудочке). В дальнейшем проводили исследование биоптатов иммуногистохимическим методом. Все больные перед биопсией давали письменное информированное согласие.

Определение концентрации NT-proBNP проводили на автоматическом анализаторе Cobas 411 (Roche Diagnostics, Швейцария) электрохемилюминесцентным методом, наборами реагентов этой же фирмы.

Определение уровня вч-Тропонина Т также проводили на автоматическом анализаторе Cobas 411 (Roche Diagnostics, Швейцария) электрохемилюминесцентным методом, наборами реагентов этой же фирмы. За норму принимали концентрацию вч-Тропонина Т $\leq 3,0$ пг/мл.

Магнитную резонансную томографию (МРТ) сердца с контрастированием выполняли по стандартному протоколу исследований за несколько дней до проведения коронарографии и ЭМБ. В результате проведенной МРТ сердца оценивали следующие параметры: размеры полости ЛЖ [конечный диастолический размер (КДР), КСР], объемные показатели ЛЖ [конечный диастолический объем (КДО), конечный систолический объем (КСО), ФВ], масса миокарда левого желудочка (ММЛЖ), наличие или отсутствие отека, участков раннего и отсроченного контрастирования миокарда, масса и объем участков миокарда, задержавших контрастный препарат в отсроченную фазу.

Анализ размеров полости, КДО, КСО и ММЛЖ были выполнены с помощью специального программного обеспечения ARGUS (Siemens Medical Solutions) на рабочей станции томографа. Путем ручной обводки контуров эндокарда и эпикарда на серии последовательных изображений сердца по короткой оси ЛЖ вычисляли КДО, КСО, ударный объем (УО), ФВ, а также ММЛЖ. Оценку отека миокарда проводили визуально, сравнивали интенсивность сигнала от сердечной мышцы с интенсивностью сигнала от широчайшей мышцы спины, либо грудной мышцы. Выполняли качественный и количественный анализ участков накопления контрастного препарата. Качественный анализ включал определение локализации и характер контрастирования. Количественный анализ результатов исследования с отсроченным контрастированием проводили в 17 сегментах миокарда ЛЖ на 10 срезах по короткой оси ЛЖ, а также на срезах по двум длинным осям ЛЖ: в базальном отделе (6 сегментов), на уровне папиллярных мышц (6 сегментов), на уровне верхушки (4 сегмента), и верхушечный сегмент (по Serqueira M.D.). На каждом срезе в 17-сегментах в двухкамерной проекции ЛЖ вручную обводили контуры участков отсроченного контрастирования, тем самым определяли площадь контрастированного миокарда, а затем по формуле вычисляли общий объем контрастированного миокарда:

Общий объем контрастированного миокарда=

Σ Площадь контрастированного участка \times Толщина среза.

Иммунофлуоресцентное окрашивание криосрезов эндомиокардиальных биоптатов проводили по сле-

дующей методике: криосрезы эндомиокардиальных биоптатов (6 мкм) были зафиксированы в ацетоне при -20°C в течение 20 мин. Затем на срезы была нанесена эмбриональная телячья сыворотка в течение 20 мин при комнатной температуре для уменьшения неспецифического связывания антител. Последующая инкубация с первичными антителами была проведена в течение 60 мин. Были использованы следующие первичные антитела: Sca-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), c-kit (Santa Cruz Biotechnology, Inc), MDR-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), Nkx 2,5 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), GATA-4 (Santa Cruz Biotechnology, Inc). Затем срезы были отмыты от первых антител в фосфатно-солевом буфере и проинкубированы со вторичными флуоресцентномеченными антителами Alexa Fluor (Invitrogen, США), затем срезы были отмыты от вторичных антител в фосфатно-солевом буфере. Для окрашивания клеточных ядер был применен DAPI, далее срезы были промыты в фосфатно-солевом буфере и заключены в среду Aqua polymount (Polyscience Inc., США).

Полученные образцы были исследованы на инвертированном иммунофлуоресцентном микроскопе Axio Observer Z.1 (Zeiss, Германия) с функцией получения изображения. Для получения изображений использовали цифровую видеокамеру AxioCam HRC (Zeiss, Германия). Полученные изображения были обработаны в программе Axiovision 3.1 (Zeiss, Германия) и Adobe Photoshop (Adobe Systems, США).

Статистическую обработку материала не проводили, так как результаты анализировали индивидуально по каждому пациенту.

