© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2009

УДК 575+616.12-089.843-77+576.3

ГЕНЫ, СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПЕЙСМЕЙКЕРЫ

Л. А. Бокерия, О. Л. Бокерия, А. Х. Меликулов, А. В. Сергеев, В. А. Горячев, Д. А. Маглакелидзе, Т. Г. Ле*

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

Современные научные разработки позволяют выполнить реваскуляризацию миокарда, генерацию новых миоцитов, а также придать клеткам новые функциональные возможности. В основе большей части разработанных методик лежит генная и/или клеточная терапия. Среди них есть методики вставки генетического материала вместо нефункционирующих генов (например при муковисцидозе [35]), создания новых сосудов с помощью сосудистого эндотелиального фактора роста [39], имплантации клеток для замещения функций поврежденных кардиомиоцитов [40]. Данные концепции были встречены в научном мире с большой надеждой. Предполагают, что новые методики помогут и в борьбе с нарушениями ритма сердца.

В настоящее время существует мало данных о применении генной и/или клеточной терапии для лечения и профилактики аритмий. Важным вкладом в реализацию концепции генной и клеточной антиаритмической терапии является создание генераторов сердечных импульсов – биологических пейсмейкеров.

Существуют две причины, по которым необходимо создание биологических пейсмейкеров: 1) желание улучшить электронные пейсмейкеры, применяющиеся при лечении многих аритмий; 2) возможность использования данных концепций для создания других методик генной и клеточной антиаритмической терапии.

В данном обзоре будет сформулировано определение понятия «биологический пейсмейкер», дан ответ на вопрос, зачем необходимо создавать биологический пейсмейкер, и рассмотрены способы его применения и пути дальнейшего развития.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОНЯТИЯ «БИОЛОГИЧЕСКИЙ ПЕЙСМЕЙКЕР»

Синоатриальный узел является биологическим пейсмейкером первого порядка и образцом для любого биологического пейсмейкера, создаваемого различными способами. В мембране клеток синусного узла и в других пейсмейкерных тканях проводящей системы сердца и миокарда представлены все каналы и переносчики ионных токов, необходимые для генерации импульса. Синусный узел обладает следующими характеристиками: 1) это высокоспециализированная ткань, которая отлично интегрирована электрически и структурно в миокард и способна к генерации импульсов; 2) генерация импульса происходит в фазу медленной диастолической деполяризации (4-я фаза потенциала действия), которая определяется взаимодействием ионных каналов и переносчиков; 3) генерация импульсов происходит практически регулярно, в то время как частота может изменяться в зависимости от физиологического и эмоционального состояния человека; 4) на ритм и частоту влияют симпатическая и парасимпатическая нервные системы; 5) проведение импульса приводит к максимально эффективному сокращению миокарда и сердечному выбросу.

В синусном узле 4-я фаза потенциала действия осуществляется за счет активирующего входящего тока I_f, который длится от 100 мс до нескольких секунд [4, 5]. Однако другие входящие и выходящие токи также способствуют генерации потенциала действия.

Входящие токи образуются за счет кальциевых каналов L- и T-типа [1, 13] и тетродотоксин-чувствительных натриевых каналов [12]. Исходящие токи образуются за счет Na/K насоса [28] и каналов I_k, ответственных за позднюю реполяризацию [30]. Натриево-кальцевый обменник может работать во входящем и выходящем направлениях [19]. Основываясь на функциях данных каналов, можно предположить, что любые методы, позволяющие увеличить входящий ток и/или снизить исходящий, должны приводить к увеличению частоты генерации импульсов и, следовательно, частоты сердечных сокращений.

*Адрес для переписки: e-mail: leoan@online.ru

Важным является тот факт, что синоатриальный узел – не единственный в своем роде биологический пейсмейкер в сердце человека. Другие ткани, включая миокард предсердий, атриовентрикулярный узел, систему Гиса–Пуркинье и даже миокард желудочков, могут проявлять пейсмейкерный потенциал в экспериментальных и клинических условиях. Такую пейсмейкерную функцию можно наблюдать при атриовентрикулярном замещающем и идиовентрикулярном ритмах, возникающих при атриовентрикулярных блокадах высоких степеней. Частота генерации импульсов уменьшается при удалении от синусного узла [44]. Этот механизм позволяет поддерживать сердечный выброс в жизнеугрожающих ситуациях.

Основная причина замедления ритма при удалении от синусного узла заключается в наличии калиевого тока I_{k1}, который практически отсутствует в синусном узле [29]. Ток I_{k1} является входящим выпрямляющим током, который наиболее интенсивно происходит в диастолу. В качестве выходящего тока он противостоит деполяризующему влиянию тока I_f. Вследствие того, что ток I_{k1} представлен в кардиомиоцитах желудочков больше, чем в системе Гиса–Пуркинье, и ток I_f в системе Гиса–Пуркинье возникает при более высоких значениях мембранного потенциала, чем в миокарде [45], в системе Гиса–Пуркинье созданы наиболее предпочтительные условия для возникновения выскальзывающего ритма. При уменьшении тока I_{k1} возможно увеличение желудочковой пейсмейкерной активности и возникновение идиовентрикулярного ритма [24].

ПОТРЕБНОСТЬ В УСТРОЙСТВАХ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НАРУШЕНИЙ РИТМА СЕРДЦА

Еще в середине XX в. многие пациенты, имеющие полную поперечную блокаду сердца, могли внезапно умереть [27, 47]. Принципы терапии данной патологии у взрослых заключались в назначении лекарств с положительным инотропным эффектом (обычно сублингвально назначали изопротеренол каждые 2 ч). Первые имплантируемые водители ритма осуществляли стимуляцию с фиксированной частотой и имели большие размеры, однако они спасали жизни. Улучшение дизайна и повышение качества производимых аппаратов, использование новейших компьютерных технологий для обеспечения программируемости пейсмейкеров позволили применять эпикардиальную и эндокардиальную стимуляцию при различных нарушениях ритма [47].

Создание кардиовертеров-дефибрилляторов и их внедрение в промышленное производство стало отражением дальнейшего развития технологий [48]. Таким образом, устройства и методики, которые использовали для лечения ограниченного спектра нарушений ритма сердца, привели к развитию индустрии медицинских приборов и к появлению одного из наиболее эффективных и успешных методов паллиативной терапии в двадцатом веке.

ПРИЧИНЫ, ПО КОТОРЫМ ЭЛЕКТРОННЫЙ ВОДИТЕЛЬ РИТМА МОЖНО ЗАМЕНИТЬ БИОЛОГИЧЕСКИМ ПЕЙСМЕЙКЕРОМ

Несмотря на высокую эффективность электронных водителей ритма при лечении пациентов с полной поперечной блокадой сердца и дисфункцией синусного узла, данный метод терапии имеет ряд ограничений.

1. У электронных водителей ритма имеются ограничения применения в условиях, когда пациент подвергается физической нагрузке. На сегодняшний день замены автономной нервной системе не существует.

2. В педиатрии рост и масса тела пациента, размер батареи ЭКС, а также диаметр и длина электродов имеют огромное значение. Все эти факторы необходимо учитывать.

