

УДК 577.218

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ КАРДИОМИОГЕНЕЗА И ПЕРСПЕКТИВЫ ВОССТАНОВЛЕНИЯ КАРДИОМИОЦИТОВ ПРИ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ¹

© 2008 г. В. П. Ширинский*, А. Ю. Хапчаев, О. В. Степанова

Российский кардиологический научно-производственный комплекс Росмедтехнологий, Москва, 121552

Поступила в редакцию и принята к печати 01.04.2008 г.

В обзоре рассмотрено состояние исследований в области молекулярно-генетических и клеточных механизмов развития сердца и перспективы применения результатов этих исследований для восстановления численности кардиомиоцитов в пораженном миокарде при сердечной недостаточности.

Ключевые слова: кардиомиогенез, высшие позвоночные, кардиогенная мезодерма, мастер-гены, сигнальные каскады, факторы транскрипции, сократительная система, пролиферация и гипертрофия кардиомиоцитов, стволовые клетки, клеточная терапия, сердечная недостаточность.

MOLECULAR MECHANISMS OF CARDIOMYOGENESIS AND PERSPECTIVES OF CARDIOMYOCYTE REGENERATION IN CARDIAC FAILURE, by V. P. Shirinsky*, A. Yu. Khapchaev, O. V. Stepanova (Russian Cardiology Research and Production Center, Moscow, 121552 Russia; *e-mail: shirinsky@cardio.ru). This review analyzes the current state in investigations of molecular, genetic and cellular mechanisms of cardiac development as well as perspectives to use this knowledge for treatment of cardiac failure by means of replenishing cardiomyocytes in damaged myocardium.

Keywords: cardiomyogenesis in higher vertebrates, cardiogenic mesoderm, master genes, signaling cascades, transcription factors, contractile system, cardiomyocyte proliferation and hypertrophy, stem cells, cell therapy, cardiac failure.

ВВЕДЕНИЕ

Хроническая сердечная недостаточность (ХСН) приобретает все больший вес в структуре заболеваемости и смертности населения развитых стран. Только в США 5 млн. человек больны ХСН, и каждый год этот диагноз ставится 500 тыс. человек. Это заболевание развивается постепенно и выражается в снижении насосной функции сердца. При этом страдает снабжение кровью всех органов и тканей, включая само сердце. У больных развивается одышка, наступает быстрая утомляемость, а в далеко зашедших случаях возникают отеки и выраженные метаболические нарушения. Причинами ХСН могут быть ишемическая болезнь, артериальная гипертония, инфаркт миокарда, токсическое и инфекционное повреждение сердца, наследственная патология сократительной системы кардиомиоцитов, аритмии и др. Эти факторы приводят к некрозу/апоптозу части клеток сердечной мышцы, которые не восполняются путем деления оставшихся кардиомиоцитов вследствие их низкой пролифера-

тивной активности. В связи с этим течение ХСН необратимо, однако во многих случаях удается замедлить патологический процесс путем применения современных лекарственных схем, электростимуляции сердца, диеты и правильного образа жизни. Тем не менее, при тяжелых формах ХСН, например, при дилатационной кардиомиопатии сохранить больному жизнь удастся только с помощью пересадки сердца или применения механических средств поддержания насосной функции левого желудочка. Основную проблему при пересадке сердца представляет нехватка донорских органов (50 тыс. человек в США умирают ежегодно, не дождавшись донорского сердца), высокая стоимость операции и необходимость постоянного приема иммунодепрессантов. Механический левый желудочек сегодня применяется лишь как временное средство поддержания жизни больного, ожидающего донорское сердце. Сложившаяся ситуация побуждает разрабатывать альтернативные подходы к восстановлению функции сердца, основанные на репопуляции пораженного миокарда кардиомиоцитами, вновь созданными из собственных клеток больного с помощью современных молекулярно-генетиче-

¹ С цветными рисунками к данной статье можно ознакомиться на веб-сайте журнала: <http://www.molecbio.com>

*Эл. почта: shirinsky@cardio.ru

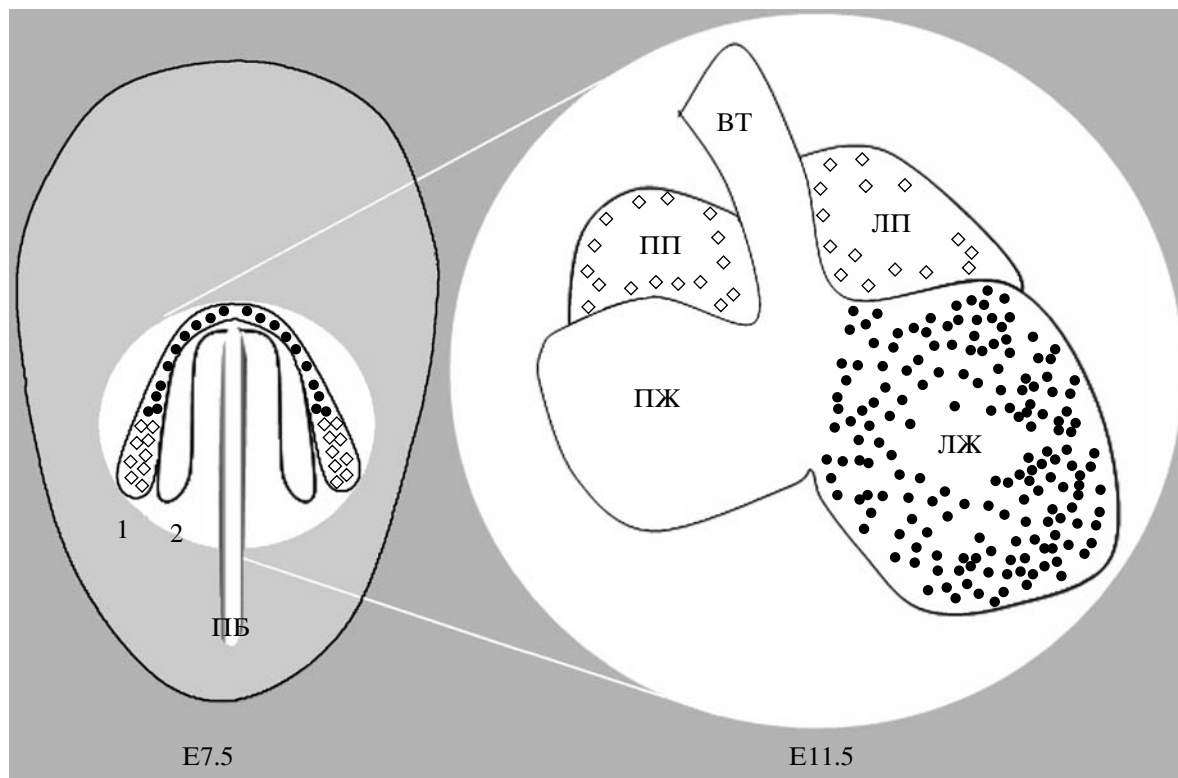


Рис. 1. Происхождение камер сердца из кардиогенной мезодермы. Эмбрион мыши на 7.5 день (E7.5) развития (на рисунке слева). Первичное (1) и вторичное (2) кардиогенные поля расположены в краниальной части по обеим сторонам первичной бороздки (пб). Красным цветом (для полиграфического варианта статьи – ●) выделены участки кардиальной мезодермы, которые развиваются к 11.5 (на рисунке справа) дню (E11.5) в левый желудочек (лж), синим цветом (для полиграфического варианта – ◇) – в левое и правое предсердие (лп, пп), светло-сиреневым цветом (для полиграфического варианта – серый) в правый желудочек (пж) и выносящий тракт (вт).

