

1 – Институт биохимической технологии и нанотехнологии РУДН, 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 10/2

2 – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А. Н. Бакулева», 121552, Россия, г. Москва, ул. Рублевское шоссе, 135

1 – Institute of Biochemical technology and nanotechnology PFUR, 10/2, Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

2 – Bakoulev Scientific Center for Cardiovascular Surgery, 135, Roublevskoe shosse str., Moscow, 121552, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: amina89.06@gmail.com

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО ВОДИТЕЛЯ РИТМА

А.Г. Ибрагимова^{1,2*}, М.В. Еремеева²

Резюме. В настоящее время одним из важных вопросов, стоящих перед медициной двадцать первого века в кардиологии, является создание возможной альтернативы электрическим кардиостимуляторам, которые требуют замены каждые 5–10 лет и имеют ряд недостатков. В качестве одного из возможных решений этой проблемы мы будем рассматривать создание биологического водителя ритма или биологического пейсмейкера, который может работать неограниченно, менять свой ритм в зависимости от условий и проявлять свое действие на сердце в зависимости от заболевания человека. Можно выделить 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. Биологическая стимуляция была предложена в качестве физиологического аналога электрокардиостимулятора, а синоатриальный узел является общим стандартом для биологических пейсмейкеров. В последнее десятилетие происходит активное развитие генной и клеточной терапии, и, возможно, в будущем произойдет переход от электрокардиостимулятора к биологическому пейсмейкеру в клинической практике. Целью данной работы является аналитический обзор современных технологий генной и клеточной терапии для создания биологического пейсмейкера и пути введения его в клиническую практику.

Ключевые слова: биологический пейсмейкер, брадикардия, генная терапия, клеточная терапия.

MODERN SOLUTIONS FOR CREATE BIOLOGICAL PACEMAKERS

A.G. Ibragimova^{1*}, M.V. Eremeeva²

Abstract. At present one of the important issues facing the twenty-first century medicine in cardiology is the creation of a possible alternative to electrical pacemakers that did not require replacement every 5–10 years. There are at least two stimuli for designing and fabricating biological pacemakers: (1) the desire to improve on electronic pacemakers that are currently the state of the art for treating many rhythm disorders; (2) to use this paradigm as a template for developing other gene/cell-based antiarrhythmic strategies. One of the most promising solutions is seen as a possible alternative is a biological pacemaker that can operate indefinitely and change their rhythm according to the conditions and showing its effect on the heart according to human disease. Biological pacing has been proposed as a physiologic counterpart to electronic pacing and the sinoatrial node (SAN) is the general standard for biological pacemakers. In the last decade there is an active development of gene and cell therapy, and perhaps in the future we can hope to move into the clinical practice of the pacemaker to a biological pacemaker. The aim of this work is to search for modern methods of gene and cell therapy to create biological pacemaker and the route of administration to the clinic.

Keywords: biological pacemaker, bradycardia, gene therapy, cell therapy.

ВВЕДЕНИЕ

По смертности сердечно-сосудистые заболевания по-прежнему занимают ведущее положение в мире. Одними из самых распространенных сердечных патологий являются аритмии, причинами которых могут быть различные функциональные и органические поражения миокарда (прежде всего инфаркт, ишемическая болезнь, врожденные или приобретенные пороки сердца и т.д.). В нормально работающем сердце ритмические сокращения миокарда происходят под действием импульсов, которые спонтанно зарождаются в клетках синоатриального узла (САУ). Иначе он называется

первичным водителем ритма, или пейсмейкером (англ. *pacemaker* – задающий ритм). От него возбуждение распространяется по предсердиям, заставляя их синхронно сокращаться и перекачивать кровь в желудочки, и доходит до атриовентрикулярного узла. Далее электрический импульс через пучок Гиса достигает его конечных разветвлений – волокон Пуркинье – и вызывает сокращение желудочков, вследствие чего кровь изгоняется из сердца в органы и ткани организма [1].

Современные научные разработки позволяют выполнить реваскуляризацию миокарда, генерацию новых миоци-

тов, а также придать клеткам новые функциональные возможности. В основе большей части разработанных методик лежит генная и клеточная терапия. Важным вкладом в реализацию концепции генной и клеточной антиаритмической терапии является создание генераторов сердечных импульсов – биологических пейсмекеров. За последние годы, благодаря генным технологиям, стала возможной регуляция экспрессии бета-адренергических рецепторов, а также функции ионных каналов, ответственных за генерацию потенциала действия, что необходимо для создания биологического пейсмекера [2–6].