3. Место установки электрода в желудочке и дальнейший путь активации миокарда могут оказывать положительный или негативный эффекты на электрофизиологические свойства и сократительную функцию миокарда. Несмотря на то что имеются доступы к эпикарду и эндокарду, для имплантации электрода необходимо найти место, на котором электрод оставался бы стабильно фиксированным и имел бы хорошие электрофизиологические параметры.

4. Батарея ЭКС имеет ограниченный срок действия. Ее необходимо время от времени тестировать и заменять.

5. Интеркуррентные инфекции могут приводить к инфицированию системы кардиостимуляции и к необходимости имплантации нового водителя ритма.

6. Различные приборы, включая нейрональные стимуляторы [10], металлодетекторы и магниты, находящиеся в МРТ-томографах [22], а также линии электропередач влияют на функции электронного водителя ритма.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ИДЕАЛЬНОГО БИОЛОГИЧЕСКОГО ПЕЙСМЕЙКЕРА

1. Создает стабильный физиологичный ритм в течение жизни пациента.

2. Работает без батареи, не требует имплантации электродов.

3. Эффективно конкурирует при прямом сравнении с электронным пейсмейкером.

4. Нет риска развития воспаления/инфекции.

5. Нет риска развития неоплазии.

6. Адаптируется к изменениям физической активности и/или эмоционального состояния путем быстрых соответствующих изменений частоты генерации импульсов.

7. Распространяет волну возбуждения по оптимальному пути для создания максимальной эффективности сокращений и сердечного выброса.

8. Имеет ограниченный аритмогенный потенциал или вовсе не обладает им.

9. Является методом лечения, а не паллиативной помощью.

Для того чтобы пейсмейкер отвечал физиологическим потребностям организма, он должен не только генерировать стабильный ритм сердечных сокращений, но и отвечать на регуляцию со стороны автономной нервной системы. С помощью генной терапии можно будет получить миоциты, которые через адренергические и мускариновые рецепторы будут реагировать изменением частоты генерации импульсов. При применении клеточных технологий экспрессия рецепторов и соединение трансплантированных клеток с другими клетками могут представлять определенные проблемы, решение которых зависит от генного состава клеток и сигнальных каскадов внутри них.

В зависимости от конкретной патологии сердца, возможно, будет различаться оптимальное место генерации импульсов. У молодых пациентов, имеющих блокаду сердца, а в остальном – здоровых людей, активация системы Гиса–Пуркинье представляется наиболее оптимальной. Напротив, при наличии интенсивного атеросклероза, перенесенных инфарктов миокарда или фиброза в сочетании с кардиомиопатией у пациентов пожилого возраста требуется индивидуальный подход.

Дополнительным преимуществом выявления идеального пути активации для каждого отдельного пациента является снижение аритмогенности. Иными словами, при стимуляции выбранного участка можно выявить аритмии и обнаружить наиболее подходящие области миокарда для имплантации пейсмейкера пациентам, имеющим аритмогенный субстрат.

Другой способ снижения аритмогенности заключается в создании биологического пейсмейкера, который не удлиняет и не укорачивает длительность потенциала действия, а также не увеличивает трансмуральную дисперсию реполяризации. В практическом плане это означает создание пейсмейкера путем изменения диастолических мембранных ионных токов без изменений мембранных ионных токов, отвечающих за реполяризацию. Ионный ток I_f отвечает данному требованию [4, 5].

СУЩЕСТВУЮЩИЕ НАПРАВЛЕНИЯ СОЗДАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПЕЙСМЕЙКЕРА

Для создания биологического пейсмейкера можно выделить три основные направления: 1) увеличение нейрогормонального влияния на ритм сердца (в основном через β-адренорецепторы) [8, 9]; 2) уменьшение реполяризующего тока [24]; 3) увеличение входящего диастолического тока [33]. Все три направления берут свое начало в фармакологии и физиологии XX в. При исследовании модуляции со стороны автономной нервной системы было установлено, что воздействие катехоламинов на β-адренорецепторы или симпатическая стимуляция увеличивали частоту сердечных сокращений за счет увеличения пейсмейкерного ионного тока в синусном узле [7], в то время как повышение влияний со стороны блуждающего нерва или стимуляция мускариновых рецепторов приводили к снижению частоты сердечных сокращений [2]. В исследованиях ионных детерминант пейсмейкерной активности было продемонстрировано, что усиление гиперполяризации исходящих ионных токов приводило к снижению частоты генерации импульсов [6]. Поэтому было высказано предположение, что уменьшение гиперполяризации и исходящих ионных токов приведет к увеличению частоты генерации импульсов [24]. В других фармакологических экспериментах показано, что подавление входящего тока I_f [18] или кальциевых токов через каналы T- и L-типа [36] замедляет частоту генерации импульсов.

В связи с тем, что теоретическая основа для создания биологического пейсмейкера была разработана благодаря фармакологическим экспериментам XX в., для воплощения молекулярных/генетических гипотез создания биологического пейсмейкера были необходимы только инструменты, которыми являются генные и клеточные технологии. Необходимая информация получена отчасти путем идентификации и клонирования продуктов генов, кодирующих β-адренорецепторы, прямой выпрямляющий ионный ток и сам пейсмейкерный ток I_f. Кроме того, важным этапом стало развитие генной терапии (при которой гены, кодирующие интересующие молекулярные субъединицы, встраиваются через плазмиды или вирусные векторы в кардиомиоциты) и клеточной терапии (при которой дифференцировка эмбриональных стволовых клеток направляется в сторону клеток с пейсмейкерной активностью или при которой мезенхимальные стволовые клетки используются в качестве платформы для имплантации необходимых ионных каналов).

Важным вкладом в изучаемую проблему явилось создание моделей для тестирования пейсмей-

керных конструкций. Клеточные культуры являются стандартом для тестирования различных методик генной терапии *in vitro*. Обнаружено, что инфицирование неонатальных миоцитов желудочков крысы аденовирусными конструкциями с дефицитом репликации позволяет перенести в клетку интересующие гены (с экспрессией или без экспрессии зеленого флуоресцирующего белка) [34]. С целью исследования способности стволовых клеток передавать электрический сигнал были использованы различные вариации данной модели [9, 24, 31–33].

ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ

Увеличение экспрессии β-адренорецепторов

При проведении данных экспериментов генно-инженерную конструкцию с геном, кодирующим β_2-адренорецепторы, вводили в предсердия свиней [8, 9]. Через 48 ч фиксировали частоту сокращений предсердий в ответ на стимуляцию β-адренорецепторов. Частота была статистически значимо выше, чем у контрольных животных. Данные эксперименты показали, что биологический пейсмейкер является не только концепцией, а возможной реальностью. Однако необходимо отметить следующие ограничения полученных результатов: 1) эффект был непродолжителен (всего 24 ч); 2) не проверялась способность такого пейсмейкера эффективно генерировать импульсы при синоатриальном или атриовентрикулярном блоке; 3) не ясно, не приведет ли повышенная экспрессия β-адренорецепторов при наличии дисфункции синусного узла к ухудшению заболевания.