ских и клеточно-биологических методов. В настоящем обзоре рассмотрены основные тенденции в этой области.

ПОИСК МАСТЕР-ГЕНОВ КАРДИОМИОГЕНЕЗА

Наиболее последовательным путем решения проблемы “создания” новых кардиомиоцитов является расшифровка молекулярных механизмов их естественного образования в эмбриогенезе. Знания о ключевых генах кардиомиогенеза и сигнальных каскадах, в которые вовлечены их продукты, могут затем быть использованы для направленной трансформации малодифференцированных клеток-предшественников в клетки сердечной мышцы.

Эмбриогенез сердца

Сердце – первый орган, который возникает в эмбриогенезе высших позвоночных. Предшественники кардиомиоцитов выявляются уже на стадии ранней гаструлы (у птиц – на стадии 3 по Hamburger-Hamilton (HH3), у мыши – на стадии 6.5 дней эмбрионального развития (E6.5)), когда они представле-

ны небольшой (около 50 клеток у мыши) популяцией, располагающейся по обеим сторонам и ближе к краниальной части формирующейся первичной полоски [1, 2]. Во время гаструляции часть клеток наружного зародышевого листка (в том числе, предшественники кардиомиоцитов), претерпевая переход из эктодермально-эпителиальных в мезодермальные, мигрирует через первичную полосу, формируя мезодермальный листок. На этой стадии происходит дивергенция предшественников кардиомиоцитов, образующих затем первичное и вторичное кардиогенные поля [3]. Предшественники кардиомиоцитов быстро мигрируют по полуокружностям в краниолатеральном направлении с обеих сторон от срединной линии, формируя на стадии HH5-6 у цыпленка [4] и E7.5 у мыши [2] первичное кардиогенное поле (рис. 1). Данная область представлена в форме полумесяца по обеим сторонам от срединной линии. На этой стадии развития клетки кардиогенной мезодермы активно пролиферируют [5], при этом кардиогенное поле приобретает медиолатеральную гетерогенность: предшественники левого желудочка и предсердий располагаются в латеральных областях, тогда как предшественники правого желудочка и выносящего тракта лока-

лизуются в медиальной области (вторичное кардиогенное поле). На следующем этапе развития билатеральные участки первичного кардиогенного поля сливаются с образованием сократимой сердечной трубки, последняя начинает складываться вправо и впоследствии формирует четырехкамерное сердце [6, 7]. Клетки вторичного кардиального поля активно рекрутируются формирующимся сердцем на стадии изгиба сердечной трубки и формирования сердечных камер, участвуя в формировании правого желудочка и выносящего тракта [8–10]. Согласно результатам трансплантационных исследований на ранних эмбрионах (HH3 у цыпленка), клетки кардиогенной мезодермы характеризуются необратимостью кардиального пути развития, тогда как на предыдущих этапах судьба клеток, мигрирующих в кардиогенное поле, еще не определена окончательно. Собственно дифференцировка кардиомиоцитов, т.е. появление у них специализированных сократительных структур, происходит непосредственно перед образованием сердечной трубки [1].

Молекулы и гены, участвующие в кардиомиогенезе

Несмотря на достаточно подробную морфологическую картину формирования сердца, молекулярно-генетические механизмы, лежащие в основе этого процесса, во многом неясны. Существенный импульс поиску регуляторов кардиомиогенеза придало обнаружение так называемых “мастер-генов”, управляющих дифференцировкой скелетной мышцы. В течение короткого времени были найдены четыре близкородственных фактора транскрипции – MyoD, Myf5, Mrf4 и миогенин (MyoG), относящихся к классу факторов bHLH (basic helix-loop-helix), которые управляли дифференцировкой предшественников миоцитов скелетных мышц в зрелые мышечные волокна [11, 12]. Более того, биосинтез MyoD в клетках различного типа, таких как фибробласты, нейроны, адипоциты, приводил к их трансдифференцировке в скелетные миоциты [13]. Таким образом, в случае скелетного миогенеза удалось идентифицировать ограниченное число генов, которые кодируют факторы транскрипции, способные активировать и поддерживать скелетно-мышечный фенотип и одновременно репрессировать альтернативные программы развития в клетках. Вместе с тем, совокупность эмбриональных сигналов, приводящих к активации биосинтеза наиболее ранних миогенных факторов MyoD и Myf5, остается невыясненной.

Несмотря на большое сходство в строении и функциях скелетной и сердечной мышцы, оказалось, что ни MyoD, ни его гомологи не принимают участия в дифференцировке кардиомиоцитов, указывая на значительные различия этих двух программ развития. Тем не менее, изучение молекулярно-генетических механизмов кардиомиогенеза ак-

тивно продолжается, и ниже мы проанализируем современное состояние этой проблемы.

В настоящее время идентифицирован ряд факторов транскрипции и внеклеточных сигнальных молекул, вовлеченных в формирование сердца на различных этапах кардиогенеза (рис. 2). Установлено, что важнейшую роль в формировании кардиогенной мезодермы и в ее последующей диверсификации играют морфогенные сигналы, поступающие из энтодермы и эктодермы, и представленные такими семействами молекул, как Wnt (Wingless + Int-1), BMP (Bone Morphogenic Protein), Shh (Sonic hedgehog), FGF (Fibroblast Growth Factor) и др. [14, 15]. Сочетание репрессорных и активирующих воздействий создает, вероятно, уникальный фон для реализации кардиогенной программы в мезодерме и экспрессии кардиоспецифичных генов, начиная с мастер-генов.

Обнаружение у *Drosophila melanogaster* гена *tinman* (NK4), продукт которого относится к семейству NK гомеобоксных факторов транскрипции и необходим для формирования примитивного сердца этой плодовой мушки [16], привлекло внимание к гену *csx/nkx2-5* – гомологу гена *tinman* у позвоночных [17], как к возможному мастер-гену кардиогенеза. Nkx2-5 появляется уже в прекардиальном “полумесяце” и его содержание в сердце сохраняется на высоком уровне в течение всей жизни. У мышей *nkx2-5*^{-/-} эмбриональное развитие прерывалось на стадиях E9-10 в результате нарушения изгиба сердечной трубки [18], однако в отличие от дрозофилы с генотипом *tinman*^{-/-} формирование сердечной трубки и возникновение бьющихся кардиомиоцитов не нарушалось, хотя снижалось содержание ряда кардиоспецифичных белков, таких как ANP, BNP, MLC2v, Mef2C, eHAND/dHAND, Irf4, CARP, HOP, N-мус. Возможно, при делеции *nkx2-5* компенсаторное действие могут оказывать другие факторы семейства NK2, топология синтеза которых в эмбриональном сердце сходна, но не идентична топологии Nkx2-5 [19].

В регуляторной области гена *nkx2-5* выявлен ряд энхансеров, управляющих его кардиоспецифичной экспрессией и активных в различных областях формирующегося сердца. По-видимому, регуляция происходит с участием факторов транскрипции GATA4 и Smad1/4 [20]. Роль GATA4/6 в формировании сердца подтверждается нарушением морфогенеза сердца у мышей *gata4*^{-/-}, а также участием GATA4/6 в активации экспрессии генов структурных кардиоспецифичных белков. Однако эмбриональные клетки с генотипом *gata4*^{-/-} сохраняют способность дифференцироваться в кардиомиоциты [21]. Учитывая сказанное и тот факт, что синтез GATA4/6 не ограничен эмбриональным сердцем, факторы семейства GATA, скорее всего, не подходят на роль мастер-генов кардиогенеза.