Последним достижением является новая парадигма, которая выходит за рамки предыдущих методов, – создание индуцированных пейсмекерских клеток подобно клеткам САУ. Параллельным методом является получение автономной, спонтанно сокращающейся сердечной ткани из плюрипотентных стволовых клеток [3].

В работах M. Rosen, J. Ryan, I.B. Potapova, J. Miake и др. основной целью является возможность создания биологического водителя ритма, отвечающая функциям синусного узла. Методами генной и клеточной терапии авторы этих работ достигли значительных результатов в этой сфере, но только в эксперименте, так как переход в клиническую практику небезопасен и несет различные риски [2–5, 7–9].

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ПЕЙСМЕЙКЕР

Как уже было сказано выше, синоатриальный узел (САУ) инициируют сердцебиение, поддерживает кровообращение и устанавливает частоту и ритм сердечных сокращений. Его спонтанная пейсмекерская активность возбуждает миокард и создает условия для проведения сердечного возбуждения и сокращения. Потеря активности пейсмекера в САУ приводит к сосудистой недостаточности, что требует внедрения электрокардиостимуляторов. Хотя эффективнее использовать паллиативные меры, но такие устройства, как электрокардиостимуляторы, очень дороги и могут привести к сердечной недостаточности и хронической инфекции [10].

Создание биологического водителя ритма может решить многие проблемы, связанные с проводимостью как при тахикардии, так и при брадикардии. Наиболее значимым практическим результатом всестороннего изучения клеточных, молекулярных и электрофизиологических основ тахикардии, брадикардии, синдрома удлиненного интервала Q-T явилась разработка терапевтических подходов, специфических в отношении пораженного гена [11].

Возможным альтернативным методом генной терапии может быть использование клеточной или тканевой инженерии. В случае биологических пейсмекеров было предложено две технологии. Первая включает комбинирование клеточной и генной терапии, благодаря чему клетки могут быть трансфициро-

ваны *ex vivo* с экспрессией необходимых ионных каналов. С помощью определенных ионных каналовцев, участвующих в сердечном автоматизме, можно стимулировать автоматизм в определенной области сердца. Биологические пейсмекеры могут быть предложены в качестве возможной альтернативы электронному кардиостимулятору, даже если биологический водитель ритма может работать в сочетании с электронным. Вторая технология предполагает дифференцировку стволовых клеток в желаемую линию кардиомиоцитов (например, для создания кардиомиоцитов со стабильными функциями пейсмекера). При применении любой из двух технологий *ex vivo* клетки будут использоваться для пересадки *in vivo*. Клетки трансплантата должны удовлетворять определенным требованиям, чтобы выполнять функцию эффективного биологического пейсмекера. К ним относятся способность к выживанию в течение длительного времени после трансплантации, а также способность сохранять функциональные характеристики, формировать необходимые структурные связи с сердечной тканью, что позволит им управлять электрической активностью сердца.

Кроме того, сочетание активных и пассивных электрофизических свойств введенных клеток, а также их взаимодействие с соседними кардиомиоцитами должно позволить воспроизвести стабильную активность пейсмекера во время периодов замедления ритма сердца и в то же время подавить во время периодов нормального ритма [12].

СОЗДАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПЕЙСМЕЙКЕРА

Существует три ключевых компонента пейсмекерной функции, которые могли бы облегчить создание биологического пейсмекера. Первый компонент – инициатор или триггер – это клетка или клетки, которые будут обладать функцией пейсмекера благодаря добавлению и включению необходимого гена или генов. Второй компонент – это субстрат или подложка, включающий в себя клетки, к которым передавался бы сигнал и распространялся по проводящей системе. Третий компонент – это возможность соединения между триггерными клетками, которая позволит создать структуру, действующую согласованно и обеспечивающую оптимальную передачу сигнала между триггером и клетками субстрата. Центральное место в этой связи занимает формирование межклеточных щелевых каналов посредством сердечных коннексинов [13].

V. Valiunas с соавторами изучали взаимодействие связи триггер – субстрат с использованием простой модели – двухклеточного синцития (группа клеток, у которых клеточные границы не полностью отделяют клетки друг от друга, в результате чего формируется мультіядерная клетка) (рисунок 1). Триггер может быть «производителем» для любых типов клеток

для животных и человека. На рисунке 1а показан миоцит желудочка собаки, при электростимуляции не способный к автоматизму. На рисунке 1б показаны триггерные клетки с генами, кодирующими HCN2 щелевых контактов – белок коннексин-43 (CX43). Триггерные клетки связываются с миоцитами и двумя клетками совместно, производя биологический ритм. Следует обратить внимание на то, что, хотя «триггерные» клетки сами по себе не возбудимы, они обеспечивают деполяризующий ток возбудимого кардиомиоцита [9, 27, 28].

