

21. Huber S. A., Kupperman J., Newell M. K. Hormonal regulation of CD4⁺ T-cell responses in coxsackievirus B3-induced myocarditis in mice // *Ibid.* – 1999. – Vol. 73, № 6. – P. 4689–4695.
22. Huber S. A., Mortensen A., Moulton G. Modulation of cytokine expression by CD4⁺ T-cells during Coxsackievirus B3 infection of BALB/c mice initiated by cells expressing the $\alpha\beta$ + T-cell receptor // *Ibid.* – 1996. – Vol. 70, № 5. – P. 3039–3044.
23. Huber S. A., Polgar J., Schultheiss P., Schwimmbeck P. Augmentation of pathogenesis of coxsackievirus B3 infections in mice by exogenous administration of interleukin-1 and interleukin-2 // *Ibid.* – 1994. – Vol. 68, № 1. – P. 195–206.
24. Hufnagel G., Pankuweit S., Richter A. et al. The European Study of Epidemiology and Treatment of Cardiac Inflammatory Diseases (ESETCID) // *Herz.* – 2000. – Bd. 25, № 3. – S. 279–285.
25. Kanda T., Ohshima S., Yuasa K. et al. Idiopathic myocarditis associated with T-cell subset changes and depressed natural killer activity // *Jap. Heart J.* – 1990. – Vol. 31, № 5. – P. 741–744.
26. Liu P. P., Mason J. W. Advancing in understanding myocarditis // *Circulation.* – 2001. – Vol. 104. – P. 1076–1082.
27. Maisch B., Portig I., Ristic A. et al. Definition of inflammatory cardiomyopathy (myocarditis): on the way to consensus // *Herz.* – 2000. – Bd. 25, № 3. – S. 200–209.
28. Malkie S., Factor S., Diamond B. Autoimmune myocarditis does not require B-cell for antigen presentation // *J. Immunol.* – 1999. – Vol. 163, № 10. – P. 5265–5268.
29. Matsumori A., Yamada T., Suzuki H. et al. Increased circulating cytokines in patients with myocarditis and cardiomyopathy // *Heart J.* – 1994. – Vol. 72. – P. 561–566.
30. Maze S. S., Adolph R. J. Myocarditis: unresolved issues in diagnosis and treatment // *Clin. Cardiol.* – 1990. – Vol. 13, № 2. – P. 69–79.
31. Nigro G., Politano L., Nigro V. et al. Mutation of dystrophin gene and cardiomyopathy // *Neuromusc. Disord.* – 1994. – Vol. 4. – P. 371–379.
32. Okura Y., Yamamoto T., Goto S. et al. Characterization of cytokine and iNOS mRNA expression in situ during the course of experimental autoimmune myocarditis in rats // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 1997. – Vol. 29, № 2. – P. 491–502.
33. Roitt I. M., Delves P. J. *Roitt's essential Immunology.* 10th ed. – Oxford: Blackwell Science, 2001.
34. Schwimmbeck P. L., Rohn G., Wrusch A. et al. Enteroviral and immune mediated myocarditis in SCID mice // *Herz.* – 2000. – Bd. 25, № 3. – S. 240–244.
35. Sherry B., Li X. Y., Tyler K. L. et al. Lymphocytes protect against and are not required for reovirus-induced myocarditis // *J. Virol.* – 1993. – Vol. 67, № 10. – P. 6119–6124.
36. Stone-Wolff D. S., Yip Y. K., Kelker H. C. et al. Interrelationships of human interferon-gamma with lymphotoxin and monocyte cytotoxin // *J. Exper. Med.* – 1984. – Vol. 159, № 3. – P. 828–843.
37. Thornell L., Carlsson L., Mericskay M., Paulin D. Null mutation in the desmin gene gives rise to cardiomyopathy // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 1997. – Vol. 29, № 8. – P. 2107–2124.

Поступила 19.02.2007

© Е. З. ГОЛУХОВА, Т. Т. КАКУЧАЯ, 2007

УДК 616.1-089:576.3-085

Клеточная терапия в кардиологии и сердечно-сосудистой хирургии: обзор рандомизированных исследований. Реалии и перспективы

Е. З. Голухова, Т. Т. Какучая

Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А. Н. Бакулева
(дир. – академик РАМН Л. А. Бокерия) РАМН, Москва

Проведен аналитический обзор рандомизированных клинических исследований с использованием стволовых клеток, а также новейших тенденций в развитии и возможностях применения клеточных технологий в современной кардиологии и сердечно-сосудистой хирургии. Освещены вопросы разработки

методов и средств, позволяющих детектировать клеточное воздействие в организме больного, с иллюстративными материалами зарубежных специалистов в этой области.

Ключевые слова: стволовые клетки, инфаркт миокарда, ишемия, рандомизированные клинические исследования.

В связи с развитием фундаментальных разделов клеточной и молекулярной биологии появился новый если не альтернативный, то вспомогательный метод лечения заболеваний внутренних органов, в том числе сердца и сосудов, связанный с трансплантацией стволовых прогениторных клеток и использованием ангиогенных факторов. Технологии применения указанных методов в кардиологии разрабатываются уже на протяжении 10–15 лет; за это время был накоплен ряд экспериментальных данных, свидетельствующих о перспективности данного направления, о возможности выживания клеток и в определенной степени регенерации и ревазкуляризации миокарда.

Концептуальные основы использования стволовых клеток

Стволовые клетки (СК) обладают двумя определяющими характеристиками — они способны дифференцироваться в широкий спектр различных типов клеток и способны к самообновлению. Биологические принципы, лежащие в основе использования стволовых клеток, подразумевают наличие направленной дифференцировки [7]. Например, взрослые стволовые клетки, изолированные из ткани печени и повторно введенные в печень, становятся гепатоцитами, а при введении тех же клеток в миокард — миоцитами. Таким образом, стволовые клетки могут «встраиваться» в различные ткани, в том числе нервную, дистрофированную или поврежденную скелетную мышцу. При определенных условиях, существующих в культуре клеток, стволовые клетки способны дифференцироваться в сердечные миоциты и эндотелиальные клетки.

Классификация стволовых клеток основывается на наличии значительного числа клеточных маркеров и до конца не

определена (табл. 1). Однако существуют первичные различия между эмбриональными и взрослыми стволовыми клетками. Среди клеток костного мозга в упрощенном виде выделяют гематопоэтические клетки CD34+, являющиеся предшественниками клеток крови и эндотелиальных клеток, и мезенхимальные стволовые клетки CD34–, являющиеся мультипотентными предшественниками стромальных клеток, включая фибробласты и остециты.

В ряде исследований показано, что повреждение вызывает естественную мобилизацию циркулирующих моноклеаров CD34+ и уровня факторов роста (это, в частности, наблюдается у больных с острым ИМ), которые достигают пиковых значений к 7-му дню [31]. Важнейшими этапами в использовании клеточных технологий в клинической практике являются мобилизация стволовых клеток из костного мозга, их «хоуминг» в очаге повреждения и дифференцировка в функциональные клетки поврежденной ткани.

Первые попытки замещения инфарцированного миокарда в экспериментальной модели обширного инфаркта миокарда были связаны с прямой инъекцией фетальных и скелетных миобластов, способных «встраиваться» в нормальный и инфарцированный миокард. При этом через 2 мес описано лучшее восстановление сердечной функции по сравнению с контрольной группой [5, 16, 22, 33, 34]. Однако эти исследования не смогли доказать функциональную интеграцию пересаженных клеток — миобласты не трансдифференцировались в миоциты и не образовывали значимых связей с окружающими кардиомиоцитами. В то же время, как это было доказано в эксперименте, в культуре клеток стволовые клетки, несущие кардиоспецифичные гены, экспрессирующие

Таблица 1

**Некоторые термины, используемые в исследованиях клеточных технологий
(Forrester J., 2003)**

Термин	Определение
Гемангиобласты	Эмбриональные стволовые клетки, предшественники кроветворных и эндотелиальных клеток
Гематопоэтические стволовые клетки	Стволовые клетки спинного мозга, предшественники кроветворных и эндотелиальных клеток
Эндотелиальные клетки-предшественники	Гематопоэтические стволовые клетки, имеющие специфические маркеры [*]
Мезенхимальные стволовые клетки	Стволовые клетки костного мозга, предшественники стромальных клеток и фибробластов ^{**}
Аутологичные клетки	Клетки того же индивидуума
Аллогенные клетки	Клетки той же ткани
Гетерологичные клетки	Клетки из другой ткани

^{*} Некоторые авторы определяют их как имеющие маркеры CD34+/CD117, экспрессирующие определенные протеины.

^{**} В отличие от гематопоэтических данная популяция характеризуется CD34– и обладает способностью к адгезии.

структурные протеины и ионные каналы, могли дифференцироваться в кардиомиоциты. После проведения соответствующих экспериментов некоторые авторы указывают на важность межклеточного взаимодействия, что опосредуется соответствующими паракринными влияниями.