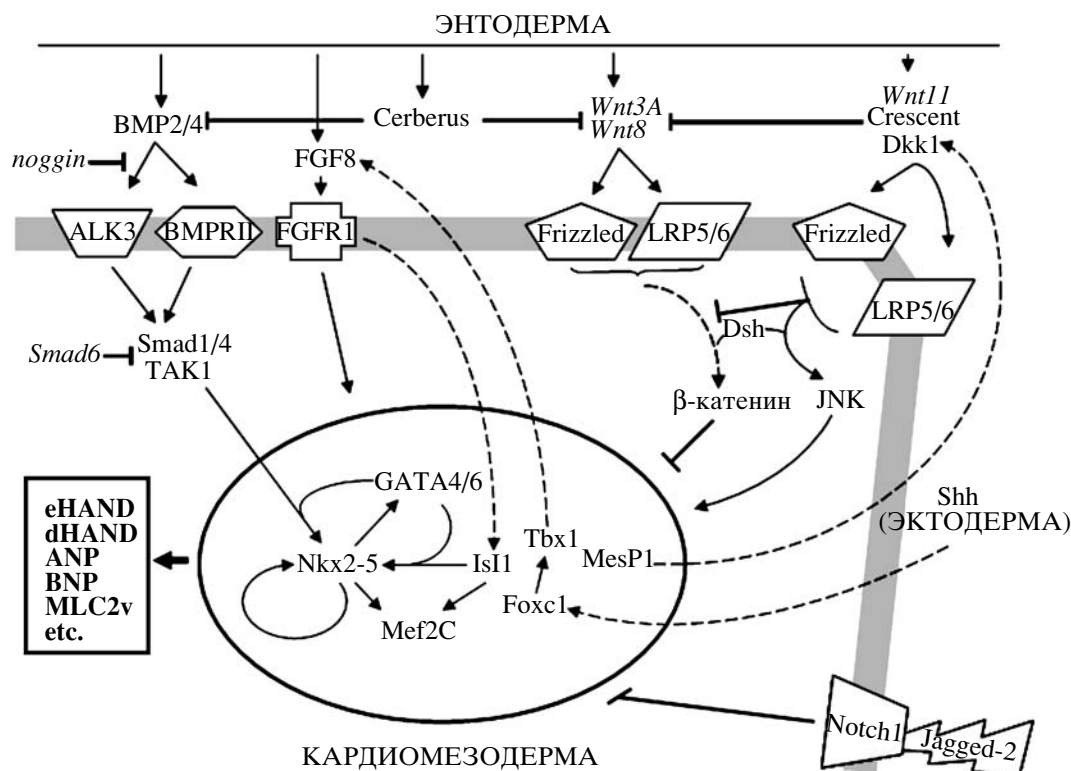


Рис. 2. Межклеточные и внутриклеточные сигнальные пути, вовлеченные в кардиомиогенез. На схеме обозначены продукты основных генов, участвующих в специализации кардиальной мезодермы и развитии сердца. Красным цветом (для полиграфического варианта – полужирный шрифт) выделены активаторные каскады, синим цветом (для полиграфического варианта – курсив) – ингибиторные каскады, черным – факторы разнонаправленного действия. Фиолетовым цветом (для полиграфического варианта – серый) показана мембрана кардиомиогенной мезодермальной клетки, овалом – ядро клетки. Объяснения в тексте.

У *Drosophila* экспрессия гена *tinman* регулируется сигналом Decapentaplegic (Dpp), входящим в суперсемейство трансформирующего фактора роста β (TGF β), с участием фактора Medea – белка семейства Smad [22]. У позвоночных гомологами Dpp являются белки семейства BMP. Способность BMP-2 и BMP-4 вызывать эктопическую экспрессию кардиоспецифичных маркеров Nkx2-5 и GATA4 *in vivo* и приводить к дифференцировке в кардиомиоциты некардиогенной мезодермы подтверждает роль этих факторов роста в дифференцировке кардиомиоцитов [23]. Как показано с помощью линии клеток P19Cl6 эмбриональной карциномы мыши, дифференцирующейся в пульсирующие кардиомиоциты в присутствии диметилсульфоксида, сигнал от BMP2/4 опосредуется белками Smad и протеинкиназой TAK1 (семейство MAPKKK), по-видимому, с участием фактора транскрипции ATF-2. При этом клетки P19Cl6, синтезирующие антагонист BMP noggin или ингибиторный Smad6, неспособны дифференцироваться в пульсирующие кардиомиоциты [24].

Другим внеклеточным сигналом дифференцировки кардиомиоцитов служит FGF, поступающий из энтодермы, прилегающей к прекардиальной ме-

зодерме. Удаление энтодермы приводит к быстрому снижению кардиоспецифичных маркеров, в том числе, Nkx2-5 и Mef2c, однако этот эффект обратим в присутствии экзогенного FGF8. Более того, эктопическое наложение сигнала FGF8 приводит к синтезу кардиоспецифичных маркеров, однако только в тех областях эмбриона, где присутствует сигнал BMP. Значение сигнализации BMP и FGF подтверждается нарушением формирования сердечной трубки при синтезе в кардиогенной мезодерме доминантно негативных рецепторов BMP (ALK3 и BMPR2) [25], а также неспособностью эмбриональных клеток с генотипом *fgfr1*^{-/-} (рецептор 1 FGF) дифференцироваться в кардиомиоциты [26].

Другие кардиогенные факторы – Nodal, член семейства TGF β , и его мембранный партнер Cripto, которые, вероятно, действуют через секретируемый белок Cerberus [27]. Cerberus является антагонистом BMP, однако ингибирует также Wnt- (см. ниже) и Nodal-сигнальные пути, будучи, по-видимому, координатором активности каждого из этих сигнальных механизмов.

Сигнальный путь Notch, представляющий собой систему коммуникации между двумя контактирующими клетками, служит механизмом подавления

кардиогенеза. Активация Notch-пути приводит к снижению экспрессии кардиоспецифичных генов в кардиогенной мезодерме, хотя синтез Nkx2-5, GATA4 и собственно кардиальная специализация не затрагиваются. При дифференцировке эмбриональных клеток снижается синтез как мембранных рецепторов Notch-1 и Notch-4, так и их мембранного лиганда Jagged-2, при этом подавление сигнального пути Notch способствует кардиогенезу, а активация Notch – выбору нейроэктодермального пути развития клеток [28].

В дифференцировке кардиомиоцитов принимает участие каноническая и неканоническая Wnt-сигнализация. Канонический путь включает связывание Wnt (Wnt1, Wnt3A, Wnt8) с мембранными рецепторами семейства Frizzled и LRP5/6 и передачу сигнала на цитоплазматический белковый комплекс, включающий фактор Dishevelled (Dsh), киназу гликогенсинтазы 3 (GSK3), белки аксин и β -катенин. Важное следствие Wnt-сигнала – ингибирование GSK3 и перемещение β -катенина в ядро, где он формирует транскрипционный комплекс с белками LEF/TCF. В отсутствие Wnt-сигнала GSK3 фосфорилирует β -катенин, приводя к его убиквитинированию и деградации. Принято считать, что репрессия канонического Wnt-сигнального пути необходима для активации кардиомиогенеза. Неканонический путь через Wnt11 включает активацию G-белков, приводящих к активации протеинкиназы JNK и ингибированию канонического пути Wnt/ β -катенин [29].