Снижение входящего гиперполяризующего ионного тока

Уменьшение интенсивности гиперполяризующих ионных токов, фиксирующих миокардиальный мембранный потенциал на отрицательных значениях, позволит входящим ионным токам деполяризовать мембрану и вызвать пейсмейкерный потенциал [23, 24]. Данную гипотезу подтвердили эксперименты с *Kir2.1,* геном, кодирующим одну из α-субъединиц канала, переносящего входящий выпрямляющий ток I_{k1} [24]. Была создана доминантная негативная конструкция путем замещения трех аминокислотных остатков в поре гена *Kir2.1.* Данная конструкция и зеленый флуоресцирующий белок были упакованы в аденовирусный генный вектор и введены в полость ЛЖ морских свинок. Через 3–4 дня была выявлена 80% супрессия I_{k1}, а также по данным ЭКГ был зафиксирован идиовентрикулярный ритм у животных, которым вводили вектор. Более того, записи потенциала действия миоцитов, взятых из этих сердец, показали 4-ю фазу деполяризации и быстрый автоматический ритм (рис. 1).

Результаты данного эксперимента требуют уточнения:

1. Ток I_{k1} был подавлен в различных местах на протяжении всего желудочка, что могло привести к возникновению конкурентных идиовентрикулярных фокусов. Фокальное введение конструкции, вероятно, позволит этого избежать.

2. Уменьшение реполяризующего тока подобным образом приводит к пролонгированию реполяризации приблизительно на 15% [23]; это может привести к увеличению проаритмогенного потенциала вследствие повышения дисперсии реполяризации и/или наличия ранней постдеполяризации.

3. Не ясно, будут ли несколько входящих ионных токов способствовать генерации импульсов при сниженном I_{k1} токе. В результате может образоваться регионарная вариабельность входящих токов и могут возникнуть ритмы с непредсказуемым поведением [25, 26, 38].

Повышенная экспрессия деполяризующего тока

Ряд авторов считают, что можно создать биологический пейсмейкер, воздействуя на ток I_f [21, 37]. Исследователи высказывают следующие аргументы: 1) это единственный ионный ток, возникающий только в диастолу, и, таким образом, не влияющий на длительность потенциала действия; 2) он хорошо регулируется автономной нервной системой. На сегодняшний день идентифицированы и клонированы продукты семейства генов *HCN* (активируемые гиперполяризацией ионные каналы, в воротах которых находятся циклические нуклеотиды), определяющие первичный пейсмейкерный ток I_f.

Выделяют 4 изоформы *HCN*, и три из них представлены в сердце (1, 2 и 4). Все они активируются во время реполяризации и напрямую связывают цАМФ на С-конце. Связывание с цАМФ сдвигает активацию к положительным значениям мембранного потенциала, что приводит к эффективному увеличению входящего ионного тока при данном значении мембранного потенциала [16]. Между тремя изоформами существует лишь незначительная разница в активационном потенциале [16]. Поэтому выбор гена *HCN* в качестве биологического пейсмейкера основывался на чувствительности к цАМФ и кинетике канала. Активация канала *HNC1* представлена быстрой кинетикой, однако связывание с цАМФ практически не влияет на нее. Поэтому данный канал не был выбран. *HCN2* и *HCN4* отвечают на цАМФ, однако *HCN2* имеет более быструю кинетику, чем

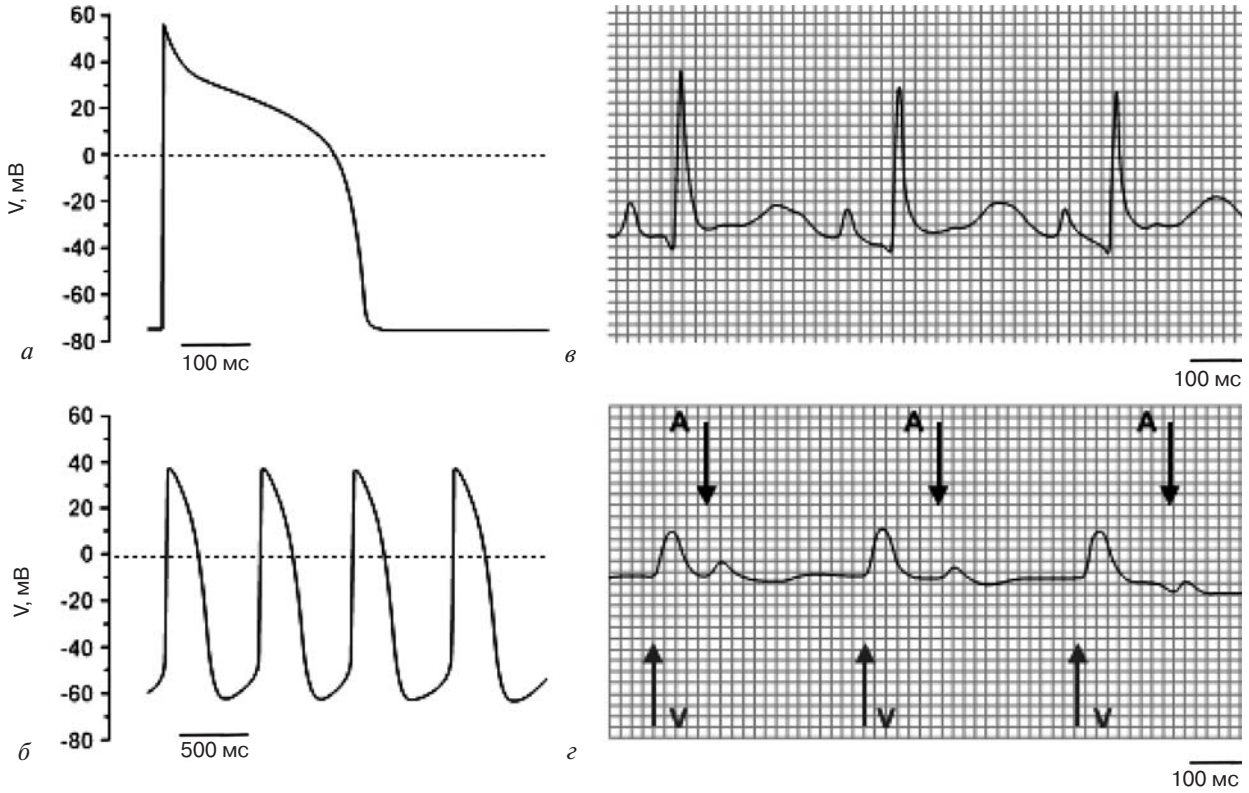

Рис. 1. Выявление пейсмейкерной функции миоцитов желудочков морской свинки и запись ЭКГ при супрессии каналов *Kir2.1*:

а – контрольный потенциал действия миоцита желудочка, вызванный деполяризующими внешними стимулами, зафиксированный у морской свинки, которой не вводили векторную конструкцию; *б* – спонтанный потенциал действия *Kir2.1AAA*-трансдуцированных миоцитов с супрессированным I_{k1}; *в* – исходная ЭКГ контрольных животных с нормальным синусовым ритмом; *г* – вентрикулярный ритм через 72 ч после трансдукции *Kir2.1AAA*. *P*-волны (А, стрелка) и широкие комплексы *QRS* (V, стрелка) отделены друг от друга [24]

HCN4 [16]. Поэтому изоформа *HCN2* была выбрана для первоначальных исследований.