Одним из важных этапов в использовании стволовых клеток костного мозга является феномен «хоуминга», то есть их избирательное накопление в поврежденном миокарде (например, после острого ИМ). Этот феномен изучен не полностью и представляет собой, по данным ряда авторов, весьма сложный процесс, включающий мобилизацию стволовых клеток, стимулами к которой могут быть различные цитокины, клеточные факторы или гранулоцитарный колоний-стимулирующий фактор (GCSF). Протеины экстрацеллюлярного матрикса и протеолитические энзимы также способствуют клеточной мобилизации. После попадания этих клеток в циркуляторное кровяное русло продуцируемые в зоне поражения молекулы адгезии приводят к их «прилипанию» к эндотелиальным клеткам. Процесс направленной (в рамках данной ткани, в пределах пораженного органа) дифференцировки, возможно, опосредуется межклеточными

контактами и факторами роста [7]. Феномен «хоуминга», таким образом, предполагает и внутривенный способ доставки клеточного материала. Успех данного подхода был продемонстрирован в эксперименте на модели острого ИМ, когда стволовые клетки костного мозга, дополнительно мобилизованные введением гранулоцитарного колоний-стимулирующего фактора, были введены внутривенно [20]. Авторы описывают активацию процессов ангио- и васкулогенеза, ограничение зоны повреждения с позитивными гемодинамическими сдвигами в виде повышения сердечного выброса. Перспективным является генетическая «предподготовка» вводимых стволовых клеток, которую можно провести *in vitro*. Подобные подходы использовались в эксперименте на модели ишемии конечности [15] при введении гетерологичных эндотелиальных прогениторных клеток с геном VEGF с хорошим терапевтическим эффектом. Однако подобные манипуляции с измененными прогениторными клетками могут быть потенциально злокачественными и нуждаются в дальнейших доклинических исследованиях.

Спонтанная мобилизация стволовых клеток в ответ на повреждение предполагает, что использование цитокинов GCSF,

опосредующих эти процессы, может быть весьма перспективным терапевтическим подходом.

Одним из ключевых вопросов использования стволовых клеток остается слабая доказательная база того, что пересаженные клетки способны дифференцироваться в соответствующие ткани (в частности, кардиомиоциты и кровеносные сосуды), даже если донорские клетки теми или иными способами удается идентифицировать в ткани хозяина. Некоторые авторы полагают, что в действительности имеют место не процессы трансдифференцировки, а процессы слияния. Последние могут объяснить обнаружение в зоне трансплантации клеток с 4-мя половыми хромосомами (XXXXY) и двойным набором ДНК [35]. Сторонники теории трансдифференцировки защищают свои позиции тем, что феномен слияния обнаруживается крайне редко (1 на 10000–100000 клеток), в то время как трансдифференцировка с регенерацией ткани печени и развитие капиллярной сети обнаружены в 55% образцов, когда экспериментальным животным вводили взрослые стволовые клетки костного мозга. В работе J. S. Forrester и соавт. (2003 г.) представлены данные экспериментальных исследований с введением стволовых клеток в подострую фазу ИМ в периинфарктную зону. Введенные меченные клетки через месяц после процедуры демонстрировали фенотипические характеристики сердечных миоцитов, эндотелиальных клеток и фибробластов, что, по мнению авторов, позволило стабилизировать ФВ ЛЖ и поддерживать ее на более высоком по сравнению с контрольной группой уровне. Целый ряд экспериментальных исследований свидетельствует о возможности стволовых клеток дифференцироваться в кардиомиоциты *in vivo* в зависимости от их особенностей, структурных характеристик, экспрессии кардиоспецифичных протеинов (таких как актин и миозин). Эти данные получены как при гистологическом анализе, так и при изучении миокардиальной перфу-

зии, в том числе на модели острого инфаркта миокарда. При этом одни вводимые клетки становились миоцитами или эндотелиальными клетками, другие же, введенные в инфарктированный миокард, экспрессировали фенотип, характерный для фибробластов, и «встраивались» в рубцовую ткань. Как показано в экспериментальных исследованиях, эти сложные процессы препятствовали дилатации и ремоделированию левого желудочка. Однако обнаружение явления «слияния» с патологическим набором хромосом должно настораживать при использовании данного подхода в клинической практике.

В большинстве клинических исследований используются гематопоэтические стволовые клетки, поскольку мезенхимальные, по современным представлениям, обладают слабой способностью дифференцировки в эндотелиальные клетки и кардиомиоциты. Остается актуальным вопрос о предпочтительном использовании аутологичных и аллогенных гематопоэтических клеток. Последние могут быть источником конфликта «трансплантат – хозяин», но позволяют получить необходимое количество клеточного материала и оптимизируют сроки введения препарата. Лишенные указанного недостатка, аутологичные клетки требуют отсроченной (а при остром инфаркте миокарда – повторной) катетеризации. Наконец, еще одна альтернатива может быть связана с использованием аутологичных мезенхимальных стволовых клеток, применение которых не требует значительной иммуносупрессии. Это открывает возможности коммерческого использования последних, однако прежде всего необходимо доказать их эффективность, сопоставимую с гематопоэтическими стволовыми клетками. Перспективным направлением клинических исследований может быть мобилизация стволовых клеток путем введения гранулоцитарного колоний-стимулирующего фактора с последующим (через несколько дней) выделением нужного числа клеток из периферической крови.

Но и здесь существуют свои «подводные камни», в частности не ясно, как поведут себя множественные нестабильные атеросклеротические бляшки, имеющиеся у больных с острым коронарным синдромом.

Ввиду ограниченной возможности использования фетального (эмбрионального) и неонатального материала клиническое применение трансплантации клеток было сфокусировано на использовании аутологичного материала. Идеальные для трансплантации клетки должны быть выделены из ткани, которую легко культивировать, клетки должны быстро расти в культуре, сохранять свои свойства, но и в то же время обладать способностью к изменению фенотипа. Всем приведенным требованиям отвечают клетки костного мозга, которые потенциально способны формировать различные виды тканей, включая мышечную ткань и кровеносные сосуды, без которых невозможны регенерация и реваскуляризация миокарда, то есть костный мозг является источником клеток, которые после культивации и имплантации способны индуцировать процессы как мио-, так и ангиогенеза, что было доказано на модели экспериментально вызванной ишемии миокарда. Так, большинство авторов сообщают об увеличении числа кровеносных сосудов в зоне имплантации аутологичных клеток костного мозга. Для активации ангиогенеза эффективно введение моноклеарных клеток. В то же время остается неясным, улучшится ли в этой ситуации сократительная способность миокарда без предварительной трансформации их в мышечные клетки в условиях *in vitro*. Возможно, для оптимизации функционального состояния миокарда необходимо стимулировать не только процессы ангиогенеза, но и миогенеза.

К клеткам-предшественникам костного мозга относят гематопозитические СК, которые мигрируют из костного мозга за счет «хоуминга» в очаг повреждения и мо-

гут дифференцироваться в эндотелиальные клетки. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки могут быть иммобилизованы из костного мозга в область повреждения и дифференцироваться в специализированные клетки миокарда и кровеносных сосудов.

Учитывая, что спонтанные процессы регенерации кардиомиоцитов в большинстве случаев не способны компенсировать имеющиеся при инфаркте и других поражениях миокарда потери, одним из перспективных направлений является экзогенное введение пулов клеток-предшественников костного мозга, возможно, скелетных миобластов или же непрямого использование GCSF (гранулоцитарного колоний-стимулирующего фактора) для увеличения числа определенных видов клеток. В последнем случае стимулируется выход клеток костного мозга в циркуляторное русло, что при наличии острого воспалительного процесса (например, острого инфаркта миокарда) способствует выздоровлению и восстановлению функции. Следует отметить также, что число циркулирующих клеток увеличивается при экзогенной стимуляции цитокинами и гормонами, их мобилизацию усиливают повреждение, острая ишемия, воспаление, а также статины и повышенная физическая активность.

Эффективность клеточной терапии существенно зависит не только от вида трансплантируемых клеток, но и от сроков их использования и вида доставки. Согласно данным Sh. Fazel и соавт., процесс дифференцировки стволовых клеток подчиняется закону «рубец порождает рубец» и «мышца порождает мышцу», поэтому трансплантация клеток-предшественников для оптимизации ангио- и миогенеза предпочтительна в ранние сроки инфаркта миокарда, до образования рубца, ремоделирования левого желудочка и развития ишемической кардиопатии. *Что же касается методов имплантации, многие ученые склонны считать, что «точечное» интрамиокардиальное введение непосредственно*

в зону поражения миокарда предпочтительнее интракоронарного и эндокавитального введения.

В клинической практике большее распространение получило введение тотипотентных клеток костного мозга, содержащих множество разных клеточных типов, «нефракционированных» мононуклеаров костного мозга, а также «фракционированных» CD34/CXCR4⁺ (поверхностные маркеры), «взрослых» прогениторных клеток периферической крови (эффективность ниже), скелетных миобластов. Наконец, источником стволовых клеток могут быть плацента, а также ткани, содержащие определенное количество стволовых клеток (например, жир или перикард).