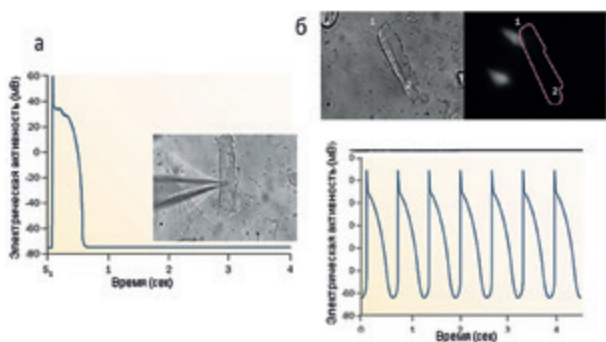


Рисунок 1. Функции пейсмекера в клетках культуры двухклеточного синцития [M.R. Rosen et al; 2011].

(а) кардиомиоциты с нетрансфицированными HeLa-клетками (справа) с возбуждением извне электростимулятором (слева). Клетка реагирует на единственный потенциал действия, она не может инициировать потенциал без стимула.

(б) трехдневное сокультивирование собачьих миоцитов желудочка и HeLa-клетки, трансфицированные с генами, кодирующими белки щелевых контактов – коннексин-43, GFP и HCN2 (триггер). Шкала бар: 20 мкм. Сокращения: GFP – зеленый флуоресцентный белок, HCN2 – гиперполяризованный – активированный циклический нуклеотид – закрытый канал 2

Клеточный синцитий упрощает сложности соединения, необходимого для создания биологического пейсмекера, и эта модель идеальна для рассмотрения нескольких факторов, способствующих выполнению функции пейсмекера. На рисунке 1 отражен один фактор из числа пейсмекерских единиц в клетке – это число клеток, несущих каналы, которые способны функционировать как триггеры.

Особое внимание уделяют соотношению триггера клетки к числу клеток в любом субстрате. Например, взрослые МСК человека, содержащие ген HCN2, могут служить в качестве платформы для доставки тока в левый желудочек собаки, число клеток от 600000–700000. Следует учесть, что критическое число 50% «нагруженных» клеток от 300000–350000. Меньшее количество клеток приводит как к присутствию, так и к отсутствию функции, а большое количество клеток не способствует дальнейшему повышению функции, другими словами, существует пороговый эффект. Другая иллюстрация важности триггер-субстратного отношения и связи была представлена экспериментами, в которых активно функционируют клетки САУ – обычно их рассматривают как

квинтэссенцию пейсмекера. Они были имплантированы (аутологичные) в желудочек собаки с полной блокадой сердца (ПБС) [26]. Функция была соответствующая и ухудшилась только через две недели. Слабые связи, несоответствующие взаимодействия триггер – субстрат, постепенная гибель клеток или все эти три функции, вероятнее всего, внесли свой вклад в несостоятельность этого метода. Авторы [8, 9, 13] приходят к выводам, что определение количества клеток, необходимых для оптимальной экспрессии этой функции, требует знания движущей силы в триггерных клетках, степени связи между типами клеток, а также величины и физиологии субстрата; воспроизведение функционирования определенного пейсмекера, обладающего свойством приспосабливаться к одной клетке, может не обеспечить аналогичные функции при другом местоположении. Мы также должны иметь единые стандарты для изученных моделей и понимание их клинической значимости.

ТЕРАПИЯ БРАДИАРИТМИЙ: СОЗДАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПЕЙСМЕКЕРА И ВОССТАНОВЛЕНИЕ ФУНКЦИЙ АНТРИОВЕНТИКУЛЯРНОГО УЗЛА

В США ежегодно имплантируется свыше 300000 электронных пейсмекеров для лечения брадиаритмии, которая связана с нарушениями функции синоатриального и атриовентрикулярного узла [14]. Хотя электрокардиостимуляторы имеют ограничения и ряд недостатков. Во-первых, они не способны регулировать реакцию миокарда на физические и эмоциональные нагрузки. Во-вторых, масса электрокардиостимуляторов и размер электродов не всегда могут оптимально соответствовать физическому росту и развитию пациента. В-третьих, из-за возможных смещений имплантированного электрода в сердце в некоторых случаях невозможна оптимальная активация возбуждения и сокращения миокарда. В-четвертых, искусственные водители ритма подлежат регулярному тестированию, и через каждые 5–10 лет следует проводить замену батареек. В-пятых, на работу электронного пейсмекера могут оказывать влияние различные электронные приборы. Таким образом, необходим поиск альтернативного метода лечения нарушений ритма [20].