Для проведения исследований по доказательству концепции предположили, что повышенная экспрессия *HCN2* в миоцитах может вызвать образование ионного тока, подобного пейсмейкерному току I_f, способного инициировать сердечное сокращение. Первоначально концепцию подтвердили в экспериментах на клеточной культуре, в которой миоциты крысы инкубировали совместно с аденовирусной конструкцией, содержащей изоформу *HCN2* [25]. В этих миоцитах обнаружен ток I_{HCN2} (аналогичный току I_f), который превышает по величине ток I_f в миоцитах дикого типа в 100 раз. Инфицированные миоциты в культурах сокращались значительно быстрее, чем в контрольном образце, отвечали на положительный инотропный эффект изопротеренола и отрицательный хронотропный эффект карбамилхолина.

Затем данный эксперимент выполнили на сердцах интактных собак. Животным вводили аденовирус, содержащий *HCN2* и зеленый флуоресцирующий белок, в левое предсердие. Контрольные животные получали аденовирусный комплекс только с зеленым флуоресцирующим белком [8]. Через 4 дня животным проводили анестезию и проводили стимуляцию правого блуждающего нерва для подавления синусового ритма. У животных, которым вводили *HCN2,* фиксировали предсердные сокращения, источником которых были импульсы из места, находившегося рядом с местом введения аденовирусной конструкции. Этого не происходило у контрольных животных. Более того, в миоцитах, полученных из мест введения конструкции, регистрировали ток I_{HCN2}, превышающий по величине нативный ток I_f в 100 раз.

Для того чтобы протестировать способность такого пейсмейкера генерировать импульсы при наличии преходящей сердечной блокады, другим животным с помощью катетерных методик в левую ножку пучка Гиса ввели аденовирусную конструкцию, содержащую *HCN2* и зеленый флуоресцирующий белок [31]. Недостатком данного метода введения было то, что сама катетерная инъекция (в течение первых 48 ч после инъекции) приводила к образованию экхимозов и возникновению желудочковых эктопических ритмов из области, расположенной рядом с местом введения, независимо от того, вводили ли *HCN2*+зеленый флуоресцирующий белок, только зеленый флуоресцирующий бе-

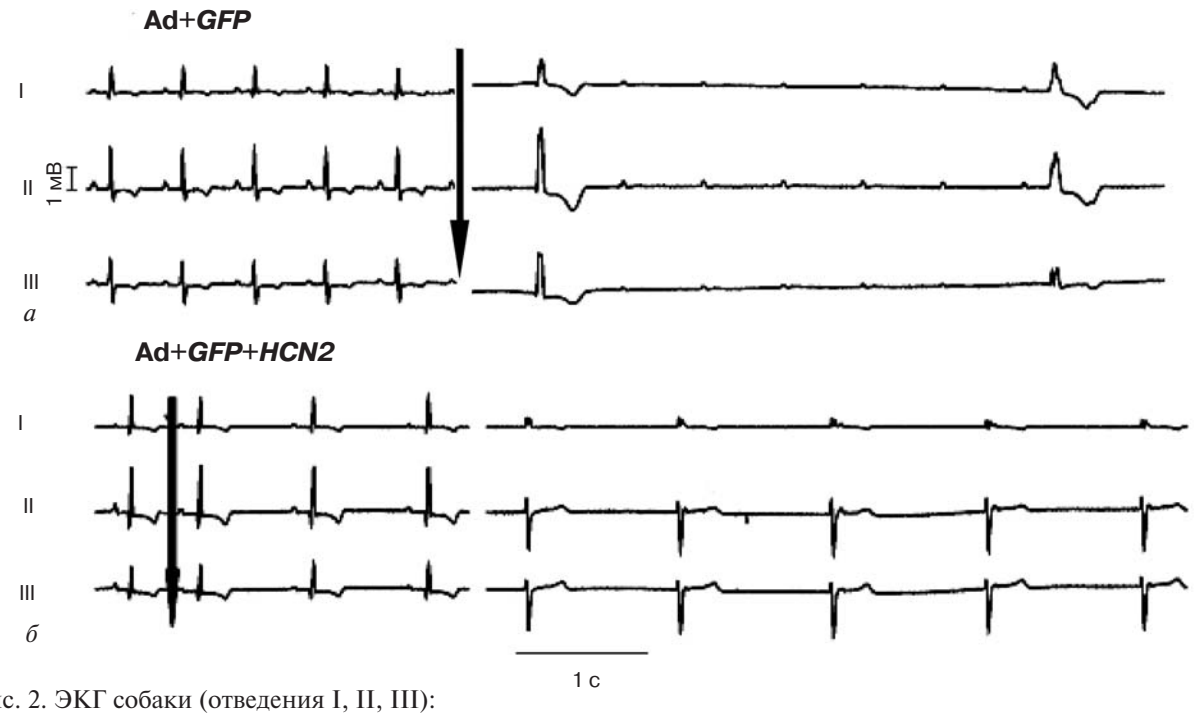

Рис. 2. ЭКГ собаки (отведения I, II, III):

а – через 4 дня после введения аденовируса, содержащего только зеленый флуоресцирующий белок. Синусовый ритм, прерванный вагальной стимуляцией (стрелка), за которым следует очень медленный идиовентрикулярный ритм; *б* – через 4 дня после введения аденовируса, содержащего *HCN2*+зеленый флуоресцирующий белок. За вагальной стимуляцией (стрелка) следует медленный синусовый ритм, остановка синусного узла и идиовентрикулярный ритм, частота которого больше, чем при введении только зеленого флуоресцирующего белка [31]

лок или физиологический раствор. Через 48 ч подобные аритмии проходили. Затем для индукции атриовентрикулярного блока проводили стимуляцию блуждающего нерва. У животных, которым вводили конструкцию, развивался стабильный идиовентрикулярный выскальзывающий ритм (частота сердечных сокращений приблизительно 60 уд/мин), источник которого находился рядом с местом введения *HCN2* (рис. 2). Этот ритм был значительно чаще, чем у контрольных животных. У последних формирование импульсов происходило как в левой, так и в правой ножке пучка Гиса. В изолированных ветвях пучка Гиса выявлена большая автоматическая генерация импульсов, чем у контрольных животных и у животных, которым вводили только зеленый флуоресцирующий белок. Наконец, с помощью иммуногистохимических и биофизических методов была показана повышенная экспрессия *HCN2* [31].

В рамках данной концепции возникают следующие вопросы:

1. Существует ли возможность устранения интервалов отсутствия ритма продолжительностью 5–30 с после остановки синусного узла до возникновения идиовентрикулярного ритма?

2. Какова продолжительность активности использованных конструкций?