Интимные механизмы, «окружающие» процессы трансплантации клеток, остаются в значительной степени неизвестными. В эксперименте было доказано, что введение культуры эмбриональных и неонатальных кардиомиоцитов способно формировать спонтанно сокращающуюся кардиоподобную ткань. Полагают, что основные эффекты использования указанных подходов связаны, во-первых, со стимуляцией ангиогенеза (улучшение кровоснабжения пограничной к инфарцированной зоне), во-вторых, с паракринными эффектами (модуляция миокардиального фиброза и ремоделирование, ингибция апоптоза и др.). Возможно, имплантированные клетки взаимодействуют с кардиомиоцитами реципиента, обеспечивая определенное электромеханическое взаимодействие, приводя к своеобразной реорганизации структурных элементов. По данным некоторых авторов, клеточные технологии способны восстанавливать миокардиальную матрикс-динамичную микросреду, структурный каркас миокарда, координирующий процесс жизнедеятельности клеток — их ориентацию, рост (гипертрофию и пролиферацию), сокращение, жизнеспособность, гибель (апоптоз). Повреждение миокардиального матрикса нарушает его роль как

каркаса, что приводит к дилатации полостей сердца, систолической и диастолической дисфункции. Таким образом, клеточные технологии способствуют восстановлению структурной архитектуры миокарда, миокардиального матрикса, одной из важнейших мишеней в лечении сердечной недостаточности. Это достигается, в частности, за счет продукции биологически активных пептидов, стимулирующих ангиогенез (в том числе различных факторов роста), а также процессов гипертрофии, пролиферации и выживания клеток, восстанавливающих определенный баланс в зоне пораженного миокарда. Эти механизмы, по-видимому, способны сдерживать процессы дилатации и дисфункции миокарда, даже если донорские клетки не способны к сокращению. Кроме того, эффекты использования рассматриваемых подходов связаны с особенностями трансдифференцировки стволовых прогениторных клеток в кардиомиоциты. Полагают, что менее всего позитивные их эффекты связаны непосредственно с регенерацией кардиомиоцитов (M. Tendera), хотя точные механизмы не установлены.

Возможности визуализации вводимых стволовых клеток и оценка их валидности

Целый ряд используемых для характеристики состояния миокарда параметров носит непрямой характер и не позволяет оценить плотность распределения сосудистой сети и ряд других морфологических характеристик рутинными методами. С другой стороны, в большинстве случаев выполняемые вмешательства носят сочетанный, «гибридный» характер, и рассуждения о «вкладе» клеточных технологий в получаемый результат в определенной степени спекулятивны. Все это определяет актуальность проблемы использования новых диагностических методик, в том числе протонно-эмиссионной компьютерной томографии и ядерно-магнитно-резонансной томографии со специальными метками.

Проблема визуализации относительно небольших клеточных массивов, естественно, не ограничивается использованием стволовых клеток при заболеваниях сердца, но весьма актуальна и для таких разделов медицины, как онкология, иммунология, трансплантология. Используемые экзогенные контрастные агенты должны быть биосовместимыми, безопасными и нетоксичными; идеальный же метод визуализации должен быть высокоспецифичным и определять количественно содержание определенных клеток на любом анатомическом уровне [9]. По данным литературы, наиболее часто в качестве методов визуализации при использовании генных технологий применяют лучевые методики (компьютерную томографию) с контрастной меткой (не обеспечивает должную чувствительность), оптические методы (биолюминесцентный и флуоресцентный, с высоким разведением диагностического агента при делении клеток и его перераспределением в случае их гибели) и ультразвуковые (имеющие помимо перечисленных ограничений еще и низкую разрешающую способность и ультразвуковую «недоступность» ряда анатомических зон). Для изучения стволовых клеток *in vivo* используют также однофотонную эмиссионную компьютерную томографию (СПЕКТ), однако и в данном случае возникают методологические сложности, связанные со временем полураспада диагностического агента, возможностью его миграции и длительностью экспозиции. Интересны краткосрочные радиоизотопные исследования (до 96 ч), доказывающие явления «хоуминга», то есть определенной тропности прогениторных эндотелиальных клеток, меченных радиометкой — indium oxine [4]. Более чувствительной в этом плане считается ПЭТ, позволяющая, по литературным данным, более точно, в том числе и количественно, характеризовать популяцию стволовых клеток. Наиболее «продвинутой» технология в этом разделе — интеграция тимитидинкиназы мутанта вируса простого герпеса

в стволовые клетки и периодическое их внутривенное введение. Хотя это позволяет характеризовать поведение стволовых клеток в течение месяцев, указанная тактика требует генетических «манипуляций», а также использования сложнейших диагностических и химико-аналитических технологий. Наиболее часто в исследованиях *in vivo* в настоящее время используют магнитно-резонансную томографию, методики которой подразделяют в зависимости от использования различных контрастов. Контрастные агенты T1 утилизируют лантанид гадолиний (Gd^{3+}), более распространены с начала 90-х годов исследования с контрастом T1/T2. Н. Ittrich и соавт. (2005 г.) использовали в качестве диагностического агента монокристаллины оксида железа (MIONs), ультрамалые суперпарамагнитические агенты оксида железа (USPIOs). Некоторые из данных агентов получили даже одобрение FDA. Существенным ограничением этих, как и всех других, МРТ-технологий является невозможность их использования при наличии металлсодержащих имплантируемых устройств. Весьма перспективным считается разработка мультимодальных контрастных агентов для идентификации единичных клеток *ex vivo* и *in vivo*, что позволяет одновременно использовать несколько диагностических методов визуализации.

Интересным явилось использование исследователями из Техасского института сердца методов трехмерного электрического и механического картирования для оценки эффективности клеточной терапии, как в экспериментальных, так и в клинических исследованиях [26]. Е. С. Perin и соавт. любезно дали нам разрешение на иллюстративную публикацию полученных результатов. В экспериментальном исследовании на собаках на модели острого ИМ, созданной путем перевязки передней межжелудочковой ветви левой коронарной артерии, было подтверждено повреждение миокарда с помощью электрического и механического картирования. Через 7 дней после

ИМ исследователи вводили животным 100 млн аллогенных мезенхимальных СК в пограничную к инфаркту зону миокарда (рис. 1, а). Через 2 недели наблюдалось значительное улучшение как электрической, так и механической функций сердца (рис. 1, б). Также отмечалось улучшение индекса кинетики стенок и уменьшение области повреждения (или ишемии), с достоверным преимуществом трансэндокардиального введения клеток перед интракоронарным способом. Авторы идентифицировали клетки разных тканей микроскопически с помощью иммуногистохимического метода: эндотелий окрашивали для визуализации фактора VIII, глад-

комышечные клетки – для визуализации актина, а кардиомиоциты – для визуализации тропонина. Вводимые СК были помечены красной меткой – DI-I, появление желтого цвета в микроскопическом образце служило индикатором ко-локализации. Авторы выражают полную уверенность в том, что СК потенцируют образование новых сосудов, поскольку они показали измеримые зоны ко-локализации СК в эндотелии и в стенках гладких мышц вокруг кровеносных сосудов. По мнению авторов, ко-локализация СК значительно меньше выражена в миокарде, что свидетельствует о том, что трансдифференцировка или слияние СК с кардиомиоцитами рецепи-

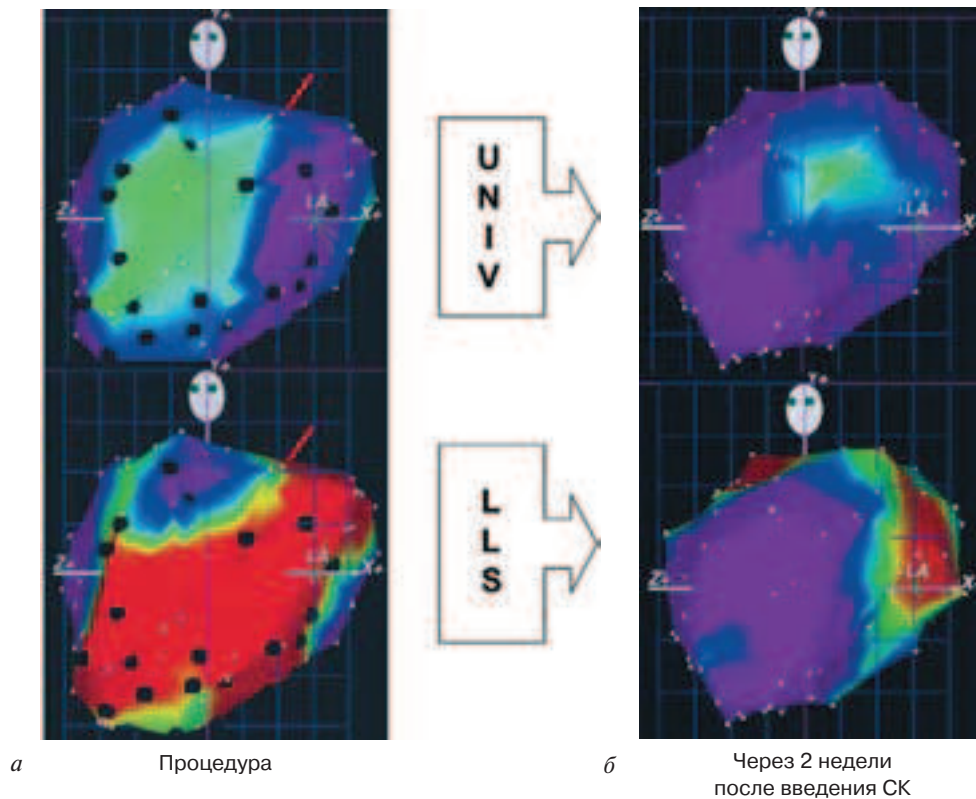


Рис. 1. NOGA™ электрические (UNIV,верху) и механические (LLS,внизу) карты*.