В ранней мезодерме (E6.5–E7.5) синтезируется фактор транскрипции MesP1 из семейства bHLH факторов, представляющий собой наиболее ранний молекулярный маркер предшественников кардиомиоцитов [30]. У мышей *mesp1*^{-/-} наблюдается задержка миграции мезодермальных клеток при гаструляции, не выявляется синтез Lefty2, определяющего право-левую организацию развивающегося эмбриона, а также раннего маркера краниальной мезодермы Tbx1 [31]. Недавно получены доказательства [32] кардиогенного эффекта MesP1, механизм действия которого состоит в блокировании канонической Wnt-сигнализации из энтодермы через фактор Dkk1 (белок семейства Dickkopf). Однако ранний и временный синтез MesP1 может указывать на то, что он скорее вовлечен в специализацию мезодермы, нежели собственно в формирование сердечной трубки.

В дополнение к описанным выше сигнальным путям специализация функций кардиомиоцитов и морфогенез сердечных камер регулируется и другими факторами транскрипции, которые избирательно синтезируются в различных участках формирующегося сердца. Среди таких факторов следует отметить маркер вторичного кардиального поля Isl1 (Isl1; [33]), относящийся к семейству LIM-HD факторов транскрипции, а также факторы семейства

T-box: Tbx1-5/18/20 [34] и факторы семейства HAND.

Фактор Isl1 синтезируется в мезодерме вторичного кардиогенного поля [35], где он совместно с факторами семейства GATA регулирует транскрипцию кардиоспецифичных маркеров Nkx2-5 и Mef2C [36]. У мышей *isl1*^{-/-} нарушен морфогенез сердца на стадии изгиба сердечной трубки, не образуется правый желудочек и нарушено формирование предсердий. У этих животных отсутствуют маркеры выносящего пути и правого желудочка, в том числе, FGF10 при сохранении маркеров левого желудочка, таких как eHand и Tbx5 [35]. Таким образом, функции Isl1 ограничены эволюционно и онтогенетически более поздним развитием правого желудочка, и *isl1* вряд ли подходит на роль универсального мастер-гена кардиомиогенеза.

Белки семейства T-box (Brachiury у *Drosophila*) характеризуются перекрывающимися областями синтеза в первичном и вторичном кардиогенных полях и позднее в миокарде, эндокарде и сердечных клапанах, проводящих путях и эпикарде [34]. Tbx1 активирует FGF8/10 во вторичном кардиальном поле, будучи участником сигнальной цепи, восходящей к эктодермальному морфогену Sonic hedgehog (Shh), индуцирующему мезодермальные факторы транскрипции класса Forkhead Foxc1/2, которые и активируют синтез Tbx1 [34]. У мышей *tbx1*^{-/-} подавлен синтез Isl1 и Nkx2-5 во вторичном кардиальном поле [37], что указывает на участие Tbx1 в спецификации этого поля. Вместе с тем факторы Tbx не являются строго кардиоспецифичными и критическими для формирования сократимой сердечной трубки.

Факторы транскрипции семейства bHLH, dHAND и eHAND, важные регуляторы процессов формирования камер сердца, синтезируются в правом и левом желудочках соответственно [38]. Первые этапы кардиомиогенеза происходят без участия этих факторов.

Итак, известные на сегодняшний день основные молекулярные механизмы кардиогенеза представлены разветвленной сетью активаторных и ингибиторных сигналов, в основном поступающих из энтодермы, прилегающей к кардиальной мезодерме, а также продуцируемых самой кардиальной мезодермой. В результате их действия активируется экспрессия кардиоспецифичных генов, мезодермальные клетки приобретают морфологические и функциональные признаки кардиомиоцитов и, наконец, осуществляется морфогенез многокамерного сердца. До сих пор не удалось идентифицировать кардиоспецифичные факторы транскрипции, подобные MyoD скелетных мышц, которые способны самостоятельно активировать и поддерживать дифференцировку кардиомиоцитов. В то же время устойчивость фенотипа кардиомиоцитов даже в условиях культуры клеток, где отсутствуют воз-

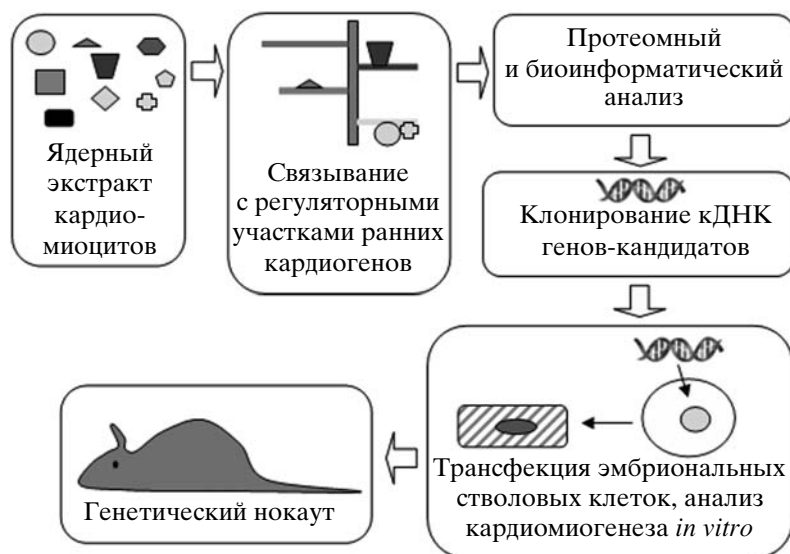


Рис. 3. Поиск мастер-генов кардиомиогенеза с применением постгеномных технологий (блок-схема).

можные внешние стабилизирующие сигналы, предполагает присутствие таких факторов в самих клетках сердечной мышцы.

Один из подходов к их выявлению – биоинформатический анализ регуляторных областей ранних кардиогенов и поиск активаторов/репрессоров транскрипции, способных взаимодействовать с этими областями. Делая логичное предположение, что регулятор транскрипции раннего кардиогена является продуктом еще более раннего гена, который, в свою очередь, регулируется набором предсуществующих факторов, можно шаг за шагом приближаться к идентификации мастер-генов кардиомиогенеза. В нашей лаборатории ведутся исследования, цель которых – выявить новые регуляторы кардиомиогенеза с помощью их аффинного выделения на колонках с иммобилизованными регуляторными участками ранних кардиогенов (*nkx2-5* и др.) и дальнейшей идентификации методами протеомики (рис. 3). Кардиогенный потенциал отобранных факторов проверяют путем экспрессии их кДНК в клетках эмбриональной карциномы мыши P19Cl6, которая дифференцируется в кардиомиоциты под действием диметилсульфоксида [39].

ФОРМИРОВАНИЕ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ КАРДИОМИОЦИТА

Миофибриллогенез

В отличие от генетической детерминации кардиомиоцитов механизмы формирования их сократительного аппарата в процессе эмбриональной дифференцировки изучены более детально. Миофибриллы зрелых кардиомиоцитов состоят из множества саркомеров, элементарных сократительных единиц, последовательно соединенных друг с дру-

гом. Границами и опорными структурами саркомера служат Z-диски, основной белок которых – саркомерный α -актинин (рис. 4). Двигательная часть саркомера состоит из системы параллельных актиновых филаментов, входящих в тело саркомера со стороны Z-дисков. В центре саркомера, заполняя пространства между актиновыми нитями, расположены биполярные миозиновые филаменты. Дополнительно в состав саркомеров входят более тонкие филаменты из гигантского белка титина, начинающиеся в Z-дисках и достигающие миозиновых филаментов. Сокращение саркомеров происходит путем АТФ-зависимого втягивания актиновых филаментов внутрь саркомера благодаря моторной активности миозиновых филаментов.