При подведении итогов применения генных методик показано, что только I_f обеспечил стабильный идиовентрикулярный ускользающий ритм в физиологически приемлемых диапазонах значений частоты, а также ответ на регуляцию со стороны автономной нервной системы. Учитывая данные критерии, необходимо тестировать другие методики создания биологического пейсмейкера. Более того, существующие на сегодняшний день методики генной терапии напрямую не сравнивали по эффективности и продолжительности эффекта с электронными пейсмейкерами, что необходимо. Следует также отметить, что генная терапия на основе вирусных конструкций вряд ли имеет будущее. Применение аденовирусов с дефицитом репликации отражает эписомальную гипотезу, при которой генетический материал не встраивается в геном. Такой метод терапии не постоянен, что недопустимо в решении проблемы кардиостимуляции. При использовании других методов генной терапии возникают вопросы развития инфекций и возникновения неоплазий. Поэтому дальнейшая эволюция метода генной терапии будет происходить по пути решения вышеуказанных вопросов или создания более совершенных генных методик и конструкций, не имеющих вышеперечисленных недостатков.

Эмбриональные стволовые клетки

На сегодняшний день проведено много исследований на животных и человеке, касающихся применения эмбриональных стволовых клеток.

Эмбриональные стволовые клетки плюрипотентны и потенциально могут дифференцироваться в любой тип клеток организма. Поэтому теоретически представляется возможным использовать эмбриональные стволовые клетки для создания/замещения ткани любого органа. В настоящее время можно выделить две основные проблемы применения эмбриональных стволовых клеток: социополитическую проблему (законодательные ограничения исследований стволовых клеток) и техническую. Первая проблема находится вне рамок данного обзора. Вторая касается линий эмбриональных клеток как человека, так и собаки. Ученые должны научиться идентифицировать клетки-предшественники специальной линии сразу после изоляции клеток, научиться направлять процесс дифференцировки в нужную сторону и сохранять идентичность в пределах линии.

Сейчас интенсивно изучают подтипы эмбриональных клеток, принадлежащих к кардиальной линии, с целью замещения поврежденного миокарда [17, 41]. Использование таких клеток предоставляет реальную возможность лечения пациентов с терминальной сердечной недостаточностью. Вследствие того, что подтипы эмбриональных стволовых клеток инициируют импульс подобно пейсмейкерным клеткам, их применение в качестве биологического пейсмейкера возможно [11]. Однако возникает ряд проблем. Одна из них заключается в дифференцировке эмбриональных стволовых клеток и в связи с этим потери их пейсмейкерных характеристик. Кроме того, будет очень сложно направить клетки в дифференцировку и остановить их тогда, когда они достигнут стадии клеток синусного узла.

Проблемы другого рода связаны с сообщением о потенциальной аритмогенности, что было изучено на эмбриональных клетках мышей [46]. Несмотря на наличие гетерогенности деполяризации с наличием постдеполяризации и триггерной активности у этих клеток, то же самое наблюдалось и при выделении и изучении отдельных миоцитов млекопитающих или при изучении их в культуре клеток [15]. Однако это требует дальнейших исследований.

Наконец, при использовании у пациентов необходимо учитывать иммуногенность терминально дифференцированных клеток. Эту проблему можно попытаться решить путем создания банка клеточных линий и типирования тканей для определения совместимости у каждого отдельного пациента.

Исследования в области эмбриональных стволовых клеток продолжаются. Более того, эмбриональные стволовые клетки рассматриваются в качестве потенциального источника биологических пейсмейкеров.

Взрослые мезенхимальные стволовые клетки

Мезенхимальные стволовые клетки мультипотентны и обладают способностью дифференцироваться в несколько клеточных линий, включая скелетно-мышечные ткани, такие как костная ткань, мышечная ткань, сухожилие и жировая ткань. Мезенхимальные стволовые клетки можно получить из различных тканей. Однако чаще эти клетки получают из красного костного мозга. Они обладают свойством, которое делает их привлекательным для клинического использования: они не вызывают выраженный иммунный ответ [20]. Тем не менее и данный вопрос требует дальнейшего изучения.

Свойства ионных каналов взрослых мезенхимальных стволовых клеток изучали J. F. Heubach и соавт. [14]. Исходящие токи были записаны практически у всех клеток: активируемые кальцием калиевый ток, возникающий при положительных значениях мембранного потенциала (+20 мВ), и клофилий-чувствительный исходящий ток, возникающий при отрицательных значениях мембранного потенциала (-30 мВ). У незначительного количества клеток фиксировали ток через кальциевые каналы L-типа. Авторы данного исследования обнаружили значительную экспрессию двух протеинов, специфичных для нексусов: коннексинов 40 и 43 [42]. Данный вывод основывается на результатах иммуногистохимического исследования, анализа Вестерн-блот, электрофизиологических исследований, а также экспериментов, показывающих перенос красителя в соединении двух стволовых клеток и между стволовыми клетками и миоцитами [32, 42].

Учитывая стабильность клеточных линий и потенциально низкую антигенность, взрослые мезенхимальные стволовые клетки человека могут рассматриваться в качестве платформы для генной терапии и доставки малых молекулярных соединений, что было показано в опытах с переносом красителя и передачи ионного тока от клетки к клетке, клеткам других клеточных линий и миоцитам [32, 42]. Кроме того, при проведении иммуногистохимической окраски было продемонстрировано, что взрослые мезенхимальные стволовые клетки человека, введенные в миокард собаки, формируют контакты между собой и кардиомиоцитами желудочков (в состав которых входит коннексин-43) [42].

Изучив данную информацию, авторы предположили, что взрослые мезенхимальные стволовые клетки человека, «нагруженные» определенными генами, могут служить в качестве платформы для создания биологического пейсмейкера. Эту концепцию можно объяснить следующим образом. В нормальном синусном узле (или генетически модифицированном миоците) за потенциал действия

ответственна 4-я фаза. За счет перехода возбуждения по нексусам потенциал действия передается другим клеткам проводящей системы и миокарду. При условии, что стволовая клетка может быть генетически модифицирована для экспрессии изоформы *HCN* и что она может образовывать состоятельные нексусы с рядом расположенными клетками, рядом расположенная клетка, имеющая высокие значения потенциала покоя, могла бы инициировать входящий ток (I_{HCN}) в стволовой клетке. Далее стволовая клетка могла бы передавать процесс возбуждения по проводящей системе. Как только в рядом расположенном миоците потенциал достигнет фазы плато, пейсмейкерный ток мог бы прекратиться. Следующий процесс реполяризации смог бы осуществиться только после достижения максимального диастолического потенциала. Таким образом, в отличие от генной терапии, взрослые мезенхимальные столовые клетки, экспрессирующие *HCN,* не могут самостоятельно генерировать импульсы. Стволовой клетке они передаются от миоцита. Две клетки функционируют как одна пейсмейкерная единица. В данном случае стволовая клетка является платформой для доставки генов. При данном подходе не требуется дифференцировки стволовой клетки в кардиомиоцит или пейсмейкероподобную клетку.

При использовании вышеописанных стволовых клеток при создании биологического пейсмейкера необходимо вспомнить архитектуру идеального образца биологического пейсмейкера – синусного узла. Особенностью клеток синусного узла является отсутствие I_{k1} и наличие стимуляторного диапазона потенциала. Поэтому клетки синусного узла деполяризованы относительно рабочего миокарда предсердий. Далее, чтобы этим клеткам оставаться постоянно деполяризованными, они должны быть изолированными от клеток рабочего миокарда и иметь достаточный контакт с рабочим миокардом, чтобы возбуждать его [3, 43].