а – карты получены во время процедуры введения СК. Зеленый цветверху обозначает зону инфарцированного миокарда со сниженным электрическим сигналом, а красный цветвнизу – ухудшение механической функции сердца вследствие инфаркта; б – карты, полученные через 2 недели после введения СК, демонстрируют улучшение электрической и механической функций миокарда.

LLS – линейное локальное укорочение; UNIV – униполярный вольтаж.

* Perin E. C. Stem cell therapy for cardiovascular disease // Texas Heart Inst. J. – 2006. – Vol. 33, № 2. – P. 204–208. «Copyright 2006, The Texas Heart Institute». Reprinted by permission of the Texas Heart Institute Journal.

ента не являются главенствующими эффектами, хотя эти процессы в определенной степени могут иметь место.

В 2003 г. E. C. Perin и соавт. опубликовали результаты клинического исследования у нешунтабельных пациентов с ишемической кардиомиопатией: 14 таким пациентам проводилось прямое интрамиокардиальное транскатетерное введение аутологичных СК. Полученные результаты сравнивали с данными 7 пациентов из контрольной группы через 6 мес и 1 год после процедуры. В качестве примера на рисунке 2 при картировании показано улучшение электрической и механической функций сердца у пациента из исследуемой («леченной») группы с исходной ФВ ЛЖ 11%.

Использование стволовых клеток в клинической практике — основные результаты рандомизированных исследований

Одними из первых в клинической практике использовали скелетные миобласты, доказавшие в эксперименте свою эффективность. Аутологичные миобласты, выделенные при биопсии из скелетной мускулатуры бедра, вводили непосредственно в зону нежизнеспособного миокарда во время операций реваскуляризации миокарда больным, перенесшим ранее ИМ и имеющим ФВ ЛЖ менее 35%. Всего было «пролечено» 37 акинетичных сегментов, 60% которых через 10 мес после операции частично восстановили

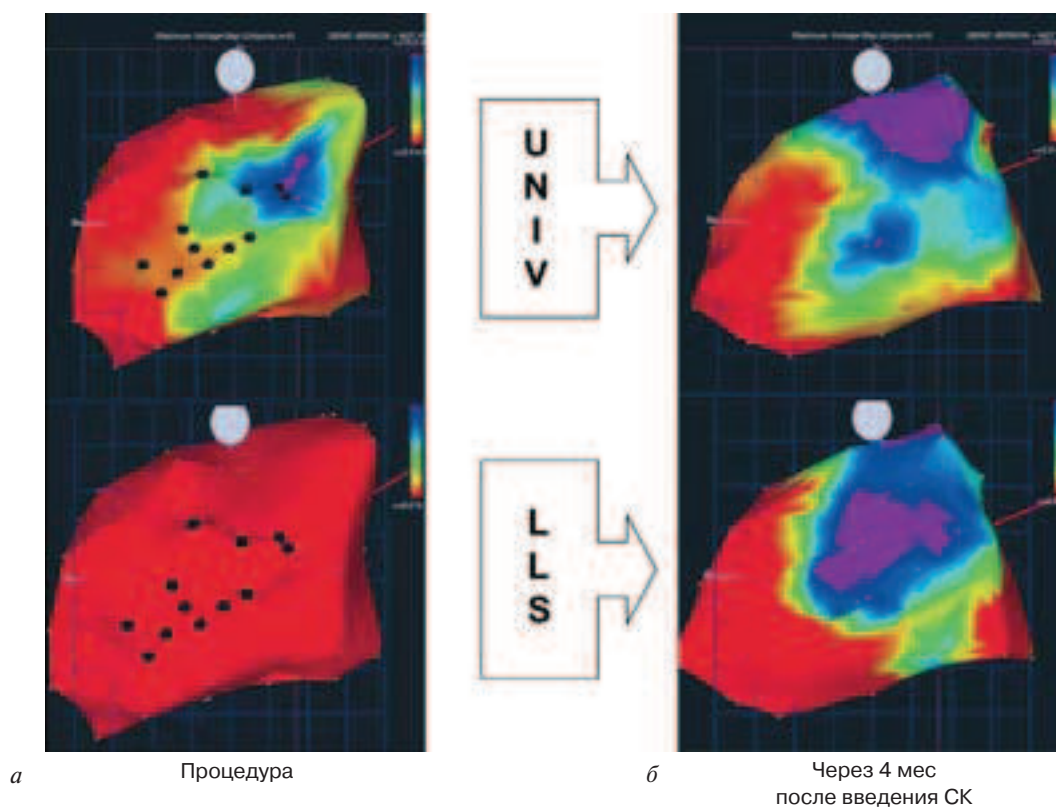


Рис. 2. NOGA™ электрические (UNIV,верху) и механические (LLS,внизу) карты*.

a — карты получены во время процедуры введения СК; *б* — карты, полученные через 4 мес после введения СК, демонстрируют улучшение электрической и механической функций. Вверху видна область жизнеспособного миокарда с нормальной электрической активностью.

LLS — линейное локальное укорочение; UNIV — униполярный вольтаж.

* Perin E. C. Stem cell therapy for cardiovascular disease // Texas Heart Inst. J. — 2006. — Vol. 33, № 2. — P. 204–208. «Copyright 2006, The Texas Heart Institute». Reprinted by permission of the Texas Heart Institute Journal.

свою контрактильность. У 4 больных развилась пароксизмальная желудочковая тахикардия, потребовавшая имплантации КВД. Возможно, причиной развития аритмий явился тот факт, что потенциал действия имплантированных скелетных миобластов отличался от окружающего миокарда, и эта электрическая гетерогенность предрасполагала к развитию аритмий. В настоящее время применение этой тактики ограничено группой пациентов, которым как минимум через 3 мес после введения клеток была выполнена операция имплантации КВД. Данный подход оказался многообещающим, приводил к уменьшению симптомов заболевания, признакам формирования жизнеспособного миокарда в зоне некроза. Вместе с тем

в силу высокой вероятности проаритмогенного эффекта с развитием жизнеугрожающих аритмий пациентам имплантировали кардиовертеры-дефибрилляторы. Одним из пионеров данного направления является профессор Ph. Menasche (Франция), курирующий исследование MAGIC (Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy).

Основными клиническими исследованиями, связанными с использованием прогениторных клеток костного мозга у больных ИБС, являются:

– при остром инфаркте миокарда – TOPCARE – AMI, ASTAMI, BOOST и REPAIR – AMI;

– при хронической сердечной недостаточности – TOPCARE – CHD (табл. 2).

Таблица 2

Рандомизированные исследования стволовых клеток костного (СКК) мозга в лечении больных ИБС (по Rosenzweig A., 2006, «Mixed results from mixed cells»)

Исследование (исследователь)	Клиническая ситуация	Дизайн	Результаты
BOOST (2004–2006 гг.)	ТЛБАП после острого ИМ	30 больных с введением СКК 30 больных без СКК Оценка ФВ ЛЖ по данным МРТ	6 мес – ФВ выше на 6% в группе с введением СКК 18 мес – отсутствие различий ФВ ЛЖ между группами
S. Janssens (2006 г.)	ТЛБАП после острого ИМ	Двойное слепое исследование 33 больных с введением СКК 34 больных с введением плацебо Оценка ФВ ЛЖ по данным МРТ	4 мес – отсутствие существенных различий в глобальной ФВ ЛЖ Уменьшение зоны инфаркта и улучшение регионарной функции в «леченной» группе
ASTAMI (2006 г.)	ТЛБАП после острого ИМ	47 больных с введением СКК 50 больных без инфузии Оценка ФВ по ЭхоКГ, МРТ, СПЕКТ	6 мес – отсутствие различий между группами по ФВ ЛЖ
REPAIR – AMI (2006 г.)	ТЛБАП после острого ИМ	Двойное слепое исследование 101 больной с введением СКК 98 больных с введением плацебо Оценка ФВ по данным левой вентрикулографии	4 мес – в «леченной» группе абсолютный прирост ФВ достоверно выше, чем в контрольной (5,5 и 3,0% соответственно) 1 год – снижение комбинированных «больших» клинических осложнений в «леченной» группе
TOPCARE – CHD (2006 г.)	Хроническая дисфункция ЛЖ	Перекрестное исследование, во 2-й фазе 24 больных – введение прогениторных клеток периферической крови 28 больных – введение СКК 23 больных – контрольная группа Оценка ФВ ЛЖ по данным левой вентрикулографии	3 мес – в группе с введением СКК прирост ФВ ЛЖ на 2,9% больше, чем в двух других группах

Примечание. ТЛБАП представляет собой «коронарную интервенцию» (ангиопластика и стентирование коронарной артерии). Количество вводимых СКК – от $2,5 \times 10^9$ до 7×10^7 ; отсутствие дозозависимого эффекта.