Протокол исследования одобрен этическим комитетом НИИ кардиологии им. А.Л. Мясникова.

Результаты

В табл. 1 представлена клиническая характеристика включенных пациентов.

При иммунофлуоресцентном окрашивании криосрезов эндомиокардиальных биоптатов пациентов с ДКМП и ХСН были выявлены клетки, экспрессирующие маркеры стволовых клеток c-kit, MDR-1 и маркеры ранней дифференцировки кардиомиоцитов Nkx 2,5 и GATA-4 (рис. 1, 2). Обнаруженные клетки имеют небольшие размеры, и у них наблюдается округлая форма. Клеточные маркеры локализованы следующим образом: c-kit и MDR-1 на клеточной мембране (рис. 1А, 2А), Nkx 2,5 и GATA-4 внутри ядра (рис 1Б, 2Б).

Для каждого пациента было определено среднее количество клеток ($5-10,5$ клеток на мм^2), подсчитанное на 6 срезах каждого биоптата (табл. 2). Прогениторные резидентные кардиомиоцитарные клетки были обнаружены в образцах эндомиокардиальных биоптатов у всех пациентов, на всех стадиях заболевания и всех возрастных групп.

Таблица 1. Клинические характеристики больных с ДКМП и ХСН

№ пациента	Пол	Возраст	ФК (NYHA)	Стадия ХСН	ФВ (%)	КДО (мл)	КСО (мл)	ПЖ (см)	МЖП (см)	ЖЭС (за 24 ч)	NT-proBNP (пг/мл)	Тропонин Т (пг/мл)
1	м	30	I	IIA	30	220	155	3,2	0,9	2300	1200	-
2	ж	26	II	I	40	167	102	2,5	0,9	8030	352,5	8
3	м	52	III	IIB	36	167	102	3,2	1	3737	1977	26,02
4	м	44	II	IIA	30	264	167	2,5	1,1	1	2180	66
5	м	34	IV	IIB	32	194	106	3,2	0,9	119	5088	97
6	м	39	II	I	23	272	224	3,1	0,9	67	2019	64
7	м	33	III	IIB	24	247	167	3,4	1,1	20	1796	38,71
8	м	33	II	I	37	335	187	3,4	0,8	1033	309,9	15,17
9	м	45	II	I	26	281	194	2,5	0,8	1	1158	5,28
10	ж	26	II	I	25	194	209	3	0,7	733	683,4	5,22
11	м	33	II	IIB	25,5	291	215	3,8	1,0	48	791,1	37,56
12	м	49	I	IIA	33	237	159	4,4	1,2	580	723,5	39,74
13	ж	46	II	IIB	27	255	102	-	1,0	51	210,3	10,79
14	м	34	II	IIB	45	201	102	2,6	1,1	50	1120	5,67

ФК – функциональный класс; ФВ – фракция выброса; КДО – конечный диастолический объем; КСО – конечный систолический объем; ПЖ – правый желудочек; МЖП – межжелудочковая перегородка; ЖЭС – желудочковые экстрасистолы (количество в сутки по данным суточного мониторинга ЭКГ)

Было проведено сопоставление клинических характеристик (табл. 1) каждого пациента с количеством обнаруженных у него прогениторных резидентных кардиомиоцитарных клеток (табл. 2). При этом видимой связи между количеством прогениторных клеток, полом пациента, возрастом, стадией ХСН, ФК по NYHA, ФВ, КДО, КСО, ПЖ, МЖП, биохимическими показателями не наблюдалось.

Обсуждение

В настоящем исследовании мы ставили цель выяснить, сохраняются ли кардиальные прогениторные резидентные клетки при прогрессировании таких заболеваний, как ДКМП и связанная с ней сердечная недостаточность, а также сопоставить содержание этих клеток с клиническими характеристиками включенных в данное исследование пациентов.