Технологии по созданию пейсмекера для лечения брадиаритмий можно разделить на две категории. Одна категория – применение эндогенных клеток, таких как САУ или стволовые клетки, которые направляют в сердечную линию. Ограничением для этой технологии является то, что для одного канала естественно экспрессируется определенный тип клеток. Таким образом, возникают проблемы с источником клеток, дифференцировкой и иммунным ответом. Конечный результат не может быть идеальным, потому что никто

не знает, как задать и изменить биофизические функции канала, способствующие пейсмейкингу. Другая категория терапии основана на использовании генной инженерии, чтобы ввести гены непосредственно в кардиомиоциты или в клетки для усиления и запуска автоматизма.

В этом случае можно использовать все инструменты биоинформатики и молекулярной биологии для создания каналов с различными биофизическими свойствами, которые могли бы подходить персонализировано для пациента или имплантата. Таким образом, необходимо создать модель генов-кандидатов, затем провести исследования на интактных животных, а следующим шагом станет выход в клиническую практику [15].

ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ, НАПРАВЛЕННАЯ НА СОЗДАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПЕЙСМЕЙКЕРА В МИОКАРДЕ

Влияние на автоматизм сердца симпатической нервной системы, которое опосредовано действием ее медиаторов (адреналина и норадреналина), хорошо изучено. В связи с этим первые работы по созданию биологических пейсмейкеров были направлены на активацию β -адренорецепторов, приводящую к фосфорилированию мембранных белков и усилению входящих токов. J.M. Edelberg et al. надеялись добиться повышения автоматизма сердца в результате введения в предсердие свиньи специально сконструированного плазмидного вектора с геном, кодирующим β_2 -адренорецептор [16, 17]. Действительно, ритм предсердий стал достоверно выше исходного уровня. Казалось, путь к успеху проложен, однако эффект длился всего около 24 ч, и не было уверенности, что, продолжая исследования в этом направлении, можно добиться устойчивой работы водителя ритма. Неясно было даже, что в данном случае произошло – коррекция существующей пейсмейкерной активности или формирование новой [1].

J. Miake и соавт. использовали генную терапию для создания функции пейсмейкера в миокарде желудочка. Следующим шагом стали эксперименты, в которых попытались воздействовать на выходящий, гиперполярирующий ток I_k . Для этих целей использовали аденовирусный вектор со встроенным мутантным геном Kir 2.1, кодирующим одну из белковых субъединиц калиевого канала [4]. Указанную генную конструкцию вводили в полость левого желудочка морской свинки, что привело спустя 3–4 дня к подавлению калиевого тока I_k на 80%. В течение этого времени спонтанный ритм регистрировался на электрокардиограмме, и потенциалы действия кардиомиоцитов выявили его высокий уровень. Главный недостаток такого метода заключается в том, что подавление тока I_k само по себе могло стать причиной аритмии. К тому же неясно,

какой из входящих токов обеспечивал пейсмейкерную функцию сердца в данном случае, поэтому последствия таких работ непредсказуемы [4, 16–18].

Генная терапия либо гиперэкспрессия увеличивает пейсмейкерский ритм в кардиомиоцитах (за счет увеличения внутреннего тока) или – в противном случае – снижается пейсмекерский ритм (и уменьшается внешний ток). Эти методы изменяют электрический сигнал, генерируемый на кардиомиоциты, и специализированные проводящие клетки превращаются в доминантные пейсмейкеры. Изменение тока при взаимодействии с эндогенным «комплексом» ионных токов в миоцитах или специализированным проводящим волокном создает пейсмейкер в клетке [8].