В исследованиях TOPCARE – AMI и BOOST первичные точки исследования касались изменения фракции выброса левого желудочка и его ремоделирования. В качестве методов диагностики использовали ультразвуковые методики, магнитно-резонансную томографию (МРТ), контрастную вентрикулографию. Более выраженные изменения касались первого показателя, хотя и его изменения носили относительно скромный характер (позитивные изменения сократительной способности левого желудочка достигали 6–9%).

Исследование TOPCARE – AMI (Assmus V. и соавт., 2006) предусматривало внутрикоронарное введение стволовых клеток костного мозга или периферической крови 20 больным с реперфузированным острым инфарктом миокарда через 4 дня после острого события, что впоследствии привело к повышению фракции выброса и снижению КДД в «леченной» группе (сроки наблюдения – от 4 мес до 1 года). Указанные изменения сопровождались улучшением резерва коронарного кровотока по инфарктзависимой артерии и жизнеспособного миокарда в инфарцированной зоне. Эти эффекты зависели от миграционной способности клеток.

Согласно данным наиболее крупного двойного слепого исследования REPAIR – AMI (Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodelling in Acute Myocardial Infarction; Schachinger V. и соавт., 2006), в котором участвовали 200 больных, отобранных в период 2004–2005 гг., в «леченной» группе прирост фракции выброса к 4-м мес был на 3% выше по сравнению с таковым в контрольной (5% в «леченной» группе, 2% – в контрольной, $p < 0,01$). В группу, в которой вводили клеточный материал, попадали больные с острым ИМ с подъемом сегмента ST, с успешно выполненной реперфузией и имплантацией стентов и остаточной регионарной дисфункцией ЛЖ (глобальная ФВ была меньше 45%). В качестве клеточного материала приме-

няли аспирированные клетки костного мозга, включающие гетерогенные популяции гематопозитических, мезенхимальных и других прогениторных клеток и мононуклеаров. Авторы использовали внутрикоронарное введение, при этом через 4 мес ФВ ЛЖ возросла до 53,8% в «леченной» группе против 49,9% в группе плацебо, причем этот эффект был выражен существенно при более низких исходных значениях ФВ ЛЖ. У пациентов с более сохранной ФВ прирост контрактальной функции был мало значимым. Кроме того, в группе «леченных» пациентов отмечена статистически значимая закономерность между восстановлением контрактальной функции левого желудочка и сроками инфузии клеточного материала после ранее выполненной ангиопластики и стентирования коронарных артерий: в данном случае наблюдалась прямая корреляция – эффект повышения ФВ ЛЖ был выявлен у больных, у которых клеточную инфузию проводили через 5 дней и более после реперфузии. Частота развития комбинированных «конечных точек» («больших осложнений» – смертей, инфарктов, повторных процедур реваскуляризации) была достоверно ниже в группе «леченных» пациентов.

В исследование ASTAMI (Lunde K. и соавт., 2006), проводившееся в Осло в 2003–2005 гг., вошли 100 больных в возрасте от 40 до 75 лет, переносящих острый инфаркт миокарда передней стенки ЛЖ с подъемом сегмента ST, по поводу чего им проводилась чрескожная баллонная ангиопластика и стентирование в первые 2–12 ч развития ИМ. 50 пациентам («леченная» группа) через несколько дней после этой процедуры (медиана составила 6 дней) в коронарную артерию вводили аутологичные мононуклеарные клетки костного мозга; 50 больных, которым выполнена ТЛБАП без введения клеточного пула, вошли в контрольную группу. Наличие кардиогенного шока, ранее перенесенные инфаркты миокарда, сопутствующая

патология являлись критериями исключения из настоящего исследования. В отличие от исследования REPAIR – AMI, в котором левый желудочек оценивался в основном по результатам левой вентрикулографии, в данном исследовании использовали МРТ, что позволяло более детально характеризовать ремоделирование миокарда. В исследовании ASTAMI (Autologous Stem Cell Transplantation in AMI) не было выявлено прироста фракции выброса в «леченной» группе по сравнению с таковой в контрольной. Возможно, причина различий в полученных результатах была связана с разницей в используемых клетках или способах их подготовки. Кроме того, остается неясным, что может быть более эффективным – «нефракционированные» мононуклеары костного мозга или же «фракционированные» CD34/CXCR4+/, способные, по данным литературы, влиять на репаративные процессы, уровень которых в общей циркуляции является предиктором дальнейших сердечно-сосудистых событий. Вместе с тем прогениторные клетки CD34+ составляют лишь 1–2% мононуклеарных клеток костного мозга и не совсем понятно, как при обширном ИМ, охватывающем около 30% площади миокарда (когда погибают около $1,7 \times 10^9$ кардиомиоцитов), указанные клеточные популяции могут кардинальным образом повлиять на «судьбу» миокарда в зоне поражения. К тому же известно, что после интракоронарного введения подавляющее большинство клеток погибает или мигрирует, а сама способность клеток костного мозга трансдифференцироваться в кардиомиоциты ставится под сомнение. На многие имеющиеся вопросы должны ответить будущие исследования, в частности проводимое в настоящее время исследование REGENT.

По аналогии с исследованием ASTAMI в исследование BOOST (Bone marrow transfer to enhance ST – elevation infarct regeneration; Wollert К. и соавт., 2004) вошли 60 больных, перенесших ИМ с подъемом сег-

мента ST и интракоронарное вмешательство (ангиопластика и стентирование, медиана – 8,5 ч с начала развития ИМ) и имеющих гипо- или акинезию с вовлечением более 2/3 переднесептальной, боковой или нижней стенки ЛЖ по данным контрастной вентрикулографии, выполненной непосредственно после коронарной интервенции. Из исследования были исключены больные с многососудистым поражением коронарного русла, отеком легких, кардиогенным шоком, выраженной почечной или печеночной недостаточностью, новообразованиями. Пациенты, получающие оптимальную медикаментозную терапию после коронарных вмешательств, были рандомизированы в две группы – контрольную (30 больных, которым выполнялась чрескожная баллонная ангиопластика и назначалась адекватная медикаментозная терапия) и «леченную» (30 больных, которым после проведения ЧБАП осуществляли внутрикоронарное введение аутологичных CD34+ клеток костного мозга). Время от коронарной интервенции до внутрикоронарного введения клеток составляло от 4 до 8 дней. Авторы отметили, что при введении клеточных массивов не было увеличения частоты рестенозов внутри стентов, что, к сожалению, описано при использовании гранулоцитарного колоний-стимулирующего фактора, мобилизующего мононуклеары из периферической крови (возможно, за счет аттракции нейтрофилов в зоне повреждения) [18]. Через 6 мес после выполнения указанных процедур ФВ ЛЖ возросла на 0,7% в контрольной группе и на 6,7% – в «леченной», различия оказались статистически достоверными. Указанные эффекты повышения контрактильной функции ЛЖ были отмечены в обследованных группах пациентов (с учетом разного возраста, наличия факторов риска, характера поражения коронарных артерий и исходной ФВ ЛЖ). Повышение контрактильной способности в «леченной» группе не зависело от числа введенных в коронарную артерию клеток (в том числе CD34+,

гематопозитических и других). Важно также отметить, что в отличие от пациентов контрольной группы у «леченных» пациентов наблюдалось увеличение регионарной ФВ и систолического движения стенки в зоне пограничной к участку повреждения, в области самого инфаркта подобные закономерности выявлены не были. Кроме того, как и в большинстве других исследований, авторы не обнаружили существенных побочных эффектов использования указанных технологий. Позже появились сообщения о долгосрочных результатах применения клеточных технологий у этих больных в сроки через 18 мес после предпринятых вмешательств.

По данным исследования BOOST II (Bone Marrow Transfer to Enhance ST Elevation Infarct Regeneration), эффект после введения стволовых клеток был недолгим: так, фракция выброса возрастала в «леченной» группе к 6 мес, но различия с контрольной группой практически нивелировались к 18 мес (Meuer G. P. и соавт., 2006). Таким образом, главный эффект указанной процедуры был связан с ускорением восстановления: однократное введение клеток костного мозга не обеспечивало стойкого длительного эффекта, но способствовало более быстрому восстановлению сократительной способности ЛЖ по сравнению с контрольной группой.

Следует отметить, что в упомянутых исследованиях трудно сопоставить идентичность используемого клеточного материала, вероятные неоонкогенные эффекты в отдаленном периоде, возможность ускорения развития атеросклеротической бляшки («трансплантация атеросклероза»), в том числе за счет ее неореваскуляризации. Остаются открытыми и вопросы разработки и соблюдения протоколов выделения, культивации и введения клеточного материала, а также контроля его безопасности.

Ни одно из исследований, посвященных использованию стволовых клеток при остром инфаркте миокарда, не обнаружило,

что интракоронарное введение прогениторных клеток костного мозга увеличивает риск аритмий, рестенозов, не были выявлены другие побочные эффекты терапии. Ни одно из рассматриваемых исследований не выявило преимуществ какой-то субпопуляции аутологичных прогениторных клеток, при этом большинство клинических исследований использовало цельные популяции моноклеарных клеток костного мозга и периферической крови (ранее в эксперименте была показана возможность восстановления миокарда при остром ИМ с подъемом сегмента *ST*).