Были обнаружены прогениторные резидентные предшественники кардиомиоцитов в эндокардиальных биоптатах пациентов с ДКМП и ХСН на всех стадиях заболевания. Для выявления клеток были использованы как маркеры стволовых клеток как c-kit и MDR1, так и маркеры ранней кардиомиоцитарной дифференцировки Nkx2.5 и GATA-4. По результатам недавних работ стало известно, что в сердце человека существует пул прогениторных кардиальных клеток, характеризующихся экспрессией антигенов стволовых клеток [25-27]. Эти эндогенные клетки способны пролиферировать и дифференцироваться в различные кардиальные клеточные линии [28,29]. Резидентные человеческие кардиальные прогениторные клетки, возможно, имеют большое значение в поддержании клеточного гомеостаза и в регенерации миокарда [30-33]. Один из этих антигенов, C-kit, рецептор тирозиновой

киназы к фактору стволовых клеток, сначала стал использоваться для выделения гематопоэтических клеток из клеток костного мозга. Кардиомиогенный потенциал клеток, позитивных на c-kit, сейчас активно изучается, но способность этих клеток опосредовать кардиомиогенез in vivo до конца неизвестна. Клетки, позитивные на c-kit, способны дифференцироваться в различные кардиальные клеточные типы, такие как эндотелиальные клетки, гладкомышечные клетки и кардиомиоциты. Клетки, позитивные на c-kit, были обнаружены и выделены из эндокардиальных биоптатов сердца человека без сердечно-сосудистых заболеваний и из ушка правого предсердия при ишемической кардиомиопатии [34]. В работах Pouly et al. при анализе биопсийных образцов, полученных из межжелудочковой перегородки (со стороны правого желудочка) сердца пациентов, подвергшихся трансплантации сердца, и при анализе образцов, полученных из ушка правого предсердия пациентов с ишемической болезнью сердца, были обнаружены кардиальные стволовые клетки, позитивные на маркер стволовых клеток c-kit [34]. Число клеток, позитивных на c-kit, было выше в биопсийных образцах, полученных из межжелудочковой перегородки. Но эти образцы были взяты у тех пациентов, трети из которых применялась иммуносупрессивная терапия. В нашей работе были изучены биопсийные образцы, взятые у пациентов с верифицированным диагнозом ДКМП, и к которым применялась стандартная терапия.

Для идентификации кардиомиоцитарных прогениторных клеток в ЭМБ пациентов с ДКМП и ХСН нами, помимо маркера стволовых клеток c-kit, был использован маркер ранней кардиомиоцитарной дифференцировки – кардиальный гомеобоксный белок