Согласно господствующим представлениям, формирование саркомер-содержащих миофибрилл в кардиомиоцитах начинается с образования премийофибрилл, мелких околочелюстных филаментарных структур, которые состоят в основном из гладкомышечного α -актина и немышечного миозина II типа В [40]. Единственный саркомерный белок премийофибрилл – α -актинин. Вместе с актином он формирует Z-тельца, предшественники Z-дисков саркомеров. Созревающие фибриллы образуются путем слияния премийофибрилл на уровне Z-тел. Далее в эти структуры включаются титин, саркомерный миозин и актин. Титину отводят роль “молекулярной линейки”, определяющей окончательные размеры саркомера и правильное расположение миозиновых и актиновых филаментов [41]. В этот же период гладкомышечный актин и немышечный миозин IIВ покидают сократительный домен саркомера. В результате созревания происходит дальнейшее латеральное укрупнение миофибрилл с образованием зрелых саркомеров, описанных выше.

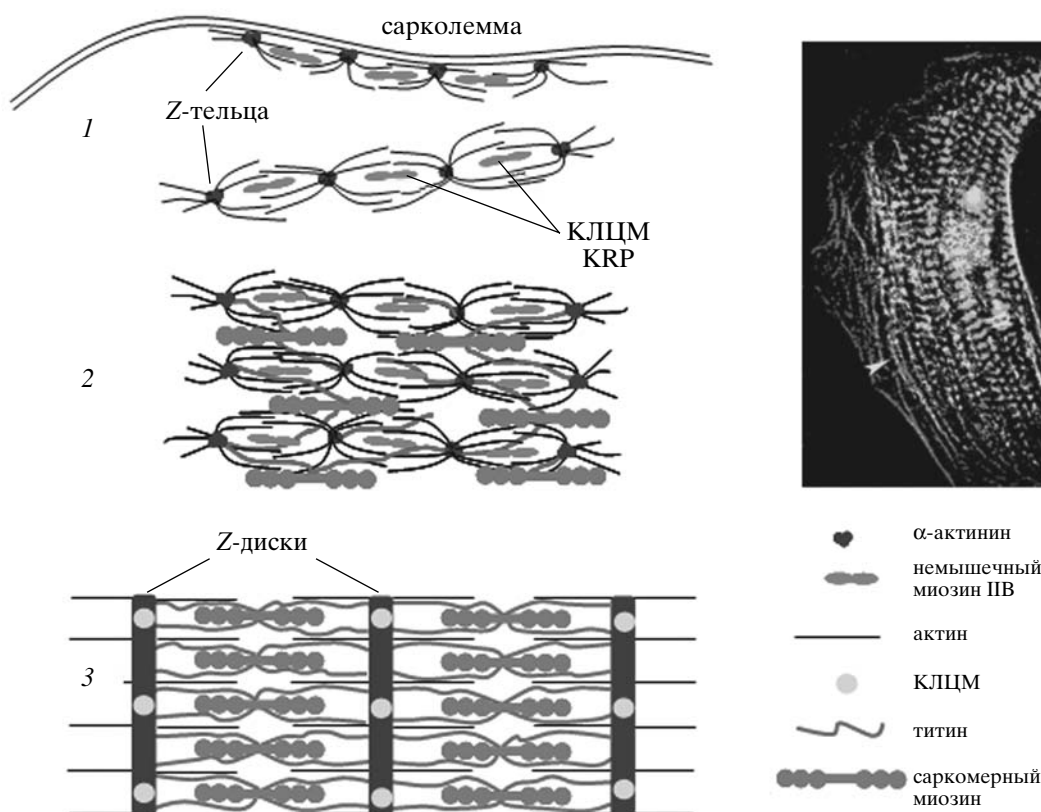


Рис. 4. Этапы миофибриллогенеза в кардиомиоцитах. 1 – Закладка премийофибрилл вблизи мембраны кардиомиоцита и их перемещение вглубь саркоплазмы. 2 – Слияние премийофибрилл и встраивание в них саркомерных белков, формирование созревающих миофибрилл. 3 – Образование зрелых миофибрилл саркомерного типа путем структуризации и укрупнения созревающих миофибрилл (согласно модели [40]). КЛЦМ и KRP, вероятно, стабилизируют структуру свободных премийофибрилл за счет поддержания филаментарного состояния немышечного миозина IIb. Справа вверху: иммунофлуоресцентное окрашивание кардиомиоцита куриного эмбриона антителами к КЛЦМ (зеленый цвет) и немышечному миозину IIb (красный цвет), желтый цвет – совместное окрашивание. КЛЦМ выявляется в Z-дисках зрелых саркомеров (двойная стрелка) и локализуется вместе с немышечным миозином IIb в миофибриллярных предшественниках (стрелка).

Получены данные о том, что стабильность премийофибрилл является критическим фактором саркомерогенеза в эмбриональных кардиомиоцитах. Немышечный миозин IIb, в отличие от саркомерного миозина, требует дополнительной стабилизации для поддержания своего филаментного состояния и, как следствие, структуры премийофибриллы. Условие стабилизации немышечного миозина – его фосфорилирование киназой легких цепей миозина 108–130 кДа (КЛЦМ108) или взаимодействие с белком KRP (Kinase-Related Protein), гомологичным С-концевому домену КЛЦМ108. Инактивация КЛЦМ или KRP приводит к ингибированию саркомерогенеза [42, 43], а повышенный уровень КЛЦМ в кардиомиоцитах ускоряет формирование саркомеров [44, 45]. Помимо КЛЦМ108 в сердце обнаружено еще несколько киназ, способных фосфорилировать регуляторные легкие цепи миозина [46]. К ним относится скелетная/сердечная КЛЦМ, а также группа протеинкиназ с более широкой специфичностью

(ROCK, ILK, ZIPK, DAPK и др.). В настоящее время нет единого мнения относительно того, который из миозинов кардиомиоцитов служит (и является ли?) субстратом для упомянутых киназ *in vivo*. Один из подходов к решению этого вопроса состоит в изучении внутриклеточной локализации протеинкиназ и миозинов в кардиомиоцитах. Мы показали, что КЛЦМ108 локализуется с немышечным миозином IIb в премийофибриллах, а также в Z-дисках зрелых саркомеров, где немышечный миозин обнаруживается в постнатальном периоде [47, 48]. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что КЛЦМ108 служит естественным стабилизатором немышечного миозина премийофибрилл. В то же время этот регуляторный белок вряд ли фосфорилирует саркомерный миозин и приводит к позитивной инотропии (т.е. усилению сокращения сердца, которое сопровождается фосфорилированием саркомерного миозина), поскольку фермент и его потенциальный субстрат пространственно разобщены. С другой

стороны, обнаружение молекулярного мотора немышечного миозина и его регулятора КЛЦМ108 в Z-дисках свидетельствует о том, что эти структуры саркомеров тоже могут быть подвижны. Наши предварительные данные указывают на то, что некоторые из перечисленных новых протеинкиназ, способных активировать миозин, ассоциированы с Z-дисками кардиомиоцитов и могут быть альтернативными активаторами локализованного в них немышечного миозина IIВ. Назначение немышечного миозина в Z-дисках неизвестно. Возможно, он предотвращает растяжение и деформацию Z-дисков при сокращении саркомеров.