Одним из наиболее крупных рандомизированных исследований клеточных технологий у больных с хронической сердечной недостаточностью является проспективное исследование, проводимое в Германии, – TOPCARE – CHD (Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Chronic Ischemic Heart Disease; Assmus B. и соавт., 2006). В исследование были включены 92 пациента в возрасте от 18 до 80 лет с ранее перенесенным документированным инфарктом миокарда (не менее 3 мес, в среднем около 6 лет назад), с ограниченной зоной дисфункции левого желудочка и определенной инфарктзависимой артерией, получающие оптимальную медикаментозную терапию. Принадлежность к IV функциональному классу по NYHA, наличие опухолей рассматривались как критерии исключения. Конечными точками являлись: изменение фракции выброса по данным ангиографии через 3 мес после клеточной инфузии; количественные параметры регионарной фракции выброса и регионарных объемов левого желудочка; функциональный статус пациента и свобода от развития «больших» осложнений – летальных исходов, инфаркта миокарда, инсульта, прогрессирования сердечной недостаточности. В качестве «лечебного» агента использовали прогениторные клетки костного мозга или периферической крови (выделение и культивирование

моноклеаров венозной крови в течение 3 дней). В качестве методов исследования использовали МРТ, контрастную левую венрикулографию, стресс-эхокардиографию, а также радиоизотопные методики — SPECT и PET. Основной вопрос, который стоял перед исследователями, заключался в следующем: способно ли введение прогениторных клеток в инфарктзависимую артерию по меньшей мере через 3 мес после перенесенного ИМ улучшить глобальную и регионарную функцию левого желудочка?

Основные результаты данного исследования сводились к следующему:

1. Фракция выброса левого желудочка существенно отличалась в трех группах — больные, которым вводили клетки костного мозга, имели существенно более выраженный прирост ФВ по сравнению с таковым у пациентов, у которых использовали моноклеары периферической крови ($p < 0,003$), и больных контрольной группы (без введения клеточного материала, $p < 0,001$). Так, при выполнении МРТ в первой группе ФВ выросла в среднем на 4,8%, во второй — на 2,8%, в контрольной группе ФВ не менялась.

2. Введение стволовых клеток костного мозга повышало контрактильность в эпицентре «зоны поражения» ЛЖ. Число гипоконтрактильных сегментов снизилось в этой группе в среднем с 10,1 до 8,7, число нормоконтрактильных сегментов соответственно увеличилось с 3,8 до 5,4 (все указанные изменения были статистически значимыми). При введении моноклеаров периферической крови существенных изменений зарегистрировано не было. Между тем определяемая по данным МРТ зона инфаркта (объем, нормализованный к массе миокарда) практически не менялась во всех обследованных группах. Единственным независимым предиктором восстановления ФВ ЛЖ по данным мультивариантного анализа были тип прогениторных клеток и исходный ударный объем левого желудочка.

3. Функциональное состояние (класс сердечной недостаточности) улучшилось у пациентов, которым вводили прогениторные клетки костного мозга, и оставалось практически неизменным в двух других группах больных. Указанные эффекты сохранялись по крайней мере в течение ближайших 6 мес после проведенной процедуры. Четкое объяснение перечисленных феноменов авторами не представлено, однако одна из возможных причин заключается в том, что прогениторные клетки костного мозга функционально восстанавливают сокращение левого желудочка, тогда как прогениторные клетки периферической крови стимулируют индуцируемую ишемией неоваскуляризацию (по аналогии с исследованием TOPCARE — AMI).

Что является общим для всех приведенных исследований? Прежде всего, авторы не предоставили убедительных доказательств того, что введенные в коронарную артерию гематопоэтические стволовые клетки интегрируются в миокард и дифференцируются в кардиомиоциты, то есть реально обеспечивают регенерацию поврежденного миокарда. Однако можно предположить, что, даже если трансдифференцировки стволовых клеток в кардиомиоциты и не происходит, они могут потенцировать продукцию цитокинов, улучшающих состояние миокарда. Другой вопрос — можно ли указанные процессы считать истинно репаративными? — остается открытым. Что же касается путей введения, — экспериментальные данные свидетельствуют о том, что «трансферные», то есть пересаженные, клетки в значительной степени элиминируются из сердца в течение первых 24–48 ч после коронарной инфузии. М. Hofmann и соавт. (2005 г.) использовали в качестве метки вводимых больным с острым ИМ стволовых клеток — нефракционированных клеток костного мозга и СД34+ 18 фтордезоксиглюкозу (18 FDG). Введение клеточного материала производили через 5–8 дней

после выполнения ангиопластики и стентирования коронарной артерии. Использование ПЭТ позволило изучить явления «хоуминга». Было обнаружено, что при внутривенном введении нефракционированных клеток костного мозга уровень накопления меченых клеток в сердце (вернее, их радиоактивность) не превышает фонового значения, а при интراكоронарном введении составляет от 1,3 до 2,6% от введенных клеток (максимум «свечения» приходится на печень, селезенку). При интراكоронарном введении CD34+ клеток их накопление в миокарде составило от 14 до 39%. Жизнеспособность введенных клеток в общем достигла 92–96%.

Клеточная и генная терапия при хронической ишемии нижних конечностей

На сегодняшний день лечение заболеваний периферических артерий остается ограниченным, несмотря на совершенствование применяемых хирургических и эндоваскулярных методик. Попытки прямой реваскуляризации у пациентов с выраженной хронической ишемией нижних конечностей могут оказаться не состоятельными в силу целого ряда причин: 1) поражение артерий нижних конечностей у большинства пациентов носит «многоэтажный» характер, поэтому изолированная коррекция проксимального сегмента недостаточна для получения наиболее эффективного результата лечения; 2) не существует адекватных кондуитов для реконструкции этих артерий; 3) данное заболевание является диффузным и прогрессирующим; 4) имеет место поражение мелких сосудов при наличии сахарного диабета или других сопутствующих заболеваний; 5) с увеличением возраста повышается риск хирургических вмешательств. Консервативные методы лечения также неэффективны.

Хроническая критическая ишемия нижних конечностей развивается приблизительно у 500–1000 человек на миллион

ежегодно (данные Second European Consensus Document, 1991). Это заболевание часто приводит к длительной нетрудоспособности взрослых пациентов, характеризуется повышенным уровнем заболеваемости и смертности, грозит ампутацией конечности. Таким образом, очевидно, что необходимы альтернативные методы лечения, позволяющие избежать ампутации и уменьшить тяжесть ишемии [19]. Такими методами представляются терапевтический ангиогенез и применение костно-мозговых стволовых клеток и/или предшественников эндотелиальных клеток. Проведенные зарубежными авторами исследования показали безопасность, но незначительную эффективность (или ее отсутствие) после внутриартериального введения факторов роста, стимулирующих ангиогенез, – VEGF, bFGF, рекомбинантного FGF-2 у таких пациентов на основании анализа отдаленных результатов лечения, что может быть обусловлено гемодинамической незначимостью развивающихся коллатералей [3, 12, 13, 21], в то время как результаты внутримышечного введения различных агентов терапевтического ангиогенеза, в том числе и клеток-предшественников эндотелиоцитов, напротив, оказались весьма обнадеживающими [13, 32]. Интересными являются результаты пилотного исследования с использованием внутримышечного введения фибринового матрикса или фибриновой пленки изолированно или в комбинации с VEGF у пациентов с критической ишемией нижних конечностей: отмечалось значительное снижение частоты ампутаций, заживление язв, уменьшение симптоматики и, как следствие, улучшение качества жизни пациентов; этот эффект сохранялся и через 3 года после такой терапии [19]. Для окончательной оценки эффективности применения фибриновой пленки при критической ишемии нижних конечностей авторы приступили к более крупному клиническому исследованию. В Китае были начаты пилотные

клинические исследования по использованию аутологичных гематopoэтических стволовых клеток костного мозга CD34+ для лечения больных с облитерирующим атеросклерозом сосудов нижних конечностей в далеко зашедшей стадии (с целью мобилизации этих клеток больные получали рекомбинантный колоний-стимулирующий фактор в течение 5 дней, а на 5-й день у них извлекали пул нужных клеток), клетки вводили в ишемизированные мышцы несколькими инъекциями; через 3 мес после такой терапии наблюдалось значительное улучшение перфузии конечностей и клиническое улучшение, побочных эффектов и осложнений не отмечено [11].

Новые направления в развитии и возможностях применения клеточных технологий

На сегодняшний день перспективным направлением клеточных технологий является *использование для трансплантации генетически модифицированных клеток*, активно экспрессирующих и синтезирующих различные факторы роста и цитокины, стимулирующие неоангиогенез и регенерацию миокарда. Эта технология объединяет в себе три наиболее высокотехнологичных направления регенеративной медицины, получивших активное развитие в последнее десятилетие – применение рекомбинантных факторов роста и цитокинов, генная и клеточная терапия. Если при применении факторов роста или генетических конструкций сложно регулировать их концентрации и продолжительность эффекта, а также прогнозировать системные реакции, то при трансплантации ген-модифицированных клеток можно регулировать выраженность и направленность терапевтического эффекта.