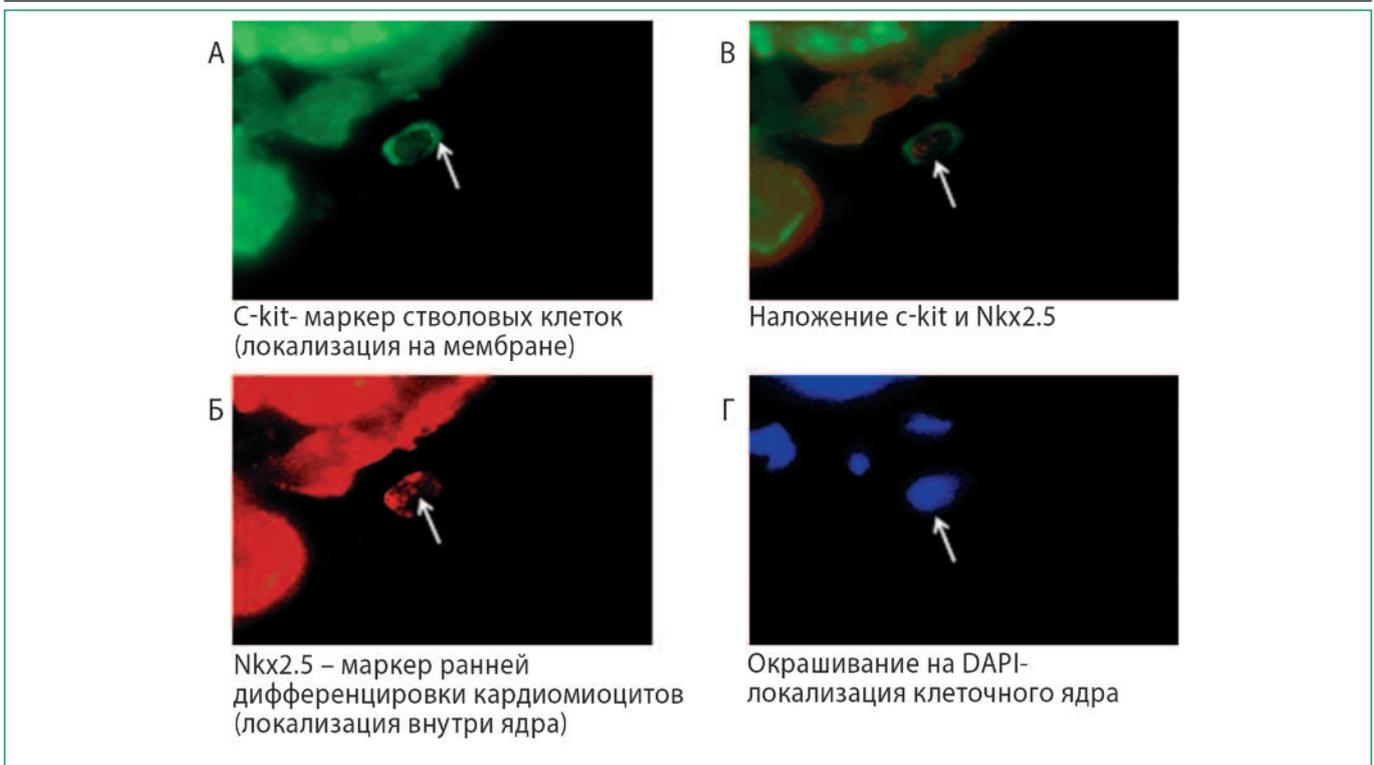


Рисунок 1. Резидентные прогениторы кардиомиоцитов в эндомикардиальных биоптатах пациентов с ДКМП и ХСН, выявленные по маркеру стволовых клеток c-kit (А) и маркеру ранней кардиомиоцитарной дифференцировки Nkx2.5 (Б) (показано стрелками). В – наложение изображений, Г– окрашивание клеточного ядра DAPI