J. Qu и соавт. в экспериментальном исследовании на собаках показали, что введенный в миокард левого предсердия ген HCN2 мыши в составе аденовирусной конструкции, меченой флуоресцентной меткой (HCN2+GFP), хорошо экспрессируется в предсердиях (по данным иммунофлуоресцентной микроскопии), и спустя 3–4 дня в кардиомиоцитах регистрируется пейсмейкерный ток I_f . *In vivo* у всех четырех собак был выявлен левопредсердный спонтанный ритм при искусственно созданной атриовентрикулярной блокаде и введении HCN2+GFP, в то время как ни у одного животного в группе контроля, которым была введена только флуоресцентная метка GFP, не было выявлено источника спонтанного ритма в левом предсердии [19]. Кроме того, было определено, что при инъекции конструкции HCN2+GFP в левое предсердие функция генерирования электрических импульсов чувствительна к воздействию катехоламинов или вагусной стимуляции и частота сердечных сокращений может соответственно увеличиваться или уменьшаться [19–20].

Другим способом было использование транскрипционного фактора Tbx18. После того как в кардиомиоциты вводился ген Tbx18, происходило формирование пейсмекерских клеток – «индуцированных пейсмекеров» или iSAN-клеток. Они обладали всеми характеристиками, которые присущи естественным пейсмекерам.

В качестве средства введения гена в клетки была использована сконструированная аденовирусная частица. Ген Tbx18 играет важную роль в развитии пейсмекеров эмбрионов. В ходе проведения лабораторных испытаний *in vitro*, а также исследований на морских свинках выявлялось формирование пейсмекеров из кардиомиоцитов. При этом кардиомиоциты выполняли нативные функции пейсмекеров и принимали их характерные черты. Более ранние попытки создать пейсмекерские клетки из кардиомиоцитов не увенчались успехом, они больше напоминали мышечные клетки, а не пейсмейкеры [21].

УВЕЛИЧЕНИЕ ВНУТРЕННЕГО ТОКА ИОННЫХ КАНАЛОВ

Катионный канал HCN (Hyperpolarization activated, Cyclic Nucleotide gated – активируются гиперполяризацией, а состояние ворот – открытие и закрытие – зависит от циклических нуклеотидов) играет важную роль в создании сердечного ритма. Вместо того чтобы ингибировать K⁺ канал, M.R. Rosen и его коллеги вызвали эктопическую активность пейсмейкера на модели собаки повышенной экспрессией HCN2-каналов [2, 9].

Несмотря на то, что HCN4 является главной изоформой, J. Qi и др. использовали HCN2, который является доминирующей изоформой в кардиомиоцитах желудочка, с цАМФ реагирует подобно HCN4. А при подавлении синусового ритма при стимуляции блуждающего нерва авторы наблюдали спонтанные ритмы у собак, которым вводили аденовирус, кодирующий HCN2-канал в левое предсердие. Когда аналогичную конструкцию вводили в левую ножку пучка Гисса, они наблюдали в левом желудочке эктопический ритм, превышающий контроль. Кроме того, HHCN1-канал с измененными свойствами был использован, чтобы продемонстрировать эктопическую стимуляцию, когда биологический пейсмекер был локально введен в левое предсердие CAU-абляции на свиной модели. Эти работы были выполнены на крупных моделях животных, в результате чего биологический пейсмекер становится все ближе к клиническому применению [10].

КЛЕТочная ТЕРАПИЯ

Общая процедура клеточной терапии для миокарда состоит в получении жизнеспособных клеток от доноров. В идеале эти клетки восстанавливают жизнеспособность миоцитов по направленному или ненаправленному (паракринному) механизму, увеличивая кровоснабжение, что в результате приводит к улучшению гемодинамики и, что важно, уменьшает риск аритмии без лечения [22]. Отличительной чертой различных типов клеток является их способность дифференцироваться в любые типы клеток (плюрипотентность), в ограниченное количество типов клеток (мультипотентность) или только в один тип клеток (унипотентность) [23].

ПРИМЕНЕНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

M.R. Rosen и соавт. предложили гипотезу, согласно которой мезенхимальные стволовые клетки способны эффективно объединяться за счет электрического взаимодействия друг с другом и с кардиомиоцитами. Электрическое объединение клеток возможно за счет повышенной экспрессии HCN2 в трансфицированных геном HCN2 мезенхимальных стволовых клетках. При этом мезенхимальные стволовые клетки способны к гиперполяризации, в то время как соседние миоциты находятся в состоянии реполяризации.

При гиперполяризации генерируется входящий ионный ток, что приводит к инициации деполяризации и генерации потенциала действия в миоцитах. Таким образом, при функциональном объединении клеток мезенхимальная стволовая клетка обеспечивает деполяризацию, в то время как миоцит генерирует потенциал действия [5, 7].