Весьма перспективным может оказаться направление, связанное с использованием *генерированной ткани миокарда для создания биогенерированных аутологичных мышечных аутографтов*. Например, у больных с аневризмой левого желудочка

при хирургической ее резекции использование заплаты из мышечной биогенерированной ткани позволило бы предотвратить дилатацию камер сердца. Тканевая инженерия в данном случае должна была бы включать получение и посев мышечных клеток на определенный субстрат (матрикс), генерирование ткани *in vitro* с последующей имплантацией заплаты в левый желудочек. В идеальной ситуации эта ткань должна взаимодействовать с тканью реципиента, а матрикс – рассасываться. Вновь созданный синтиций с интерстициальным матриксом становится сходным по своим характеристикам с миокардом. Понятно (и это показано в эксперименте), что такие биогенерированные графты имели бы существенные преимущества по сравнению с нерассасывающимися заплатами, которые не растут, не способны к самовосстановлению и являются потенциальным источником инфекции.

Значительным потенциалом обладают *фетальные, эмбриональные или неоперинатальные клетки*, клиническое использование которых ограничено прежде всего этическими и теологическими канонами. Так, 19 июня 2006 г. президент США Джордж Буш впервые за 6 лет своего правления воспользовался данным ему конституцией правом вето на решение конгресса. Законопроект, лоббируемый республиканцами, позволил бы значительно расширить исследования стволовых клеток в США. Планировалось, что федеральное финансирование будет направлено на развитие технологии культивирования эмбриональных клеточных линий, происходящих из эмбриональных яйцеклеток, предназначенных для экстракорпорального оплодотворения и не использованных по техническим причинам. В комментариях к своему решению Буш отметил, что стволовые клетки могут быть получены от пациентов любого возраста или из крови пупочного канатика без какого-либо вреда для самих пациентов, и данные исследования сейчас проводятся. Между тем, как отмечают не-

которые авторы, подобные технологии активно используются в исследовательских центрах целого ряда стран, в частности Сингапура, Китая, Швеции.

Чрезвычайно захватывающей является серия экспериментальных исследований, выполненная D. Fraidenraich с коллегами из Мемориального центра рака Sloan-Kettering и Медицинского колледжа Weill при Корнуэльском университете, с использованием мышинных эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) для внутриутробной коррекции врожденных пороков сердца (ВПС) у мышей. ВПС, описываемые авторами, весьма сложны и возникают вследствие отсутствия (потери) группы генов, известных как ИД (гены-ингибиторы дифференцировки). Подобный генетический дефект влияет на формирование (или закладку) развивающихся структур сердца, приводя к смерти мышей до их рождения. Работа этих авторов создает новый виток в направлении использования ЭСК: 1) дефекты развития сердца, описываемые авторами, возникают у мышей внутриутробно, в то время как большинство концепций применения ЭСК направлены на регенерацию поврежденного миокарда у взрослых, переживших инфаркт, 2) демонстрация того, что подобные ВПС могут быть скорректированы путем внедрения нормальных ЭСК в эмбрион вскоре после оплодотворения (и до формирования или закладки структур сердца), свидетельствует в пользу того, что вовсе не обязательно присутствие здоровых стволовых клеток в ткани сердца. *Исследователи показали, что внедрение нормальных стволовых клеток в организм матери может также успешно скорректировать повреждение сердца.* Это возможно потому, что нормальные стволовые клетки, внедренные в организм матери, продуцируют специфический гормон (называемый IGF-1), который, циркулируя к крови, попадает в развивающийся плод и может предотвращать многие (но не все, подчеркивают авторы) дефекты сердца. *Простое введение*

этого гормона само по себе (без стволовых клеток) приводит к аналогичному эффекту(!), подтверждая концепцию о том, что стволовые клетки действуют за счет его секреции. В данном исследовании также было выявлено участие еще одного гена — Wnt5a: его комбинация с гормоном IGF-1 приводила к полной коррекции ВПС.

Итак, терапия ЭСК может заключаться не только в их прямом применении с целью замещения поврежденной/больной ткани, но также в их использовании в качестве продуцентов гормонов или других веществ, способных предотвратить развитие заболевания или дефекта либо восстановить повреждение сразу после его возникновения. Таким образом, завесы биоинформационных загадок ЭСК только начинают приоткрываться, и совершенно очевидно, что исследования в этой области могут помочь нам в понимании сложных аспектов биологии, а также разработке и, возможно, внедрении простых, малотравматичных методов лечения различных труднокурабельных заболеваний (в том числе сердечно-сосудистых).

Совсем недавно, а именно 8 января 2007 г., в средствах массовой информации появилось сообщение об использовании *амниотической жидкости* беременных женщин, без нанесения вреда матери и плоду, в качестве потенциального источника для получения стволовых клеток. Научные исследования в этом направлении велись в лабораториях при Университете Wake Forest (Winston-Salem, North Carolina) под руководством доктора A. Atala и Гарвардском университете. Ученым потребовалось 7 лет кропотливой работы, чтобы доказать, что клетки, полученные из амниотической жидкости, действительно являются стволовыми клетками, способными продуцировать клетки различных тканей — мозга, печени, кости и сердца, и обладают, таким образом, потенциалом, близким к возможностям ЭСК. Исследователь из Швейцарии доктор S. Hoerstrup заявил, что он добился

превращения СК амниотической жидкости в клетки ткани сердца (эти данные пока не опубликованы в научных журналах). Одним из многообещающих аспектов этих исследований явилось то, что некоторые из ДНК амниотических СК содержали Y хромосомы, а значит, клетки принадлежат плоду, а не матери. Это открытие может стать прорывом в области исследования клеточных технологий, так как позволит преодолеть многие трудности, связанные с этическими проблемами, в частности с разрушением эмбриона для получения ЭСК. Однако в настоящее время все же неизвестно, действительно ли СК амниотической жидкости обладают потенциальными возможностями ЭСК. Такое мнение высказывают многие, в том числе доктор R. Lanza, главный исследователь компании Advanced Cell Technology, и доктор G. Daley из Гарвардского университета (в прошлом году G. Daley начал работу над клонированием человеческих эмбрионов с целью дальнейшего получения СК). Они считают, что СК амниотической жидкости не могут рассматриваться в качестве альтернативы человеческим ЭСК, отличительным и уникальным свойством которых является способность превращаться в более чем 220 типов клеток человеческого организма. Однако это является лишь началом в изучении возможностей СК амниотической жидкости, и мы будем с нетерпением ждать результатов научных поисков, ведущихся в данном направлении.

Что касается инноваций в области *способов доставки СК к тканям сердца*, то заслуживает внимания *торакоскопическая методика*, которая разрабатывается как в экспериментальных [36], так и в клинических исследованиях. В частности, R. В. Thompson и соавт. (2004 г.) в своем экспериментальном исследовании на свиньях показали возможность максимально эффективной доставки СК во все потенциально инфарктные зоны миокарда с помощью торакоскопического способа, благодаря четкой и точной визуализации

и расположению иглы для инъекции под острым углом к эпикарду. Однако наряду с преимуществами (возможностью осуществить максимальную доставку клеток к миокарду при минимальной травматичности) торакоскопическая методика может иметь ряд ограничений, связанных со сложностью оперативного доступа к некоторым участкам миокарда (в частности, к задней стенке ЛЖ, хотя R. В. Thompson и соавт. осуществили эффективную доставку клеток к задней стенке ЛЖ миокарда свиней) и с затруднениями введения клеток в миокард на работающем сердце (Бокерия Л. А., Махалдиани З. Б., 2006).

На заседании Международного общества по трансплантации сердца и легких, прошедшем в ноябре 2005 г., было доложено об успешном применении *эндоскопического способа для введения взрослых стволовых клеток в миокард пациентов, страдающих хронической сердечной недостаточностью*. Докладчиками выступили оперирующие хирурги, доктор Amit N. Patel, руководитель программы по использованию клеточных технологий в сердечно-сосудистой хирургии в Мак-Гоанском университете регенеративной медицины при Медицинском центре Университета Питтсбурга, получивший одобрение FDA для проведения подобных клинических исследований, и доктор Kitipan V. Arom, главный сердечно-сосудистый хирург Кардиохирургического центра в Бангкоке.

Кроме того, интересным явилось сообщение о *первом в мире применении робототехники для введения СК в миокард человека*. 27 октября 2005 г. в Кардиохирургическом центре Бангкока доктор Kitipan V. Arom и доктор Sujit Banyatpriyaphod ввели взрослые стволовые клетки человека (полученные и культивированные по специальной методике, разработанной коммерческой Американо-Израильско-Таиландской компанией VesCell™) в миокард пациента с ишемической кардиомиопатией с использованием хирургической робототехники da Vinci и миниинвазивной методики до-

ставки клеток (применявшейся ранее доктором Amit N. Patel из Университета Питтсбурга). При этом введение клеток в миокард пациента было выполнено через три отверстия между ребрами, с помощью двух рук робота и эндоскопа с крошечной камерой, избегая, таким образом, вскрытия грудной клетки. Все вышесказанное свидетельствует о прорыве в области миниинвазивных технологий доставки СК в пораженный миокард, что может стать потенциальной возможностью для пациентов, которым по многим причинам не может быть осуществлена прямая реваскуляризация миокарда или введение СК при открытых хирургических вмешательствах либо интервенционных процедурах. Безусловно, для окончательного утверждения безопасности и эффективности подобных высокотехнологических хирургических операций требуется прочная доказательная база, накопление опыта и совершенствование техники их выполнения.