При рассмотрении возможности доставки генов *HCN* с помощью стволовых клеток возникают различные вопросы. В состав пейсмейкерной единицы входит миоцит и $I_{k1.}$ Таким образом, входящий ионный ток, возникающий в стволовой клетке, должен быть достаточным для преодоления исходящего ионного тока I_{k1}. Более того, связи между стволовыми клетками через нексусы должны быть достаточными для гиперполяризации клеток и активации *HCN*-каналов. Поэтому можно предположить, что между клетками не существует оптимальных контактов посредством нексусов. Однако чем лучше контакт между клетками, тем эффективнее функционирует единица.

При изучении взрослых мезенхимальных стволовых клеток было показано, что они имеют маленький эндогенный ток I_f и что эффективность электропорации для доставки гена *HCN* в клетки составляет около 40% и более [32]. При совместной трансфекции генов *HCN* и флуоресцентной метки (например *GFP*) предоставляется возможность отбирать и использовать клетки с достаточной экспрессией генов *HCN*. Данные технологии позволяют подвергать клетки генетической модификации без использования вирусов и тем самым избежать негативных последствий применения вирусных векторов. Кроме того, технологии позволят сортировать клетки по их пригодности для дальнейшего изучения и применения. Авторы измерили пейсмейкерные токи в данных клетках и обнаружили, что они активируются гиперполяризацией, изменяются в ответ на действие катехоламинов и ацетилхолина и блокируются цезием [32]. Этими свойствами обладает пейсмейкерный ток I_f.

Авторы использовали культуральную клеточную систему, стволовые клетки которой образуют маленький узел и экспрессируют *GFP+HCN* или только *GFP*. Клетки были помещены на покровное стекло и покрыты монослоем неонатальных желудочковых кардиомиоцитов крысы [32]. Слои миоцитов, соприкасающиеся со взрослыми мезенхимальными стволовыми клетками, содержащими пейсмейкерную конструкцию, сокращались быстрее (статистически значимо), чем миоциты, соприкасающиеся с мезенхимальными стволовыми клетками, экспрессирующими только *GFP* (рис. 3).

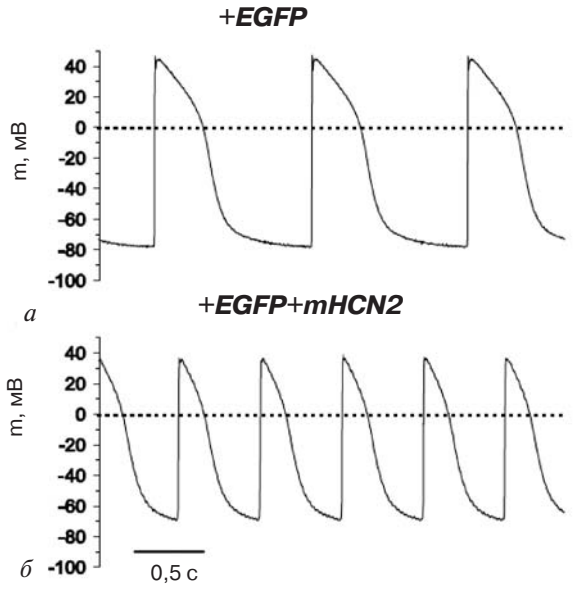

Рис. 3. Функционирование пейсмейкера на модели *in vitro*. Мезенхимальные стволовые клетки, содержащие *GFP* (*а*) или *GFP*+крысиные *HCN2* (*б*), помещены на покровное стекло и покрыты слоем неонатальных желудочковых кардиомиоцитов крысы. На рисунке видно, что 4–5 дней спустя спонтанная частота при наличии *HCN2* значительно выше, чем при наличии только *GFP* [32]

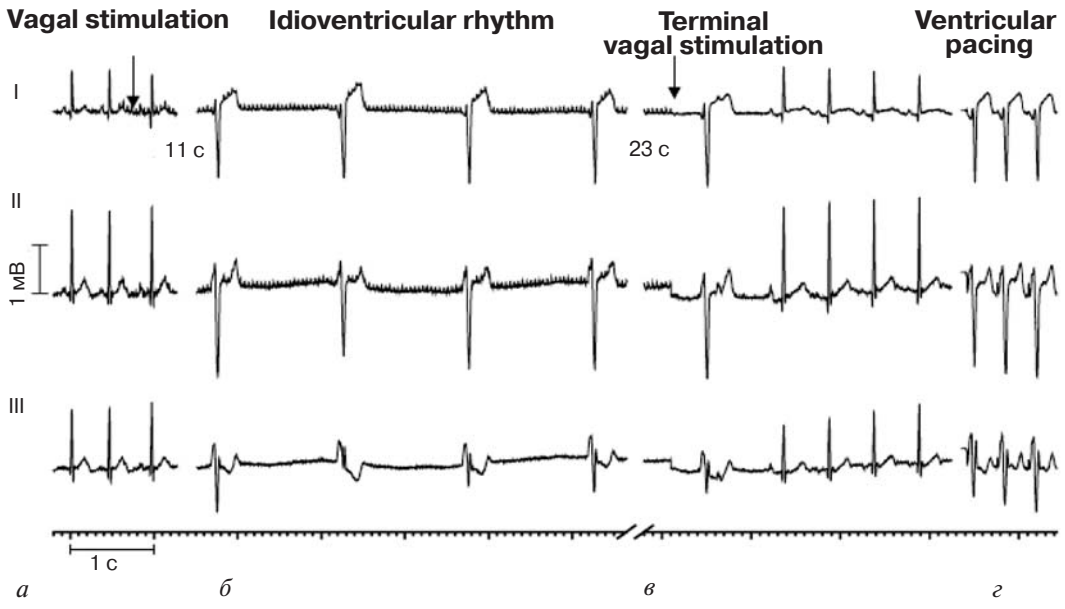

Рис. 4. Идиовентрикулярный ритм через 5 дней после введения взрослых мезенхимальных стволовых клеток человека, содержащих *GFP* и *HCN2*, в эпикард левого желудочка взрослой собаки:

а – синусовый ритм до и после стимуляции блуждающего нерва; *б* – идиовентрикулярный ритм при проведении стимуляции вагусного нерва; *в* – восстановление синусового ритма просле прекращения стимуляции вагусного нерва; *г* – стимуляция желудочков из места введения стволовых клеток. Необходимо отметить схожесть между стимулированными комплексами на панели *г* и комплексами при идиовентрикулярном ритме на панели *б* [32]

С помощью данной системы можно быстро изучить изоформы *HCN* и их мутации. Это позволит распознать частотные характеристики и ответ на влияние автономной нервной системы.

Для доказательства данной концепции взрослые мезенхимальные стволовые клетки человека вводили в виде узлов в экспериментах на собаках. Мезенхимальные стволовые клетки, введенные в эпикард левого желудочка, экспрессировали *HCN2* [32]. Через неделю для индукции атриовентрикулярной блокады проводили стимуляцию вагусного нерва. У собак, которым ввели *HCN2+GFP,* развился идиовентрикулярный ритм с частотой около 60 уд/мин. При картировании источник ритма выявлен в месте введения клеток (рис. 4).