ПРИМЕНЕНИЕ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ КЛЕТОК

L. Gepstein и соавт. в качестве субстрата для создания биологического пейсмейкера использовали эмбриональные стволовые клетки [16].

Терапия ЭСК может нести различные риски. Напротив, МСК, выделенные из костного мозга, иммунопривилегированы и так или иначе могут быть получены из аллогенного источника [7].

Применение вирусных векторов для генной терапии также может нести различные риски (передача вирусных заболеваний и др.), поэтому ведутся поиски других методов для создания биологического пейсмейкера.

Например, используют человеческие эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), их культивируют и направляют в пейсмекерскую линию. Взрослые мезенхимальные стволовые клетки человека (МСК) или другие клетки, например скелетные миобласты (СКМБ), могут служить в качестве платформ для доставки генов HCN. Клетки могут быть доставлены введением прямо в миокард от поверхности эпикарда во время хирургической операции или от эндокарда с помощью подкожного введения. Преимущество этого метода в том, что клетки способны мигрировать в область повреждения независимо от состояния перфузии или способности клеток к «хоумингу». В качестве альтернативы некоторые типы клеток могут быть доставлены внутривенно. МСК и ССК имеют способность мигрировать через эндотелий и аккумулироваться на месте сильного повреждения, и могут быть введены внутривенно, СКМБ не обладают такой способностью и не могут быть прямо введены к месту повреждения [2, 5]. Последние клинические исследования показывают, что внутривенное введение аллогенных человеческих МСК пациентам с инфарктом миокарда является безопасным [24].

КОМБИНИРОВАНИЕ ГЕННОЙ И КЛЕТочной ТЕРАПИИ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПРОВОДИМОСТИ

Исследователи из группы L. Gepstein et al. [12, 13] создали модель *in vitro* с блокадой проводимости, используя пространственную сепарацию, спонтанное сокращение. Из несинхронизированных человеческих эмбриональных стволовых клеток (чЭСК) получены кластеры кардиомиоцитов. В качестве материала использовали ЭСК, HEK293 и фибробласты.

Кардиомиоциты культивировали с чЭСК, в их суспензии от 7 до 10 дней как эмбрионидные тела, далее их трансфецировали eGFP. Линию клеток HEK293 трансфецировали геном SCN5A, кодирующим Na⁺-канал, культивировали совместно с кардиомиоцитами, синхронизируя потенциал действия. А фибробласты трансфецировали eGFP и геном, кодирующим калиевый канал, а нетрансфецированные HEK293 и фибробласты служили в качестве контроля.

Иммуноокрашивание коннексином-43 и кальцеином в эксперименте подтверждает формирование функциональных щелевых контактов между модифицированными клетками и смежными кардиомиоцитами. Способность модифицированных клеток восстанавливать проводимость в сокультуре оценивали с помощью мультieleктродного анализа. Синхронизация была определена установлением фиксирования различного времени активации между кардиомиоцитами кластерами и сходимости длины цикла активации. Нетрансфецированные (контрольные) клетки индуцировали синхронизацию между кластерами кардиомиоцитов на расстоянии 300 мкм. В противоположность этому клетки, экспрессирующие Na⁺-каналы, синхронизировали сокращение между кластерами на расстоянии 1050 мкм. Тем самым клетки, экспрессирующие K⁺-каналы, позволяют провести синхронизацию на любом расстоянии.

Полученные методами генной инженерии клетки, экспрессирующие Na⁺-каналы, могут быть биологическими проводниками для кардиомиоцитов. Этот метод клеточной терапии перспективен для развития терапевтической стратегии как при брадиаритмиях, так и при тахикардиях [13].

Y. Mandel с соавторами [25] используют также три пути для создания биологического водителя ритма. Первый – использование вирусного вектора для доставки генов в сердце; второй – использование эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) или индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), направляя их в кардиомиоциты, чтобы по электрофизиологическим свойствам они были подобны клеткам синоатриального узла; третий – использование комбинированной генной и клеточной терапии, когда благодаря применению взрослых мезенхимальных стволовых клеток можно создать платформу для создания спонтанной активности и/или экспрессии пейсмекерского тока I_f. Важно отметить, что функциональные особенности прототипа биологического пейсмекера, САУ, не ограничиваются простым автоматизмом. Нормальный узел имеет организованный ритм, который стабилен во времени и интегрирован с миокардом.