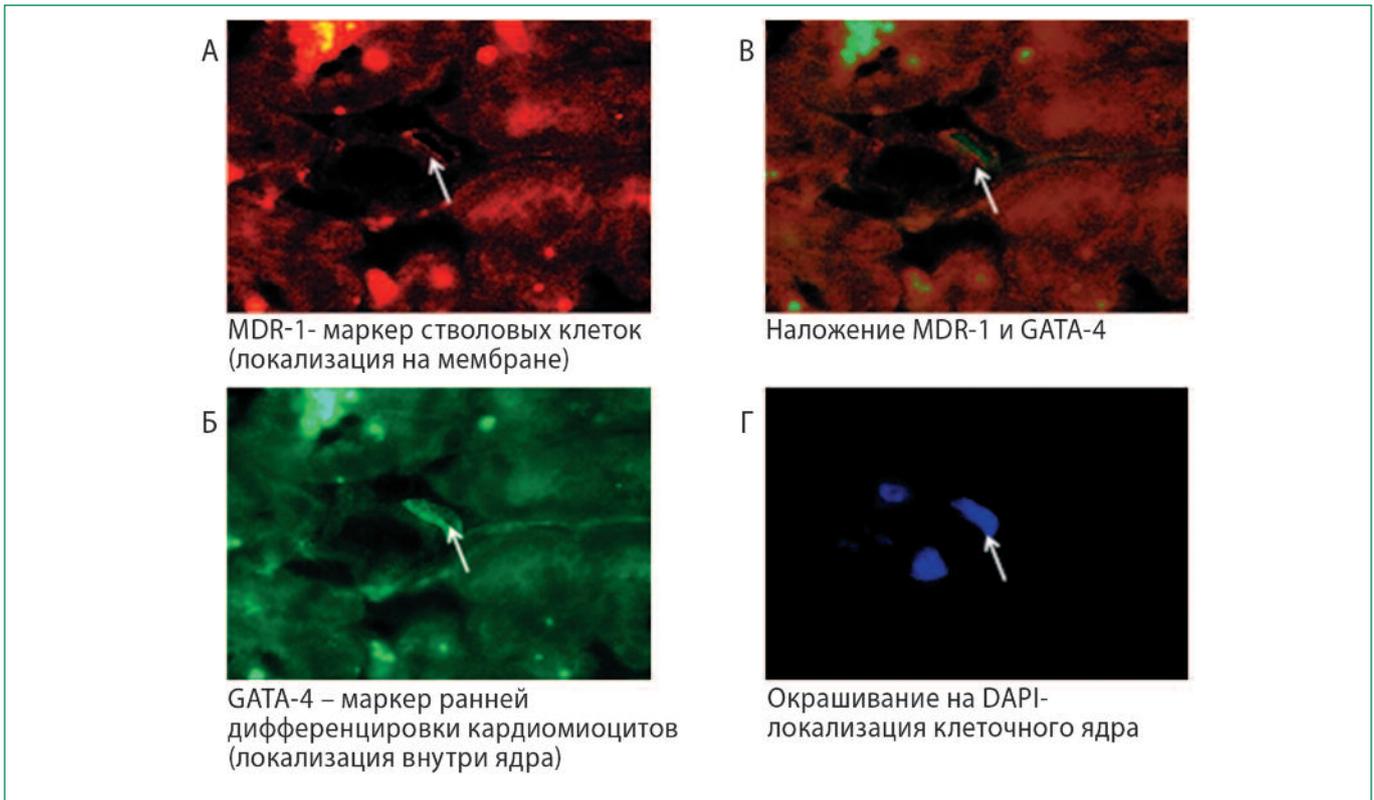


Рисунок 2. Резидентные прогениторы кардиомиоцитов в эндомикардиальных биоптатах пациентов с ДКМП и ХСН, выявленные по маркеру стволовых клеток MDR-1 (А) и маркеру ранней кардиомиоцитарной дифференцировки Gata-4 (Б) (показано стрелками). В – наложение изображений, Г– окрашивание клеточного ядра DAPI

Таблица 2. Содержание резидентных прогениторных кардиомиоцитарных клеток, обнаруженных в эндомикардиальных биоптатах пациентов, включенных в исследование

№ пациента	Среднее количество клеток на мм ²
1	8,9
2	6,3
3	5
4	8
5	9
6	7
7	8,3
8	7
9	10,5
10	9,7
11	9,7
12	5,4
13	9,2
14	6,4

Среднее количество клеток подсчитано на 6 срезах каждого биоптата

Nkx2.5. Ген Nkx2.5 является кардиальным маркерным геном, а сам Nkx2.5 – фактором транскрипции, специфичным для кардиомиоцитов, включен в процессы дифференцировки кардиомиоцитов и является маркером кардиомиоцитов. Клетки линии Nkx2.5 способны дифференцироваться в различные линии кардиомиоцитарных клеточных типов. Nkx2.5 необходим для развития сердца, и мутации Csx (ген, который кодирует Nkx2.5) вызывают различные врожденные болезни сердца.

Другие резидентные прогениторы кардиомиоцитов, обнаруженные нами в ЭМБ пациентов с ДКМП и ХСН, были охарактеризованы по маркеру стволовых клеток MDR1 и маркеру ранней кардиомиоцитарной дифференцировки GATA-4.

Экспрессия MDR1 характерна для так называемой боковой популяции стволовых клеток (side population). Впервые клетки боковой популяции были выделены из ткани сердца, с использованием методики вытеснения метки Hoechst 33342, применяемой ранее для обогащения резидентных прогениторных клеток из костного мозга и других органов. Вытеснение метки Hoechst в примитивных клетках сопровождается экспрессией различных АТФ-связывающих кассетных мембранных транспортеров, кодируемых генами множественной лекарственной резистентности (MDR). Hierliny et al. обнаружили, что клетки боковой популяции составляют примерно 1% в сердце мыши, но они не исследовали кардиомиогенный потенциал этих клеток [25]. Впоследствии были выделены клетки боковой популяции из взрослой мыши, позитивной на GFP, и проведено сокультивирование этих клеток с основной

популяцией кардиальных клеток из мыши дикого типа. После 14 дней культивирования неспецифическая фракция клеток, полученная из клеток боковой популяции и позитивная на GFP, иммуноспецифически окрашивалась на маркер поперечно-полосатых мышц α -актинин. Известно, что MDR1 экспрессируется на поверхности гематопоэтических стволовых клеток. Трансдукция клеток геном MDR1 приводит к значимому увеличению количества гематопоэтических стволовых клеток. Экспрессия MDR1 в прогениторных гематопоэтических клетках зависит от степени дифференцировки этих клеток. И MDR1, и c-kit не являются специфическими поверхностными маркерами кардиальных стволовых клеток, на сегодняшний день таких специфических маркеров не обнаружено. Для того чтобы идентифицировать именно кардиомиоцитарные прогениторные клетки, в данной работе был применен GATA-4, ген которого является кардиальным маркерным геном, а сам белок – специфическим фактором транскрипции кардиомиоцитов. В клетках GATA-4 выполняет функцию ключевого регулятора кардиальных генов, ядерного медиатора сигнальной системы RhoA, участвует в контроле сборки саркомеров в кардиомиоцитах и в дифференцировке кардиомиоцитов. GATA-4 является кардиоспецифичным членом семейства цинковых пальцев факторов транскрипции GATA. В эмбриогенезе функционирует как ключевой регулятор экспрессии кардиальных генов, контролируя эмбриональное развитие, дифференцировку кардиомиоцитов, способность постнатального сердца отвечать на стрессовые воздействия различного вида.