У животных, которым ввели взрослые мезенхимальные стволовые клетки, экспрессирующие только *GFP,* частота ритма была около 45 уд/мин ($p<0,05$). Причем ритм также генерировался в разных местах. При проведении иммуногистохимического анализа в месте введения взрослых мезенхимальных стволовых клеток, экспрессирующих только *GFP,* выявили сети взрослых мезенхимальных стволовых клеток, а также свидетельства наличия нексусов между мезенхимальными стволовыми клетками и миоцитами [32].

Для выявления ответа на влияние вегетативной нервной системы *in situ* необходимо провести долгосрочные эксперименты. Кроме того, следует провести сравнение данных биологических пейсмейкеров с электронными пейсмейкерами.

Как и в случае с генными технологиями, при попытках использования взрослых человеческих мезенхимальных стволовых клеток возникают трудности, а также проблемы, касающиеся продолжительности функционирования таких пейсмейкеров по сравнению с электронными пейсмейкерами, возможности отторжения введенных клеток, возникновения неоплазии, миграции клеток в другие места и дифференцировки в клетки другого типа. Эти и другие вопросы, несомненно, требуют проведения дополнительных исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Внедрение в практику биологических пейсмейкеров для замещения поврежденной системы генерации и проведения импульсов станет еще более революционным, чем появление полвека назад первых имплантируемых электронных пейсмейкеров. Сейчас возможно обсуждать лишь концепции и гипотезы применения данных технологий. Однако чтобы эти технологии стали реальностью, необходимо провести большую работу. Главный вопрос: зачем необходимо создавать биологический пейсмейкер? Как бы хорошо ни работали электронные водители ритма, они имеют ограниченный срок службы в зависимости от режима стимуляции и требуют своевременного и квалифицированного мониторинга параметров. Создаются новые алгоритмы стимуляции, позволяющие сделать ЭКС более «умными» и проводить физиологичную стимуляцию.

Известно, что в последние годы были достигнуты большие успехи в генной и клеточной терапии различных заболеваний. Однако лечение с помощью данных технологий заболеваний сердца оказалось более сложной проблемой, чем ожидали ранее. Остается много нерешенных вопросов, касающихся методов доставки генов и клеток в миокард, продолжительности функционирования введенных конструкций, риска развития новообразований. Это относится и к применению генных и клеточных методик в аритмологии. Клинические исследования биологических пейсмейкеров пока не проводились. При их проведении предполагают имплантировать одновременно ЭКС и биологические пейсмейкеры, чтобы мониторировать функции имплантированных биологических пейсмейкеров и подстраховать пациентов на случай отказа последних.

Принимая во внимание данные проблемы, необходимо задаться вопросом, стоят ли приложенные усилия полученного результата? Если мы сможем вылечить пациентов, то игра стоит свеч. Задачи поставлены, а их решение является лишь вопросом времени.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Brown, H. F.* The ionic currents underlying pacemaker activity in rabbit sinoatrial node: experimental results and computer simulations / H. F. Brown, J. Kimura, D. Noble et al. // Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. – 1984. – Vol. 222. – P. 329–347.
2. *Campbell, G. D.* Effects of vagal stimulation and applied acetylcholine on pacemaker potentials in the guinea pig heart / G. D. Campbell, F. R. Edwards, G. D. S. Hirst, J. E. O'Shea // J. Physiol. (Lond). – 1989. – Vol. 415. – P. 57–68.
3. *De Groot, J. R.* Acute ischemia-induced gap junctional uncoupling and arrhythmogenesis / J. R. De Groot, B. Coronel // Cardiovasc. Res. – 2004. – Vol. 62. – P. 323–334.
4. *Di Francesco, D.* A study of the ionic nature of the pacemaker current in calf Purkinje fibres / D. Di Francesco // J. Physiol. – 1981. – Vol. 314. – P. 377–393.
5. *Di Francesco, D.* Block and activation of the pacemaker channel in calf Purkinje fibres: effects of potassium, caesium and rubidium / D. Di Francesco // J. Physiol. – 1982. – Vol. 329. – P. 485–507.
6. *Di Francesco, D.* Cardiac electrophysiology: from cell to bedside / D. Di Francesco, D. Mangoni, M. Maccaferri // The pacemaker current in cardiac cells; eds. D. P. Zipes, J. Jalife, 2nd ed. – Philadelphia: WB Saunders, 1995. – P. 96–103.
7. *Di Francesco, D.* Properties of the hyperpolarizing-activated current (I_f) in cells isolated from the rabbit sinoatrial node / D. Di Francesco, A. Ferroni, M. Mazzanti, C. Tromba // J. Physiol. (Lond). – 1986. – Vol. 377. – P. 61–88.
8. *Edelberg, J. M.* Enhancement of murine cardiac chronotropy by the molecular transfer of the human h_2-adrenergic receptor cDNA / J. M. Edelberg, W. C. Aird, R. D. Rosenberg // J. Clin. Invest. – 1998.– Vol. 101. – P. 337–343.
9. *Edelberg J. M.* Molecular enhancement of porcine cardiac chronotropy / J. M. Edelberg, D. T. Huang, M. E. Josephson, R. D. Rosenberg // Heart. – 2001. – Vol. 86. – P. 559–562.
10. *Furrer, M.* Hazards of an alternative medicine device in a patient with a pacemaker / M. Furrer, B. Naegeli, O. Bertel // N. Engl. J. Med. – 2004. – Vol. 350, № 16. – P. 1688–1690.
11. *Gepstein, L.* Derivation potential applications of human embryonic stem cells / L. Gepstein // Circ. Res. – 2002. – Vol. 91. – P. 866–876.
12. *Hagiwara, N.* Background current in sinoatrial node cells of the rabbit heart / N. Hagiwara, H. Irisawa, H. Kasanuki, S. Hosoda // J. Physiol. (Lond). – 1992. – Vol. 448. – P. 53–72.
13. *Hagiwara, N.* Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sinoatrial node cells / N. Hagiwara, H. Irisawa, M. Kameyama // J. Physiol. (Lond). – 1988. – Vol. 395. – P. 233–253.
14. *Huebach, J. F.* Electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells / J. F. Huebach, E. M. Graf, J. Leutheuser et al. // J. Physiol. – 2003. – Vol. 554, № 3. – P. 659–672.
15. *Jongsma, H. J.* The development of beat-rate synchronization of rat myocyte pairs in cell culture / H. J. Jongsma, M. Masson-Pevet, L. Tsjernina // Basic. Res. Cardiol. – 1987. – Vol. 82, № 5. – P. 454–464.
16. *Kaupp, U. B.* Molecular diversity of pacemaker ion channels / U. B. Kaupp, R. Seifert // Ann. Rev. Physiol. – 2001. – Vol. 63. – P. 235–257.
17. *Kehat, I.* Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes / I. Kehat, D. Kenyagin-Karsenti, M. Snir et al. // J. Clin. Invest. – 2001. – Vol. 108. – P. 407–414.
18. *Lasker, S. M.* Zatebradine slows ectopic ventricular rhythms in canine heart 2 hours after coronary artery ligation / S. M. Lasker, D. Han, R. P. Kline // J. Cardiovasc. Pharmacol. – 1997. – Vol. 29, № 5. – P. 662–669.
19. *Li, J.* Ionic basis of ryanodine's negative chronotropic effect on pacemaker cells isolated from the sinoatrial node / J. Li, J. Qu, R. D. Nathan // Am. J. Physiol. – 1997. – Vol. 273. – P. H2481–H2489.
20. *Liechty, K. W.* Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep / K. W. Liechty, T. C. MacKenzie, A. F. Shaaban et al. // Nat. Med. – 2000. – Vol. 6, № 11. – P. 1282–1286.
21. *Ludwig, A.* A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels / A. Ludwig, X. Zong, M. Jeglitsch et al. // Nature. – 1998. – Vol. 393. – P. 587–591.
22. *Martin, E. T.* Resonance imaging and cardiac pacemaker safety at 1.5 Tesla / E. T. Martin, J. A. Coman, F. G. Shellock et al. // J. Am. Coll. – 2004. – Vol. 43, № 7. – P. 1315–1324.
23. *Miake, J.* Functional role of inward rectifier current in heart probed by *Kir2.1* overexpression and dominant-negative suppression / J. Miake, E. Marba'n, H. B. Nuss // J. Clin. Invest. – 2003. – Vol. 111, № 10. – P. 1529–1536.
24. *Miake, J.* Gene therapy: biological pacemaker created by gene transfer / J. Miake, E. Marba'n, H. B. Nuss // Nature. – 2002. – Vol. 419. – P. 132–133.
25. *Miake, J.* Mechanism of automaticity induced by dominant negative suppression of IK1 in guinea pig ventricular myocytes / J. Miake, H. B. Nuss // Biophys J. – 2003. – Vol. 84, № 2. – P. 1529.
26. *Miake, J.* Multiple ionic conductances sustain IK1-suppressed biopacemaking / J. Miake, B. Nuss // Circulation. – 2003. – Vol. 108. – P. IV-35.
27. *Michaelsson, M.* Isolated congenital complete heart block in adult life: a prospective study / M. Michaelsson, A. Jonzon, T. Riesenfeld // Circulation. – 1995. – Vol. 92. – P. 442–449.
28. *Noma, A.* Effects of Na and K on the resting membrane potential of the rabbit sinoatrial node cell / A. Noma, H. Irisawa // Jpn. J. Physiol. – 1975. – Vol. 25. – P. 287–302.
29. *Noma, A.* Resting K conductances in pacemaker and non-pacemaker heart cells of the rabbit / A. Noma, T. Nakayama, Y. Kurachi, H. Irisawa // Jpn. J. Physiol. – 1984. – Vol. 34. – P. 245–254.
30. *Ono, K.* Role of rapidly activating delayed rectifier K current in sinoatrial node pacemaker activity / K. Ono, H. Ito // Am. J. Physiol. – 1995. – Vol. 269. – P. H453–H462.
31. *Plotnikov, A. N.* A biological pacemaker implanted in the canine left bundle branch provides ventricular escape rhythms having physiologically acceptable rates / A. N. Plotnikov, E. A. Sosunov, J. Qu et al. // Circulation. – 2004. – Vol. 109. – P. 506–512.
32. *Potapova, I.* Human mesenchymal stem cells as a gene delivery system to create cardiac pacemakers / I. Potapova, A. Plotnikov, Z. Lu et al. // Circ. Res. – 2004. – Vol. 94. – P. 952–959.
33. *Qu, J.* Expression and function of a biological pacemaker in canine heart / J. Qu, A. N. Plotnikov, P. Danilo Jr. et al. // Circulation. – 2003. – Vol. 107. – P. 1106–1109.
34. *Qu, J. HCN2* overexpression in newborn and adult ventricular myocytes: distinct effects on gating and excitability / J. Qu, A. Barbuti, L. Protas et al. // Circ. Res. – 2001. – Vol. 89. – P. E8–E14.

