

Изучение морфологических и электрофизиологических свойств телоцитов синусного узла и миокарда для диагностики и клеточной терапии нарушений ритма сердца

Актуальность исследования

Синусный узел человека представлен грубоволокнистой фиброзной тканью, среди которой находятся клетки-пейсмекеры, переходные клетки проводящей системы сердца, а по периферии – клетки типа клеток Пуркинье. В центре узла клетки-пейсмекеры не контактируют с переходными клетками и «замурованы» в фиброзную ткань. Непонятно, как же распространяется электрический импульс от центра к периферии, к рабочему миокарду. Телоциты (клетки Кахаля) – уникальный тип интерстициальных клеток со специфическими отростками – телоподиями и дилатированными сегментами – подомами. Они одновременно имеют иммунофенотип интерстициальных, сосудистых и нервных клеток, несколько разновидностей клеточных контактов, в том числе gap junction, и образуют 3D-сеть практически во всех органах. Известно при этом, что функции телоцитов, равно как и электрофизиологические характеристики крайне разнообразны и зависят от органа. Телоциты являются клетками-пейсмекерами в желудочно-кишечном тракте, мочевом пузыре, миометрии и фаллопиевых трубах. Клетки были найдены и в миокарде. Некоторые авторы предполагают, что телоциты могут играть роль в аритмогенезе.

Научная платформа

Платформы: патологическая анатомия, кардиология, клеточная биология, физиология, кардиохирургия

Планируемый (ые) научные подразделения исполнители (с указанием руководителя исследования)

Руководитель исследования – заведующая НИЛ патоморфологии, д.м.н. Митрофанова Л.Б.

Исполнители:

Институт молекулярной биологии и генетики

Биобанк

НИО кардиоторакальной хирургии

Ключевые слова

Телоциты, мезенхимные стромальные клетки, синусный узел человека, проводящая система сердца, локальная фиксация потенциала (patch clamp), натриевые каналы, кальциевые каналы, иммуногистохимическое исследование

Цель проекта

Поиск и изучение морфологических характеристик телоцитов и их возможной роли в генерации и проведении электрического импульса в синусном узле сердца человека

Задачи проекта

1. С помощью гистологического, иммуногистохимического исследования, конфокальной лазерной и электронной микроскопии, электронной иммуноцитохимии найти телоциты в синусном узле человека
2. Изучить морфологические особенности клеток Кахаля в синусном узле человека и сравнить их с телоцитами рабочего миокарда

3. Разработать методику получения первичной культуры мезенхимных стромальных клеток синусного узла сердца человека
4. Разработать методику сепарации фракции телоцитов из первичной культуры мезенхимных стромальных клеток синусного узла сердца человека
5. Определить критерии морфологической, иммунофенотипической и иммуноцитохимической характеристик телоцитов в культуре и их дифференциации от остальных клеточных фракций в нише стромальных клеток
6. Оценить электрофизиологические свойства телоцитов синусного узла человека, возможную способность генерировать и проводить электрический импульс

Ожидаемые результаты проекта

1. Результаты проведенного исследования позволят выявить телоциты в синусном узле человека и доказать их возможную роль в генерации и проведении электрического импульса, а главное, в аритмогенезе.
2. Будет разработан рутинный протокол получения и охарактеризования культуры телоцитов синусного узла сердца человека
3. Будут определены электрофизиологические характеристики телоцитов синусного узла человека, их способности к генерации и передаче электрического импульса к рабочему миокарду
4. Результатом исследования будет разработка алгоритма применения телоцитов в клеточной терапии нарушений ритма сердца человека

Назначение и предполагаемое использование (внедрение) результатов проекта

Назначение результатов проекта – уникальный научный материал и новая технология, а также создание методической базы для изучения биологических свойств телоцитов сердца человека. Понимание фундаментальных морфологических и электрофизиологических свойств телоцитов проводящей системы и рабочего миокарда позволит изучать изменение функционального состояния телоцитов в норме и патологии, а также их роли в аритмогенезе, нарушениях ритма сердца человека. На основании полученных данных в дальнейшем будут разработаны протоколы клинического применения культур телоцитов в регенеративной терапии, в том числе при инфаркте миокарда, кардиосклерозе, нарушениях ритма.

Описание предлагаемого научного исследования

Предлагаемое научное исследование направлено на решение актуальной, крупной научной проблемы – изучения патогенеза заболеваний сердца в целом и нарушений ритма сердца в частности, а также их возможного лечения с помощью регенераторной клеточной терапии на основе изучения морфологических и функциональных свойств телоцитов. Поиск и изучение роли телоцитов в генерации и проведении электрического импульса в сердце приведет к самостоятельному научному открытию, а разработка стандартного рутинного протокола получения и охарактеризования культур телоцитов, морфологическое и электрофизиологическое исследование их характеристик позволит в дальнейшем осуществлять пересадку культур в заданный участок сердца.