В нашей работе при индивидуальном сопоставлении клинических характеристик пациентов с подтвержденным диагнозом ДКМП и ХСН с исследованными образцами их эндомикардиальных биоптатов у всех пациентов на разных стадиях ХСН выявлены резидентные прогениторные кардиомиоциты. Однако видимой связи количества клеток с какими-либо клиническими характеристиками выявлено не было. Наличие резидентных прогениторных кардиомиоцитов наблюдалось и у тех пациентов, у которых были значительно повышены уровни NT-proBNP и кардиального тропонина Т. Повышение уровня сывороточного NT-proBNP в настоящее время считается реакцией организма, стремящейся компенсировать неблагоприятные гемодинамические эффекты происходящих патологических процессов в сердце, и, возможно, оказывающей кардиопротективное воздействие. Так как тропонин Т – это высокочувствительный и специфический сывороточный количественный маркер необратимого повреждения кардиомиоцитов, то его высокие абсолютные значения говорят о необратимом повреждении и гибели большого количества кардиомиоцитов [40-42].

Интересным является тот факт, что содержание прогениторных кардиомиоцитов, обнаруженных нами у пациентов с высокими значениями кардиального тропонина Т, было сравнимо с содержанием прогениторных кардиомиоцитов у пациентов с гораздо более низкими значениями кардиального тропонина Т. Это, вероятно, может свидетельствовать не только о наличии регенеративных процессов у больных с высокими значениями кардиального тропонина Т, но и о большей их выраженности, учитывая, что прогениторные кардиомиоциты, также как и зрелые функциональные, подвергаются гибели при ДКМП и ХСН.

В работах по изучению содержания кардиальных стволовых клеток в миокарде пациентов с ИБС были получены данные о том, что они сохраняются при развитии ИБС и, более того, что их количество значительно выше в желудочках у данных пациентов по сравнению с количеством этих клеток в желудочках пациентов, не страдающих ИБС.

В работах van Vliet P. et al. было показано, что в сердце человека в пренатальном и постнатальном периоде существуют стволовые/прогениторные кардиальные клетки [21]. Кардиомиоцитарные прогениторные клетки были выделены из ткани сердец здоровых людей и из фетальных человеческих сердец [21]. Эти клетки способны *in vitro* после обработки 5-азациитидином дифференцироваться в зрелые кардиомиоциты, не требуя сокультивирования с неонатальными крысиными кардиомиоцитами [21].

Сохраняются ли резидентные прогениторные кардиомиоцитарные клетки в сердце пациентов с таким прогрессирующим заболеванием, как ДКМП, оставалось неизвестным. Поиск прогениторных резидентных кардиомиоцитарных клеток и их возможное использование в клеточной терапии необходимы, так как при ДКМП происходит постоянная гибель одиночных зрелых функциональных кардиомиоцитов на всех стадиях развития заболевания. До недавнего времени гибель одиночных кардиомиоцитов желудочка сердца при ДКМП не считалась важным патогенетическим фактором развития ХСН. Исследования последних лет показали, что при ДКМП и связанной с ней ХСН происходит значимая постоянная гибель кардиомиоцитов, приводящая в результате к сократительной дисфункции сердца. В отличие от острого инфаркта миокарда, при котором происходит одномоментная гибель до бил-

лиона кардиомиоцитов, а иногда и более (в зависимости от тяжести инфаркта погибает около 25% миокарда, в том числе фибробласты, клетки сосудов), при ДКМП и связанной с ней ХСН ежегодно происходит гибель 20% кардиомиоцитов разными типами клеточной смерти (табл. 3). Предотвращение клеточной смерти кардиомиоцитов и повышение степени генерации новых кардиомиоцитов представляет собой важную мишень в клеточной терапии сердечной недостаточности.