35. *Ratko, T. A.* Clinical gene therapy for nonmalignant disease / T. A. Ratko, J. P. Cummings, J. Blebea, K. A. Matuszewski // Am. J. Med. – 2003. – Vol. 115, № 7. – P. 560–569.
36. *Robinson, R. B.* Sinoatrial node and impulse initiation / R. B. Robinson, D. Di Francesco // Foundations of cardiac arrhythmias; eds P. Spooner, M. R. Rosen. – New York: Marcel Dekker, 2001. – P. 151–170.
37. *Santoro, B.* Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain / B. Santoro, D. T. Liu, H. Yao et al. // Cell. – 1998. – Vol. 93. – P. 1–20.
38. *Silva, J.* Mechanism of pacemaking in IK1-downregulated myocytes / J. Silva, Y. Rudy // Circ. Res. – 2003. – Vol. 92. – P. 261–263.
39. *Simons, M.* Therapeutic angiogenesis in cardiovascular disease. Nature reviews / M. Simons, J. A. Ware // Drug. Discov. – 2003. – Vol. 2, № 11. – P. 863–871.
40. *Strauer, B. E.* Repair of infracted myocardium by autologous intracoronary monomuclear bone marrow cell transplantation in humans / B. E. Strauer, M. Brehm, T. Zeus et al. // Circulation. – 2002. – Vol. 106. – P. 1913–1918.
41. *Strauer, B. E.* Stem cell therapy in perspective / B. E. Strauer, R. Kornowski // Circulation. – 2003. – Vol. 107. – P. 929–934.
42. *Valiunas, V.* Human mesenchymal stem cells make cardiac connexins and form functional gap junctions / V. Valiunas, S. Doronin, L. Valiuniene et al. // J. Physiol. – 2004. –Vol. 555, № 3. – P. 617–626.
43. *Van Capelle, R. W.* Propagation through electrically coupled cells. How a small SA node drives a large atrium / R. W. Van Capelle, F. J. Joyner // Biophys. J. – 1986. – Vol. 50. – P. 1157–1164.
44. *Vassalle, M.* Pacemaker channels and cardiac automaticity / M. Vassalle, H. Yu, I. S. Cohen // Cardiac electrophysiology: from cell to bedside; eds D. P. Zipes, J. Jalife. – 3rd ed.– Philadelphia: WB Saunders, 2000. – P. 94–103.
45. *Yu, H.* Pacemaker current exists in ventricular myocytes / H. Yu, F. Chang, I. S. Cohen / Circ. Res. – 1993. – Vol. 72. – P. 232–236.
46. *Zhang, Y. M.* Stem cell-derived cardiomyocytes demonstrate arrhythmic potential / Y. M. Zhang, C. Hartzell, M. Narlow, S. C. Dudley Jr / Circulation. – 2002. – Vol. 106, № 10. – P. 1294–1299.
47. *Zivin, A.* Cardiac pacemakers / A. Zivin, G. H. Bardy, R. Mehra // Foundations of cardiac arrhythmias; eds P. M. Spooner, M. R. Rozen. – New York: Marcel Dekker, 2001. – P. 571–598.
48. *Zivin, A.* Implantable cardioverter defibrillators / A. Zivin, G. H. Bardy, R. Mehra // Ibid. – P. 599–619.