Гиперплазия и гипертрофия кардиомиоцитов: смена тактики в развитии

В течение эмбриогенеза масса сердца увеличивается за счет деления кардиомиоцитов (гиперплазии). При этом сердце уже функционирует, и кардиомиоциты сокращаются. Как же осуществляют одновременно два малосовместимых процесса – дифференцировка и пролиферация? Показано, что для прохождения полного цикла клеточного деления эмбриональным кардиомиоцитам необходимо разобрать миофибриллы, которые мешают расхождению хромосом и цитотомии. При этом межклеточные контакты кардиомиоцитов не разбираются, что позволяет быстро восстанавливать сократительные функции сердечной ткани. После деления миофибриллы восстанавливаются [49]. По мере дифференцировки кардиомиоцитов развитие сократительного аппарата становится серьезным физическим препятствием для полноценного деления. Одновременно изменяется профиль синтеза белков, регулирующих пролиферацию [50]. В то же время в постнатальном периоде возрастает гемодинамическая нагрузка на сердце, требующая увеличения мощности миокарда, но это уже не может быть реализовано за счет гиперплазии кардиомиоцитов. Сердце избирает альтернативный путь – гипертрофию, т.е. увеличение размеров имеющихся кардиомиоцитов за счет дальнейшего развития их сократительного аппарата [51]. Для этого необходимо повышение дозы генов сократительных и регуляторных белков, что достигается сначала кариокинезом и возникновением двуядерных клеток, а при невозможности кариокинеза увеличением плоидности ядра. Плоидность кардиомиоцитов здорового взрослого человека может достигать 8–12*n* и выше, а при врожденных пороках сердца, сопровождающихся гемодинамической перегрузкой, такая плоидность наблюдается уже в раннем детстве. Интересно, что кардиомиоциты низших позвоночных сохраняют способность к делению и в постнатальный период [51]. Например, у *Danio rerio* сердце регенерирует после удаления 20% желудочка [52].

При гипертрофии взрослых кардиомиоцитов, как и при дифференцировке этих клеток в эмбрио-

гене, протекает один и тот же процесс – *de novo* саркомерогенез. Предполагается, что в обоих случаях он реализуется сходным набором молекулярных участников – белков, вовлеченных в сборку новых миофибрилл. Эта точка зрения согласуется с теми фактами, что при патологических формах гипертрофии миокарда наблюдается реактивация экспрессии эмбриональных генов, таких как *ANP*, *BNP* [53] и, по-видимому, других генов, необходимых для саркомерогенеза. По нашим данным, к группе эмбриональных регуляторов саркомерогенеза, реактивирующихся при гипертрофии, относится и белок KRP, вероятный стабилизатор немышечного миозина IIВ в составе премийофибрилл. Его содержание высоко в эмбриональном сердце и значительно снижается в постнатальном миокарде [54], однако оно вновь возрастает при гипертрофии миокарда различного генеза у животных и человека [55–57].

Таким образом, закономерности пролиферации, саркомерогенеза и гипертрофии рабочих кардиомиоцитов у высших позвоночных, включая человека, не предусматривают эффективную регенерацию этих клеток при необратимом повреждении постнатального миокарда. Для лечения тяжелой сердечной недостаточности скорее всего потребуются введение экзогенных кардиомиоцитов или их предшественников, полученных в результате направленной дифференцировки *in vitro*.

КЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Бурное развитие исследований в области стволовых клеток в конце XX – начале XXI века стимулировало работы по применению различных клеточных популяций животных и человека для восстановления поврежденного миокарда. Основная идея этих подходов состоит в том, что стволовые клетки, обладая очень широкими возможностями к специализации, могут дифференцироваться в различные типы клеток, в том числе, в кардиомиоциты. На самом деле такими свойствами в полной мере обладают эмбриональные стволовые клетки человека и животных. Однако клиническое применение эмбриональных стволовых клеток сталкивается со множеством проблем, начиная с иммунологического конфликта с реципиентом и возможности образования опухолей и заканчивая морально-этическими вопросами получения этих клеток. Альтернативу представляют стволовые клетки взрослого организма, т.е. того больного, которому они затем и будут имплантированы. Наиболее широко с этой целью используются полные или фракционированные аспираты моноклеарных клеток костного мозга, циркулирующие в крови клетки-предшественники, миобласты скелетных мышц, малодифференцированные клетки из жировой ткани. Такие трансплантации выполняют как в эксперименте,

так и в условиях клиники, и накопленные данные позволяют сделать некоторые заключения [58–61]. Во-первых, стволовые свойства этих клеток несколько преувеличены. Некоторые из них способны лишь к ограниченной дифференцировке обычно в пределах одного исходного зародышевого листка (например, мезодермы – эндотелий, остеобласты, хондробласты). Скелетные миообласты, не способные изменять направления дифференцировки, развиваются в скелетно-мышечные волокна, которые могут изолированно существовать в миокарде и сокращаться. Их имплантация больным часто приводила к развитию аритмий, что создало у клиницистов настороженное отношение к этому способу восстановления функции миокарда [61]. Трансдифференцировка клеток костного мозга, помещенных в миокард, в кардиомиоциты строго не доказана и вызывает справедливые дискуссии, а положительные результаты могут объясняться слиянием костномозговых клеток с кардиомиоцитами хозяина [60]. Тем не менее, введение взрослых костномозговых клеток-предшественников больным, перенесшим инфаркт миокарда, имело статистически достоверное положительное воздействие на фракцию выброса левого желудочка (в среднем +3%) и другие параметры деятельности сердца [59]. В то же время это улучшение было незначительным и сохранялось недолго. При внутрикоронарном введении лишь 1–11% введенных клеток удерживалось в сердце в первые часы, далее их количество падало. Через две недели после введения непосредственно в сердечную мышцу в местах инъекции также выявлялось менее 3% клеток [58]. Таким образом, временное положительное воздействие клеточной терапии при инфаркте миокарда, скорее всего, не связано с образованием новых кардиомиоцитов, а объясняется паракринным воздействием введенных клеток, которые снижают дальнейшее повреждение сердца, ингибируют апоптоз кардиомиоцитов и стимулируют ангиогенез.

В этой ситуации в качестве одного из перспективных естественных источников кардиомиоцитов для восстановления сократительной системы миокарда рассматривают так называемые стволовые клетки сердца [62]. Они присутствуют в эмбриональном и взрослом миокарде и несут как маркеры стволовых клеток *c-kit*, *Sca-1*, *Isl-1*, так и маркеры кардиомиогенного пути развития *GATA-4*, *Mef2C*, *TEF-1*, *Nkx2-5* и др. [60]. При дифференцировке *in vitro* часть из них синтезирует характерные сократительные белки кардиомиоцитов, организованные в саркомеры, и обладает способностью к сокращению. Эти клетки могут представлять собой кардиомиоцитарный резерв сердца, однако, как хорошо известно из медицинской практики, его эффективности недостаточно при массивном повреждении миокарда, когда потеря исчисляется сотнями миллионов кардиомиоцитов. Вероятно, для терапевтического использования миокардиальных

стволовых клеток их нужно будет извлекать из сердца больного, размножать в культуре и ретрансплантировать. Это несложно сделать при операции на открытом сердце (например, при аневризмэктомии), но проблематично в других случаях. В связи с этим разработка методов направленной дифференцировки легко получаемых клеток-предшественников с помощью мастер-генов кардиомиогенеза выглядит привлекательной альтернативой. В качестве доступного источника малодифференцированных клеток взрослого человека могут быть использованы мезенхимальные клетки из костного мозга, клетки-предшественники из жировой ткани и др. Появляется возможность генетически манипулировать и стволовыми клетками из пуповинной крови, сбор и хранение которых налаживается в России и за рубежом. В любом случае, знание молекулярно-генетических основ развития кардиомиоцитов позволит управлять поведением вновь дифференцируемых клеток, в частности, замедлять скорость саркомерогенеза, чтобы дать возможность этим клеткам увеличить численность, мигрировать в ткань миокарда из мест введения и установить контакты с кардиомиоцитами хозяина. Последующая активация гипертрофического ответа кардиомиоцитов позволит быстро нарастить сократительный потенциал трансплантированных клеток и в итоге восстановить насосную функцию сердца.