Для применения в клеточной регенеративной терапии сердечно-сосудистых заболеваний с целью восполнения погибших клеток необходимо значительное увеличение количества клеток. Увеличение количества клеток в сердце может быть достигнуто различными двумя способами: выделение *ex vivo* клеток из биоптатов сердца пациентов, страдающих сердечно-сосудистыми заболеваниями, наращивание их до необходимого количества в культуре и последующая трансплантация клеток в сердце пациента. Второй способ заключается в стимулировании и активации пролиферации кардиальных резидентных прогениторных клеток *in situ* посредством введения определенных факторов в сердце. Хотя резидентные кардиальные прогениторные клетки обладают большим регенеративным потенциалом для репарации сердца, для их клинического использования при лечении сердечно-сосудистых заболеваний необходимо ответить на много вопросов, таких как: определение местонахождения подобных клеток в сердце человека; какие именно маркеры они экспрессируют, каковы механизмы, посредством которых эти клетки восстанавливают поврежденное сердце.

Заключение

Исследование выявленных нами клеток в эндомиокардиальных биоптатах пациентов с ДКМП и связанной с ней ХСН по вышеупомянутым маркерам позволяет судить, что эти клетки являются резидентными прогениторными кардиомиоцитарными клетками. Их содержание сохраняется при прогрессировании ДКМП на разных стадиях ХСН, что может подтверждать наличие регенеративных процессов в миокарде на всех стадиях развития этой болезни. Так как количество этих клеток в миокарде невелико, то необходима разработка методов, позволяющих значительно увеличить содержание прогениторных кардиальных клеток в сердце, и ме-

Таблица 3. Различные формы типов клеточной смерти кардиомиоцитов при ДКМП и связанной с ней ХСН [35]

Тип клеточной смерти	Частота выявления	Время удаления клеток	Ежегодный темп гибели кардиомиоцитов
Апоптоз	0,002%	Несколько часов	2-4%
Онкозис	0,06%	48 часов	11%
Аутофагия	0,08%	Неизвестно	10%
Общий			20-25%

тодов по эффективной дифференцировке прогениторных клеток в зрелые, сформированные функциональные кардиомиоциты. Развитие исследований в этом направлении, выделение прогениторных клеток из эндомикардиальных биоптатов, активация их пролиферации и дифференцировки, последующая транс-

плантация клеток в сердце пациента является крайне перспективным направлением в области регенеративной медицины.