В работе [25] коллектив авторов впервые использовал ИПСК – клетки, полученные из человеческого волоса (кераноциты). В эксперименте их сокультурировали с кардиомиоцитами и сравнивали с чЭСК при таком же сокультурировании. Эти клетки

трансфецировали лентивирусными плазмидами, тем самым получали лентивирусный вектор для ИПСК. Их культивировали пятнадцать дней и получили пейсмекерскую линию клеток, которая проявила спонтанную электрическую активность, отвечая свойствам САУ.

Из результатов данной работы следует, что новый способ получения пейсмекеров из ИПСК волос пациента решает вопрос иммуносупрессии, который является прототипом, отвечающим свойствам САУ. Сама методика выделения клеток не может быть рекомендована для введения в клиническую практику, так как используются вирусные векторы, что может привести к различным непредвиденным последствиям.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализируя данные проведенных исследований, можно сделать вывод, что стратегия создания биологического водителя ритма перспективна. А современные технологии открывают перспективы решения проблемы создания пейсмекера, и, возможно, дальнейшие исследования приведут к переходу от электрокардиостимулятора к биологической стимуляции.

Дальнейшие исследования должны быть направлены в первую очередь на сравнение эффективности биологического и электронного водителей ритма. Понимание и знание особенностей функционирования пейсмекеров, которые ответственны за нормальное функционирование САУ и всех клеток проводящей системы, может помочь в создании биологического водителя ритма с помощью методов генной и клеточной терапии. В настоящее время описано достаточное количество экспериментальных работ по созданию биологических пейсмекеров, но выход в клиническую практику затруднителен в силу того, что поиск аллогенной конструкции биологического пейсмекера остается открытым, вопрос иммуносупрессии требует поиска уникального источника материала и использования невирусных векторов для доставки генов. Также остается нерешенным вопрос о наиболее оптимальном для имплантации пейсмекерских клеток участке.

В настоящее время говорить о начале клинического применения биологических водителей ритма ещё рано, так как не выработана четкая и эффективная стратегия создания и функционирования биологического пейсмекера. Однако комбинирование методов клеточной и генной терапии остается наиболее перспективным при лечении тахи- и брадиаритмий и, возможно, в будущем – синдрома возникновения внезапной смерти.

ЛИТЕРАТУРА

1. Л.В. Розенштраух. Создание биологического водителя ритма сердца // Природа. № 7. 2005.
2. I.A. Potapova, S.V. Doronin, D.J. Kelly, A.B. Rosen, A.J. Schuldt, Z. Lu, P.V. Kochupura, R.B. Robinson, M.R. Rosen, P.R. Brink, G.R. Gaudette, I.S. Cohen.