Кроме того, в настоящее время не существует единого общепринятого способа сепарации и культивирования телоцитов. Единственным эффективным, предложенным на сегодняшний день, способом сепарации изолированной фракции телоцитов является клеточный сортинг по поверхностным маркерам. Однако данные литературы по однозначному определению иммунофенотипа телоцитов расходятся. Также, данные литературы не позволяют судить о наличии однозначных критериев морфологической и иммуноцитохимической оценки культур телоцитов и их дифференциации от остальных фракций ниши стромальных клеток.

На аутопсийном и операционном материале будет проведено сравнительное морфологическое исследование телоцитов синусного узла и рабочего миокарда человека. Будет проведено сравнение различных подходов к получению изолированных культур телоцитов. Будет проведен анализ различных мембранных и цитоплазматических маркеров, экспрессируемых телоцитами, и определен иммунофенотип, однозначно дифференцирующий телоциты от остальных фракций клеток стромальной ниши. Будут оценены следующие функциональные характеристики телоцитов: плотность токов, вольт-амперная характеристика, потенциал реверсии, зависимость от мембранного потенциала стационарных активации и инактивации, постоянные времени быстрой и медленной инактивации и восстановление после инактивации. Вычленение различных токов будет реализовано использованием селективных блокаторов.

Описание научных подходов и методов, используемых для решения поставленных задач

Морфологический этап исследования предполагает создание четкого алгоритма выделения синусного узла при макроскопическом исследовании, гистологическое и иммуногистохимическое исследование с антителами к CD117, CD34, vimentin, S100, HCN4, connexin43 на парафиновых и замороженных срезах, иммуногистохимическое исследование с двойной меткой CD34/S100, CD34/connexin43, Vimentin/S100, HCN4/S100, конфокальную лазерную микроскопию с перечисленными коктейлями антител, CD117, с построением 3D-изображения телоцитов, электронную микроскопию синусного узла и рабочего миокарда с электронной иммуноцитохимией с HCN4. Будет проведен сравнительный морфологический анализ телоцитов в синусном узле и рабочем миокарде на аутопсийном материале (15 пациентов) и операционном материале (15 пациентов). Операционный материал будет получен при трансплантации сердца, а также при протезировании клапанов сердца. Будет проведен сравнительный анализ способов диссоциации ткани синусного узла с использованием протеолитических ферментов (коллагеназа типов II и III) в различной концентрации и с различным временем экспозиции, определено оптимальное время первичного культивирования гомогенизата ткани до выхода в культуру клеток стромальной ниши с использованием различных модификаций культуральных сред (aMEM, DMEM, DMEM/Ф12). Будет проведена работа по отделению фракции телоцитов из первичной культуры мезенхимных стромальных клеток синусного узла (из аутопсийного материала) по градиенту адгезии путем последовательного пересева культуры. Будет определено оптимальное время адгезии побочных клеточных фракций и сохранения в суспензионной фракции максимального количества телоцитов. Экспериментальные данные будут сопоставлены с данными клеточного сортирования по маркерам CD34/PDGFRb. Телоциты, полученные обоими способами, будут исследованы на другие маркеры, экспрессируемые, по данным литературы, самими телоцитами и другими мезенхимными клетками стромальной ниши – CD117, CD105, CD44 и др. методом проточной цитофлуорометрии. Также будет исследована экспрессия общего лейкоцитарного антигена CD45 в культурах телоцитов, полученных обоими способами. Помимо этого, методом иммуноцитохимического анализа будет исследована экспрессия телоцитами их основных функциональных маркеров – S100, виментина и др.

Электрофизиологические характеристики телоцитов будут исследованы с помощью метода локальной фиксации потенциала (patch clamp) в конфигурации фиксации потенциала целой клетки. Вычленение различных токов будет реализовано использованием селективных блокаторов: тетродотоксин – блокатор потенциал-зависимых натриевых каналов, нифедипин – кальциевых каналов, 4-аминопиридин – калиевых каналов.

Вольт-амперные характеристики (I/V) токов будут оценены путем деполяризации клетки от поддерживаемого потенциала -100 мВ до напряжения между -80 и 40 мВ в течение 40 мс с шагом 5 мВ. Плотность тока (рА/рF) будет получена путем нормирования амплитуды тока на емкость клетки. Емкость клетки будет оценена по величине емкостного тока, вызванного импульсом $+5$ мВ от поддерживаемого потенциала. Потенциал реверсии будет рассчитываться путем линейной экстраполяции пиковых токов при потенциалах деполяризации от 10 до 40 мВ. Стационарная активации будет рассчитываться как нормированная на максимальное значение проводимость в зависимости от подаваемого потенциала. Стационарная инактивация будет определяться как нормированный на максимальное значение ток в ответ на тестирующий потенциал в зависимости от величины гипер- или деполяризующего препотенциала. Восстановление после инактивации будет определяться по отношению тока, вызванного тестирующим потенциалом к току, вызванному препотенциалом с возрастающим интервалом между импульсами потенциалов. Временные константы, отражающие кинетику инактивации, будут оценены путем экспоненциального приближения фазы спада токов. Будет проведен статистический анализ полученных результатов.