Исследования генных и клеточных технологий в кардиологии и сердечно-сосудистой хирургии представляют весьма перспективное и широкое направление. Для успешной реализации программы, изучения разноплановых ее аспектов, с нашей точки зрения, разумным является создание исследовательской сети, в состав которой должны быть включены биологи, патанатомы, клиницисты, специалисты по методам визуализации. Совместные их усилия позволили бы:

- мониторировать текущие исследования;
- выявлять критерии отбора больных для различных интервенций;
- изучить критерии выбора типа клеток, их дозы и источников при разных нозологических формах (фундаментальные исследования);
- характеризовать популяции вводимых клеток (фундаментальные исследования);
- изучить влияние клеточной терапии на функциональное состояние и электрофизиологические свойства миокарда;

- разработать и создать адекватные экспериментальные модели.

Л и т е р а т у р а

1. Бокерия Л. А., Махалдиани З. Б., Сергеев А. В. и др. Современное состояние проблемы клеточной терапии сердечно-сосудистых заболеваний. Часть III. Торакоскопический способ доставки клеточных материалов в левый желудочек (экспериментальное исследование) // Бюллетень НЦССХ им. А. Н. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания». – 2006. – Т. 7, № 5. – С. 24–30.
2. Assmus B., Honold J., Schachinger V. et al. Transcatheter transplantation of progenitor cells after myocardial infarction // N. Engl. J. Med. – 2006. – Vol. 355. – P. 1222–1232.
3. Baumgartner I., Piczek A. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular Gene Transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia // Circulation. – 1995. – Vol. 91. – P. 2687–2692.
4. Brenner W., Aicher A., Eckey T. et al. ¹¹¹In-labeled CD34+ hematopoietic progenitor cells in a rat myocardial infarction model // J. Nucl. Med. – 2004. – Vol. 45, № 3. – P. 512–518.
5. Etzion S., Battler A., Barbash I. M. et al. Influence of embryonic cardiomyocyte transplantation on the progression of heart failure in a rat model of extensive myocardial infarction // J. Mol. Cell. Cardiol. – 2001. – Vol. 33. – P. 1321–1330.
6. Fazel Sh., Liwen Chen, Weisel R. D. et al. Cell transplantation preserves cardiac function after infarction by infarct stabilization: Augmentation by stem cell factor // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. – 2005. – Vol. 130, № 5. – P. 1310–1318.
7. Forrester J. S., Price M. J., Makkar R. R. Review: Current perspective. Stem cell repair of infarcted myocardium an overview for clinicians // Circulation. – 2003. – Vol. 108. – P. 1139–1145.
8. Fraidtenraich D., Stillwell E., Romero E. et al. Rescue of cardiac defects in id knockout embryos by injection of embryonic stem cells // Science. – 2004. – Vol. 306, № 5694. – P. 239–240.
9. Frangoni J. V., Hajjar R. J. In vivo tracking of stem cells for clinical trials in cardiovascular disease // Circulation. – 2004. – Vol. 110, № 21. – P. 3378–3384.
10. Hofmann M., Wollert K. C., Meyer G. P. et al. Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium // Ibid. – 2005. – Vol. 111. – P. 2198–2202.
11. Huang P. P., Zhu Sh. et al. Autologous transplantation of peripheral blood stem cells as an effective therapeutic approach for severe arteriosclerosis obliterations of lower extremities // Thromb. Haemost. – 2004. – Vol. 91. – P. 606–609.
12. Isner J., Baumgartner I. et al. Treatment of thromboangitis obliterans by intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor; preliminary

- clinical results // *J. Vasc. Surg.* — 1998. — Vol. 28. — P. 964–975.
13. *Isner J., Pieczek A.* et al. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischemic limb // *Lancet.* — 1996. — Vol. 348. — P. 370–440.
 14. *Itrich H., Lange C., Dahnke H.* et al. Labeling of mesenchymal stem cells with different superparamagnetic particles of iron oxide and detectability with MRI at 3T // *Rofo.* — 2005. — Vol. 177, № 8. — P. 1151–1163.
 15. *Iwaguro H., Yamaguchi J., Kalka C.* et al. Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration // *Circulation.* — 2002. — Vol. 105. — P. 732–738.
 16. *Jain M., DerSimonian H., Brenner D. A.* et al. Cell therapy attenuates deleterious ventricular remodeling and improves cardiac performance after myocardial infarction // *Ibid.* — 2001. — Vol. 103, № 14. — P. 1920–1927.
 17. *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, randomized controlled trial // *Lancet.* — 2006. — Vol. 367. — P. 113–121.
 18. *Kang H. J., Kim H. S., Zhang S. Y.* et al. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem cells mobilized with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomized clinical trial // *Ibid.* — 2004. — Vol. 363. — P. 751–756.
 19. *Kipshidze N., Kipiani K., Beridze N.* et al. Therapeutic angiogenesis with modified fibrin meshwork for patients with critical limb ischemia // *Angiogenesis Bench to Bedside / Eds J. Vossoughi, N. Kipshidze, J. Moses, J. Karanian.* — Printed in Korea: Medical and Engineering Publishers, Inc., 2003. — Ch. 5. — P. 101–119.
 20. *Kocher A. A., Schuster M. D., Szabo M. J.* et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function // *Nat. Med.* — 2001. — Vol. 7. — P. 430–436.
 21. *Lederman R. F., Mendelson R.* et al. Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC STUDY): a randomized trial // *Lancet.* — 2002. — Vol. 359. — P. 2053–2058.
 22. *Li R. K., Welsel R. D., Mickle D. A.* et al. Autologous porcine heart cell transplantation improved heart function after a myocardial infarction // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* — 2000. — Vol. 119. — P. 62–68.
 23. *Lunde K., Solheim S., Aakhus S.* et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction // *N. Engl. J. Med.* — 2006. — Vol. 355. — P. 1199–1209.
 24. *Menasche Ph., Hagege A. A., Scorsin M.* et al. Myoblast transplantation for heart failure // *Lancet.* — 2001. — Vol. 357, № 9252. — P. 279–280.
 25. *Meyer G. P., Wollert K. C., Lotz J.* et al. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (Bone Marrow Transfer to Enhance St-elevation infarct regeneration) trial // *Circulation.* — 2006. — Vol. 113. — P. 1287–1294.
 26. *Perin E. C.* Stem cell therapy for cardiovascular disease // *Texas Heart Inst. J.* — 2006. — Vol. 33, № 2. — P. 204–208.
 27. *Perin E. C., Dohmann H. F. R., Boroevic R.* et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure // *Circulation.* — 2003. — Vol. 107. — P. 2294–2302.
 28. *Rosenzweig A.* Cardiac cell therapy-mixed results from mixed cells // *N. Engl. J. Med.* — 2006. — Vol. 355, № 12. — P. 1274–1277.
 29. *Schachinger V., Assmus B., Britten M. B.* et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial // *J. Amer. Coll. Cardiol.* — 2004. — Vol. 44. — P. 1690–1699.
 30. *Schachinger V., Erbs S., Elsasser A.* et al. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction // *N. Engl. J. Med.* — 2006. — Vol. 355. — P. 1210–1221.
 31. *Shintani S., Murohara T., Ikeda H.* et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction // *Circulation.* — 2001. — Vol. 103. — P. 2776–2779.
 32. *Tateishi-Yukama E., Matsubara H.* et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomized controlled trial // *Lancet.* — 2002. — Vol. 360. — P. 427–435.
 33. *Taylor D. A.* Cellular cardiomyoplasty with autologous skeletal myoblasts for ischemic heart disease and heart failure (Commentary) // *Curr. Control. Trials Cardiovasc. Med.* — 2001. — Vol. 2, № 5. — P. 1468–1472.
 34. *Taylor D. A., Atkins B. Z.* et al. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation // *Nat. Med.* — 1998. — Vol. 4. — P. 929–933.
 35. *Terada N., Hamazaki T., Oka M.* et al. Bone marrow cells adopt phenotype of other cells by spontaneous cell fusion // *Nature.* — 2002. — Vol. 416. — P. 542–545.
 36. *Thompson R. B., Parsa C. J., Van den Bos E.* et al. Video-assisted thoracoscopic transplantation of myoblasts into the heart // *Ann. Thorac. Surg.* — 2004. — Vol. 78. — P. 303–307.
 37. *Wollert K. C., Meyer G. P., Lotz J.* et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomized controlled clinical trial // *Lancet.* — 2004. — Vol. 364. — P. 141–148.

Поступила 22.02.2007