Вариантом репарации сердца вновь дифференцированными кардиомиоцитами является тканевая инженерия – технология создания ткани миокарда *in vitro* и использование искусственной мышцы для усиления сократительной активности пораженного миокарда [63]. Экспериментальные исследования в этой области пока с применением естественных кардиомиоцитов показывают, что в принципе можно создать не только “заплатки” на сердце, но и целый орган, способный перекачивать кровь [64].

Итак, есть веские основания ожидать, что синтез фундаментальных исследований механизмов кардиомиогенеза и прикладных технологий наработки и введения в миокард аутологичных мультипотентных клеток позволит создать принципиально новые методы лечения сердечной недостаточности, возвращающие сердцу его былую силу.

Работа получила финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (07-04-01727-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schoenwolf G.C., Garcia-Martinez V. 1995. Primitive-streak origin and state of commitment of cells of the cardiovascular system in avian and mammalian embryos. *Cell. Mol. Biol. Res.* **41**, 233–240.
2. Tam P.P., Parameswaran M., Kinder S.J., Weinberger R.P. 1997. The allocation of epiblast cells to the embryonic heart and other mesodermal lineages: the role of ingres-

- sion and tissue movement during gastrulation. *Development*. **124**, 1631–1642.
3. Meilhac S.M., Kelly R.G., Rocancourt D., Eloy-Trinquet S., Nicolas J.F., Buckingham M.E. 2003. A retrospective clonal analysis of the myocardium reveals two phases of clonal growth in the developing mouse heart. *Development*. **130**, 3877–3889.
 4. Yang X., Dormann D., Munsterberg A.E., Weijer C.J. 2002. Cell movement patterns during gastrulation in the chick are controlled by positive and negative chemotaxis mediated by FGF4 and FGF8. *Dev. Cell*. **3**, 425–437.
 5. Rosenquist G.C. 1982. Endoderm/mesoderm multiplication rates in stage 5–12 chick embryos. *Anat. Rec.* **202**, 95–103.
 6. Abu-Issa R., Kirby M.L. 2007. Heart field: from mesoderm to heart tube. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **23**, 45–68.
 7. Srivastava D. 2006. Making or breaking the heart: from lineage determination to morphogenesis. *Cell*. **126**, 1037–1048.
 8. Kelly R.G., Brown N.A., Buckingham M.E. 2001. The arterial pole of the mouse heart forms from Fgf10-expressing cells in pharyngeal mesoderm. *Dev. Cell*. **1**, 435–440.
 9. Mjaatvedt C.H., Nakaoka T., Moreno-Rodriguez R., Norris R.A., Kern M.J., Eisenberg C.A., Turner D., Markwald R.R. 2001. The outflow tract of the heart is recruited from a novel heart-forming field. *Dev. Biol.* **238**, 97–109.
 10. Waldo K.L., Kumiski D.H., Wallis K.T., Stadt H.A., Hutson M.R., Platt D.H., Kirby M.L. 2001. Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field. *Development*. **128**, 3179–3188.
 11. Braun T., Buschhausen-Denker G., Bober E., Tannich E., Arnold H.H. 1989. A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. *EMBO J.* **8**, 701–709.
 12. Rhodes S.J., Konieczny S.F. 1989. Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes Dev.* **3**, 2050–2061.
 13. Weintraub H., Tapscott S.J., Davis R.L., Thayer M.J., Adam M.A., Lassar A.B., Miller A.D. 1989. Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **86**, 5434–5438.
 14. Lough J., Sugi Y. 2000. Endoderm and heart development. *Dev. Dyn.* **217**, 327–342.
 15. Pal R., Khanna A. 2007. Heart development: the battle between mesoderm and endoderm. *Stem Cells Dev.* **16**, 3–5.
 16. Bodmer R. 1993. The gene *tinman* is required for specification of the heart and visceral muscles in *Drosophila*. *Development*. **118**, 719–729.
 17. Komuro I., Izumo S. 1993. Csx: a murine homeobox-containing gene specifically expressed in the developing heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **90**, 8145–8149.
 18. Lyons I., Parsons L.M., Hartley L., Li R., Andrews J.E., Robb L., Harvey R.P. 1995. Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene Nkx2-5. *Genes Dev.* **9**, 1654–1666.
 19. Akazawa H., Komuro I. 2005. Cardiac transcription factor Csx/Nkx2-5: Its role in cardiac development and diseases. *Pharmacol. Ther.* **107**, 252–268.
 20. Schwartz R.J., Olson E.N. 1999. Building the heart piece by piece: modularity of cis-elements regulating Nkx2-5 transcription. *Development*. **126**, 4187–4192.
 21. Narita N., Bielinska M., Wilson D.B. 1997. Cardiomyocyte differentiation by GATA-4-deficient embryonic stem cells. *Development*. **124**, 3755–3764.
 22. Xu X., Yin Z., Hudson J.B., Ferguson E.L., Frasch M. 1998. Smad proteins act in combination with synergistic and antagonistic regulators to target Dpp responses to the *Drosophila* mesoderm. *Genes Dev.* **12**, 2354–2370.
 23. Schultheiss T.M., Burch J.B., Lassar A.B. 1997. A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis. *Genes Dev.* **11**, 451–462.
 24. Monzen K., Hiroi Y., Kudoh S., Akazawa H., Oka T., Takimoto E., Hayashi D., Hosoda T., Kawabata M., Miyazono K., Ishii S., Yazaki Y., Nagai R., Komuro I. 2001. Smads, TAK1, and their common target ATF-2 play a critical role in cardiomyocyte differentiation. *J. Cell Biol.* **153**, 687–698.
 25. Shi Y., Katsev S., Cai C., Evans S. 2000. BMP signaling is required for heart formation in vertebrates. *Dev. Biol.* **224**, 226–237.
 26. Dell'Era P., Ronca R., Coco L., Nicoli S., Metra M., Presta M. 2003. Fibroblast growth factor receptor-1 is essential for in vitro cardiomyocyte development. *Circ. Res.* **93**, 414–420.
 27. Foley A.C., Gupta R.W., Guzzo R.M., Korol O., Mersola M. 2006. Embryonic heart induction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1080**, 85–96.
 28. Pedrazzini T. 2007. Control of cardiogenesis by the Notch pathway. *Trends Cardiovasc. Med.* **17**, 83–90.
 29. Eisenberg L.M., Eisenberg C.A. 2007. Evaluating the role of Wnt signal transduction in promoting the development of the heart. *Sci. World J.* **7**, 161–176.
 30. Saga Y., Miyagawa-Tomita S., Takagi A., Kitajima S., Miyazaki J., Inoue T. 1999. MesP1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube. *Development*. **126**, 3437–3447.
 31. Kitajima S., Takagi A., Inoue T., Saga Y. 2000. MesP1 and MesP2 are essential for the development of cardiac mesoderm. *Development*. **127**, 3215–3226.
 32. David R., Brenner C., Stieber J., Schwarz F., Brunner S., Vollmer M., Mentele E., Muller-Hocker J., Kitajima S., Lickert H., Rupp R., Franz W.M. 2008. MesP1 drives vertebrate cardiovascular differentiation through Dkk-1-mediated blockade of Wnt-signalling. *Nat. Cell Biol.* **10**, 338–345.
 33. Dodou E., Verzi M.P., Anderson J.P., Xu S.M., Black B.L. 2004. Mef2c is a direct transcriptional target of ISL1 and GATA factors in the anterior heart field during mouse embryonic development. *Development*. **131**, 3931–3942.
 34. Stennard F.A., Harvey R.P. 2005. T-box transcription factors and their roles in regulatory hierarchies in the developing heart. *Development*. **132**, 4897–4910.
 35. Cai C.L., Liang X., Shi Y., Chu P.H., Pfaff S.L., Chen J., Evans S. 2003. Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev. Cell*. **5**, 877–889.