- Enhanced recovery of mechanical function in the canine heart by seeding an extracellular matrix patch with mesenchymal stem cells committed to a cardiac lineage // *American Journal Physiology Heart Circulation Physiology*. 2008. V. 295. P. 2257–2263.
3. C.H. Choo. Pacing the Heart with Genes: Recent Progress in Biological Pacing // *Current Cardiology Report*. 2015. V. 17. P. 65.
 4. J. Miake, E. Marban, H.B. Nuss. Biological pacemaker created by gene transfer // *Nature*. 2002. V. 419. P. 132–133.
 5. M.R. Rosen, P.R. Brink, I.S. Cohen, R.B. Robinson. Cardiac Pacing: From biological to Electronic... to Biological? // *Circulation Arrhythmia and Electrophysiology*. 2008. V. 1. P. 54–61.
 6. P.C. Viswanathan, J.A. Coles Jr, V. Sharma, D.C. Sigg. Recreating an artificial biological pacemaker: insights from a theoretical model // *Heart Rhythm*. 2006. V. 3. P. 824–831.
 7. J.M. Ryan, F.P. Barry, J.M. Murphy, B.P. Mahon. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection // *Journal Inflammation (Lond)*. 2005. V. 2. P. 8.
 8. M.R. Rosen, P.R. Brink, I.S. Cohen, R.B. Robinson. Genes, stem cells and biological pacemakers // *Cardiovascular Research*. 2004. V. 64(1). P. 12–23.
 9. M.R. Rosen, R.B. Robinson, P.R. Brink and I.S. Cohen. The road to biological pacing // *Nature Reviews Cardiology*. 2011. V. 8. P. 656–666.
 10. C.H. Choo, E. Marban. Biological Therapies for Cardiac Arrhythmias, Can Genes and cell Replase Drugs and Devise? // *Circulation Research*. 2010. V. 106. P. 674–685.
 11. S.P. Etheridge, S.J. Compton, M. Tristani-Firouz, J.W. Mason. A new oral therapy for long QT syndrome: long-term oral potassium improves repolarization in patients with HERG mutations // *Journal of the American College Cardiology*. 2003. V. 42(10). P. 1777–1782.
 12. L. Yankelson, L. Gepstein. From gene therapy and stem cells to clinical electrophysiology // *Pacing Clinical Electrophysiology*. 2006. V. 29(9). P. 996–1005.
 13. A. Hofshi, I. Itzhaki, A. Gepstein, G. Arbel, J. Gil, G.J. Gross, L. Gepstein. A combined gene and cell therapy approach for restoration of conduction // *Heart Rhythm Society*. 2011. V. 8(1). P. 121–30.
 14. G. Gregoratos. Indication and recommendations for pacemaker therapy // *American family Physician*. 2005. P. 1563–1570.
 15. R.B. Robinson. Engineering a biological pacemaker: *in vivo*, *in vitro* and *in silico* Models // *Drug Discov Today Dis Models*. 2009. V. 6(3). P. 93–98.
 16. J.M. Edelman, D.T. Huang, M.E. Josephson, R.D. Rosenberg. Molecular enhancement of porcine cardiac chronotropy // *Heart*. 2001. V. 86. P. 559–562.
 17. J.M. Edelman, W.C. Aird, R.D. Rosenberg. Enhancement of murine cardiac chronotropy by the molecular transfer of the human beta2 adrenergic receptor cDNA // *Journal Clinical Investigation*. 1998. V. 101. P. 337–343.
 18. J. Silva, Y. Rudy. Mechanism of pacemaking in I_{K1} -downregulated myocytes // *Circulation Research*. 2003. V. 92. P. 261–263.
 19. J. Qu, A.N. Plotnikov, P. Danilo et al. Expression and function of a biological pacemaker in canine heart // *Circulation*. 2003. V. 107. P. 1106–1109.
 20. Л.А. Бокерия, М.В. Еремеева, Ю.А. Чудиновских. Роль генных и клеточных технологий в создании биологического пейсмейкера // *Анналы Аритмологии*. 2010. № 1. С. 20–25.
 21. N. Kapoor, W. Liang, E. Marbán, H.C. Cho. Direct conversion of quiescent cardiomyocytes to pacemaker cells by expression of Tbx18 // *Nature Biotechnology*. 2013. V. 31(1). P. 54–62.
 22. S. Dimmeler, A.M. Zeiher, M.D. Schneider. Unchain my heart: the scitific foundations of cardiac repair // *Clinical Investigation*. 2005. V. 115. P. 572–583.
 23. K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, S. Yamanaka. Induction of pluripotent stem cells from adalt human fibroblast by defined factors // *Cell*. 2007. V. 131. P. 861–872.
 24. J.M. Hare, J.H. Traverse, T.D. Henry et al. A randomized, double-blind, placebocontrolled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells(prochymal) after acute myocardial infarction // *Journal American College Cardiology*. 2009. V. 54. P. 2277–2286.
 25. Y. Mandel, A. Weissman, R. Schick, L. Barad, A. Novak, G. Meiry, S. Goldberg, A. Lorber, M.R. Rosen, J. Itskovitz-Eldor, O. Binah. Human Embryonic Induced Pluripotent Cell-Derived. Cardiomyocytes Exhibit Beat Rate Variability and Power – Law Behavior // *Circulation*. 2012. V. 125(7). P. 883–93.
 26. H. Zhang, D. H. Lau, N.I. Shlapakova, X. Zhao, P. Danilo, R.B. Robinson, I.S. Cohen, D. Qu, Z. Xu, M.R. Rosen. Implantation of sinoatrial node cells into canine right ventricle: biological pacing appears limited by the substrate // *Cell Transplantation*. 2011. V. 20. P. 1907–1914.
 27. V. Valiunas, S. Doronin, L. Valiuniene, I. Potapova, J. Zuckerman, B. Walcott, R.B. Robinson, M.R. Rosen, P.R. Brink, I.S. Cohen. Human mesenchymal stem cells make cardiac connexins and form functional gap junctions // *Journal Physiology*. 2004. V. 555. P. 617–626.
 28. V. Valiunas, G. Kanaporis, L. Valiuniene, C. Gordon, H.Z. Wang, L. Li, R.B. Robinson, M.R. Rosen, I.S. Cohen, P.R. Brink. Coupling an HCN2-expressing cell to a myocyte creates a two-cell pacing unit // *Journal Physiology*. 2009. V. 587. P. 5211–5226..