Исследование поддерживается
грантом РФФИ 13-04-01026

Литература

- Levy D, Kenchaiah S, Larson MG, et al. Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med* 2002;347:1397-402.
- Stewart S, MacIntyre K, Hole DJ, et al. More 'malignant' than cancer? Five-year survival following a first admission for heart failure. *Eur J Heart Fail* 2001;3:315-22.
- Chakova D., Rose N.R. Pathogenesis of myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Adv Immunol* 2008;99:9.
- Dhalla NS, Saini-Chohan HK, Rodriguez-Leyva D, et al. Subcellular remodeling may induce cardiac dysfunction in congestive heart failure. *Cardiovasc Res* 2009; 81:429-38.
- Distefano G, Siacca P. Molecular pathogenesis of myocardial remodeling and new potential therapeutic targets in chronic heart failure. *Italian Journal of Pediatrics* 2012; 38:41
- Kuwahara K, Nakao K. New molecular mechanisms for cardiovascular disease: transcriptional pathways and novel therapeutic targets in heart failure. *J Pharmacol Sci* 2011; 116:337-42
- Diwan A, Dorn GW II. Decompensation of cardiac hypertrophy: cellular mechanisms and novel therapeutic targets. *Physiology* 2007; 22:56-64
- Whelan RS, Kaplinskiy V, Kitsis RN. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annu Rev Physiol* 2010; 72: 19-44.
- Bergmann O, Zdunek S, Alkass K, et al. Identification of cardiomyocyte nuclei and assessment of ploidy for the analysis of cell turnover. *Exp Cell Res* 2011; 317: 188-94.
- Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 2009; 324: 98-102.
- Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST Randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004; 364: 141-48.
- Lunde K, Solheim S, Aakhus S, et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; 355: 1199-209.
- Janssens S, Dubois C, Bogaert J, et al. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2006; 367: 113-21.
- Zimmet H, Porapakham P, Porapakham P, et al. Short- and long-term outcomes of intracoronary and endogenously mobilized bone marrow stem cells in the treatment of ST-segment elevation myocardial infarction: a meta-analysis of randomized control trials. *Eur J Heart Fail* 2011; 14: 91-105.
- Assmus B, Rolf A, Erbs S, et al, and the REPAIR-AMI Investigators. Clinical outcome 2 years after intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *Circ Heart Fail* 2010; 3: 89-96.
- Strauer BE, Yousef M, Schannwell CM. The acute and long-term effects of intracoronary Stem cell Transplantation in 191 patients with chronic heart failure: the STAR-heart study. *Eur J Heart Fail* 2010;12(7):721-9.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410: 701-05.
- Terada N, Hamazaki T, Oka M, et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002;416: 542-45.
- Mirotsov M, Jayawardena TM, Schmeckpeper J, et al. Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 2011; 50: 280-89.
- Goumans M-J, de Boer TP, Smits AM, et al. TGF-beta 1 induces efficient differentiation of human cardiomyocyte progenitor cells into functional cardiomyocytes in vitro. *Stem Cell Res* 2007; 1: 138-49.
- van Vliet P, Rocco M, Smits AM, et al. Progenitor cells isolated from the human heart: a potential cell source for regenerative therapy. *Neth Heart J* 2008;16:163-9.
- Smits AM, van Vliet P, Metz CH, et al. Human cardiomyocyte progenitor cells differentiate into functional mature cardiomyocytes: an in vitro model for studying human cardiac physiology and pathophysiology. *Nat Protoc* 2009; 4:232-43.
- Boer TPD, Veen TABV, Jonsson MKB, et al. Human cardiomyocyte progenitor cell derived cardiomyocytes display a matured electrical phenotype. *J Mol Cell Cardiol* 2010; 48: 254-60.
- van Vliet P, Smits AM, de Boer TP, et al. Foetal and adult cardiomyocyte progenitor cells have different developmental potential. *J Cell Mol Med* 2010; 14: 861-70.
- Hierlihy AM, Seale P, Lobe CG, et al. The post-natal heart contains a myocardial stem cell population. *FEBS Lett* 2002; 530: 239-243.
- Bearzi C, Rota M, Hosoda T, et al. Human cardiac stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:14068-73.
- Pevsner-Fischer M, Morad V, Cohen-Sfady M et al. Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. *Blood* 2007;109(4):1422-32.
- Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 12313-18,
- Matsuura K, Nagai T, Nishigaki N, et al. Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2004; 279: 11384-91.
- Hsieh PCH, Segers VFM, Davis ME, et al. Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. *Nat Med* 2007;13:970-4.
- Torella D, Ellison GM, Mendez-Ferrer S, et al. Resident human cardiac stem cells: role in cardiac cellular homeostasis and potential for myocardial regeneration. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006;3(Suppl 1):s8-s13.
- Smith RR, Barile L, Cho HC, et al. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endo-myocardial biopsy specimens. *Circulation* 2007; 115: 896-908.
- Urbanek K, Torella D, Sheikh F, et al. Myocardial regeneration by activation of cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 8692-7.
- Pouly J, Bruneval P, Mandet C, et al. Cardiac stem cells in the real world. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008; 135: 673-678.
- Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis. *Am J Pathol* 1995;146:3-15.
- Kostin S. Pathways of myocyte death: implications for development of clinical laboratory biomarkers. *Adv Clin Chem* 2005;40:37-98.
- Vigilano CA, Cabeza Meckert PM, Diez M, et al. Cardiomyocyte hypertrophy, oncosis, and autophagic vacuolization predict mortality in idiopathic dilated cardiomyopathy with advanced heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2011;57:1523-31.
- Kostin S, Pool L, Elsasser A, et al. Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts. *Circ Res* 2003;92:715-24.
- Hein S, Arnon E, Kostin S, et al. Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms. *Circulation* 2003;107:984-91.
- Elsasser A, Voigt AM, Nef H, et al. Human hibernating myocardium is jeopardized by apoptotic and autophagic cell death. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:2191-9.
- Tverenberg R, Jaffe A, Reichlin T, Reiter M, Mueller C: High-sensitive troponin T measurements: what do we gain and what are the challenges? *Eur Heart J* 2012; 33(5):579-86.
- de Lemos JA, Drazner MH, Omland T, et al. Association of troponin T detected with a highly sensitive assay and cardiac structure and mortality risk in the general population. *JAMA* 2011;304:2503-12.
- Hessel MH, Michielsen EC, Atsma DE, et al. Release kinetics of intact and degraded troponin I and T after irreversible cell damage. *Exp Mol Pathol* 2008;85:90-5.

Поступила: 13.03.2014
Принята в печать: 11.04.2014