36. Black B.L. 2007. Transcriptional pathways in second heart field development. *Semin. Cell Dev. Biol.* **18**, 67–76.
37. Liao J., Aggarwal V.S., Nowotschin S., Bondarev A., Lipner S., Morrow B.E. 2008. Identification of downstream genetic pathways of Tbx1 in the second heart field. *Dev. Biol.*
38. Srivastava D. 1999. HAND proteins: molecular mediators of cardiac development and congenital heart disease. *Trends Cardiovasc. Med.* **9**, 11–18.
39. Habara-Ohkubo A. 1996. Differentiation of beating cardiac muscle cells from a derivative of P19 embryonal carcinoma cells. *Cell Struct. Funct.* **21**, 101–110.
40. Dabiri G.A., Turnacioglu K.K., Sanger J.M., Sanger J.W. 1997. Myofibrillogenesis visualized in living embryonic cardiomyocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 9493–9498.
41. Whiting A., Wardale J., Trinick J. 1989. Does titin regulate the length of muscle thick filaments? *J. Mol. Biol.* **205**, 263–268.
42. Chadin A.V., Dudnakova T.V., Stepanova O.V., Shirinsky V.P. 2006. Kinase-related protein (telokin) is involved in sarcomerogenesis in chicken embryo cardiomyocytes. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **27**, 503.
43. Du A., Sanger J.M., Linask K.K., Sanger J.W. 2003. Myofibrillogenesis in the first cardiomyocytes formed from isolated quail precardiac mesoderm. *Dev. Biol.* **257**, 382–394.
44. Aoki H., Sadoshima J., Izumo S. 2000. Myosin light chain kinase mediates sarcomere organization during cardiac hypertrophy *in vitro*. *Nat. Med.* **6**, 183–188.
45. Seguchi O., Takashima S., Yamazaki S., Asakura M., Asano Y., Shintani Y., Wakeno M., Minamino T., Kondo H., Furukawa H., Nakamaru K., Naito A., Takahashi T., Ohtsuka T., Kawakami K., Isomura T., Kitamura S., Tomoike H., Mochizuki N., Kitakaze M. 2007. A cardiac myosin light chain kinase regulates sarcomere assembly in the vertebrate heart. *J. Clin. Invest.* **117**, 2812–2824.
46. Чадин А.В., Белокурова М.В., Степанова О.В., Иванова М.В., Ширинский В.П. 2006. Содержание миозинактивирующих протеинкиназ в миокарде пациентов с дилатационной кардиомиопатией и в сердце животных. *Биофизика.* **51**, 924–928.
47. Dudnakova T.V., Stepanova O.V., Dergilev K.V., Chadin A.V., Shekhonin B.V., Watterson D.M., Shirinsky V.P. 2006. Myosin light chain kinase colocalizes with non-muscle myosin IIB in myofibril precursors and sarcomeric Z-lines of cardiomyocytes. *Cell Motil. Cytoskeleton.* **63**, 375–383.
48. Takeda K., Yu Z.X., Qian S., Chin T.K., Adelstein R.S., Ferrans V.J. 2000. Nonmuscle myosin II localizes to the Z-lines and intercalated discs of cardiac muscle and to the Z-lines of skeletal muscle. *Cell Motil. Cytoskeleton.* **46**, 59–68.
49. Ahuja P., Perriard E., Perriard J.C., Ehler E. 2004. Sequential myofibrillar breakdown accompanies mitotic division of mammalian cardiomyocytes. *J. Cell Sci.* **117**, 3295–3306.
50. Ahuja P., Perriard E., Pedrazzini T., Satoh S., Perriard J.C., Ehler E. 2007. Re-expression of proteins involved in cytokinesis during cardiac hypertrophy. *Exp. Cell Res.* **313**, 1270–1283.
51. Румянцев П.П. 1982. Кардиомиоциты в процессах репродукции, дифференцировки и регенерации. Ленинград: Наука.
52. Poss K.D., Wilson L.G., Keating M.T. 2002. Heart regeneration in zebrafish. *Science.* **298**, 2188–2190.
53. Hunter J.J., Chien K.R. 1999. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N. Engl. J. Med.* **341**, 1276–1283.
54. Birukov K.G., Schavocky J.P., Shirinsky V.P., Chibalina M.V., van Eldik L.J., Watterson D.M. 1998. Organization of the genetic locus for chicken myosin light chain kinase is complex: multiple proteins are encoded and exhibit differential expression and localization. *J. Cell. Biochem.* **70**, 402–413.
55. Dudnakova T.V., Lakomkin V.L., Tsyplenkova V.G., Shekhonin B.V., Shirinsky V.P., Kapelko V.I. 2003. Alterations in myocardial ultrastructure and protein expression after a single injection of isoproterenol. *Mol. Cell. Biochem.* **252**, 173–181.
56. Dudnakova T.V., Lakomkin V.L., Tsyplenkova V.G., Shekhonin B.V., Shirinsky V.P., Kapelko V.I. 2003. Alterations in myocardial cytoskeletal and regulatory protein expression following a single Doxorubicin injection. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **41**, 788–794.
57. Браниште Т.А., Дуднакова Т.В., Дергилев К.В., Северин В.В., Наумов В.Г., Ширинский В.П., Беленков Ю.Н. 2004. Экспрессия сократительных и цитоскелетных белков в миокарде больных дилатационной кардиомиопатией. *Кардиология.* **44**, 31–36.
58. Kocher A.A., Schlechta B., Gasparovicova A., Wolner E., Bonaros N., Laufer G. 2007. Stem cells and cardiac regeneration. *Transpl. Int.* **20**, 731–746.
59. Lipinski M.J., Biondi-Zoccai G.G., Abbate A., Khianey R., Sheiban I., Bartunek J., Vanderheyden M., Kim H.S., Kang H.J., Strauer B.E., Vetrovec G.W. 2007. Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute myocardial infarction: a collaborative systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *J. Am. Coll. Cardiol.* **50**, 1761–1767.
60. van Laake L.W., Hassink R., Doevendans P.A., Mummery C. 2006. Heart repair and stem cells. *J. Physiol.* **577**, 467–478.
61. Wollert K.C., Drexler H. 2005. Clinical applications of stem cells for the heart. *Circ. Res.* **96**, 151–163.
62. Hierlihy A.M., Seale P., Lobe C.G., Rudnicki M.A., Megeney L.A. 2002. The post-natal heart contains a myocardial stem cell population. *FEBS Lett.* **530**, 239–243.
63. Zimmermann W.H., Melnychenko I., Wasmeier G., Diehl M., Naito H., Nixdorff U., Hess A., Budinsky L., Brune K., Michaelis B., Dhein S., Schwoerer A., Ehmke H., Eschenhagen T. 2006. Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. *Nat. Med.* **12**, 452–458.
64. Ott H.C., Matthiesen T.S., Goh S.K., Black L.D., Kren S.M., Netoff T.I., Taylor D.A. 2008. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat. Med.* **14**, 213–221.