

ВЕСЦІ

НАЦЫЯНАЛЬНАЯ
АКАДЭМІЯ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ МЕДЫКА-БІЯЛАГІЧНЫХ НАВУК 2003 № 2

ИЗВЕСТИЯ

НАЦИОНАЛЬНОЙ
АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК 2003 № 2

NEWS

OF BIOMEDICAL SCIENCES

ЗАСНАВАЛЬНІК — НАЦЫЯНАЛЬНАЯ АКАДЭМІЯ НАВУК БЕЛАРУСІ

Серия издается с января 2001 года

Выходит четыре раза в год

СОДЕРЖАНИЕ

ФИЗИОЛОГИЯ И ОБЩАЯ ПАТОЛОГИЯ

Перцов С. С., Малиновская Н. К., Веттерберг Л., Фриберг И., Вознесенская Л. А., Рапопорт С. И., Комаров Ф. И., Судаков К. В. Водно-иммерсионный эмоциональный стресс изменяет уровень мелатонина в плазме крови у крыс при введении экзогенного мелатонина	5
Янке О., Тшенгке Б., Нихельман М. Влияние высоких температур окружающей среды на образование тепла у зародышей выводковых птиц: второй механизм терморегуляции	10
Наумович Н., Филипович Д., Барак О., Лапетич Б., Иветич В., Боскович К. Особенности ЭЭГ у лиц, страдающих головными болями после частого использования мобильных телефонов	13
Булгак А. А., Гурин А. В. Экспериментальное доказательство существования необратимых реперфузионных повреждений миокарда	17
Жукова И. А., Амвросьев А. П. Состояние компонентов микроциркуляторного русла семенника после гамма облучения 20-суточных плодов крысы на стадии активного органогенеза	24
Сорокина С. Э. Изменения фетоплацентарного комплекса при внутриутробном инфицировании плода: новые перспективы изучения патогенеза	28

НЕЙРОМОРФОЛОГИЯ И НЕЙРОХИМИЯ

Швалев В. Н., Каргина-Терентьева Р. А. Исследования иннервационных связей надпочечников в возрастном аспекте и при некоторых кардиологических заболеваниях	34
Никандров В. Н., Пятин В. Ф., Алексеева А. С., Мирошниченко И. В., Якунина О. В., Новоселова А. М., Гаркун Ю. С., Мурашко О. Н., Кульчицкий В. А. Модуляция центральной респираторной активности с помощью плазминогена, стрептокиназы и их комплексов с пируваткиназой	40

БИОХИМИЯ И ЭНДОКРИНОЛОГИЯ

Перцов С. С., Кошлик Е. В., Краузе В., Михаэль Н., Эме П., Судаков К. В. Содержание катехоламинов в надпочечниках крыс Август и Вистар при остром эмоциональном стрессе.....	44
Конопля Е. Ф., Баненкая Н. В., Сечко Л. К., Павленко В. С., Попов Е. Г. Состояние овариальной и гормональной функций яичников крыс при облучении и дисфункции коры надпочечников.....	49
Никандров В. Н., Петрусенко Г. П., Гронская Р. И., Тумилович М. К. Изменение активности АТФ- и Ca ²⁺ -зависимого протеолиза в клетках феохромоцитомы РС12, вызванные воздействием плазминогена и фактора роста нервов.....	54
Сорокина Е. Г., Реутов В. П., Винская Н. П., Сторожевых Т. П., Пинелис В. Г. Частичное ингибирование цитохромоксидазы митохондрий в нейронах мозжечка защищает их от повреждений при действии токсических доз глутамата и нитрита.....	59
Семак И. В., Корик Е. О., Наумова М. В., Сломински А. Анализ метаболизма серотонина в коже хомяков с помощью обратнoфазной хроматографии и масс-спектрометрии.....	64

ФАРМАКОЛОГИЯ И ТОКСИКОЛОГИЯ

Заводник Л. Б., Заводник И. Б., Мартынич Д. И., Белоновская Е. Б., Кравчук Р. И., Басинский В. Г., Тарасов Ю. А., Зверинский И. В., Буко В. У. Протекторный эффект мелатонина при гепатотоксическом действии четыреххлористого углерода у крыс.....	69
---	----

ВИРУСОЛОГИЯ, МИКРОБИОЛОГИЯ И ИММУНОЛОГИЯ

Громов И. Н., Прудников В. С. Иммуноморфогенез у кур, вакцинированных против инфекционного бронхита.....	75
Слизень В., Титов Л. П., Бразнер Д. С., Гал М. Изучение резистентности к метронидазолу изолятов бактериоидов, выделенных от больных с острым парапроктитом.....	80

БИОФИЗИКА И БИМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

Стародубцева М. Н., Черенкевич С. Н. Механизмы реакций гемоглобина с пероксинитритом в водно-солевом растворе.....	86
Сидоренко А. В., Царюк В. В. Анализ биоэлектрической активности мозга методом нелинейной динамики при действии наркотизирующих препаратов.....	91
Лойко Е. Н., Самаль А. Б., Шуляковская С. М. Обратимое ингибирование АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов перекисью водорода.....	97

ОБЗОРЫ

Гурин А. В., Швалев В. Н., Гурин В. Н. Апоптоз в сердце: проблемы резистентности.....	101
Сидоренко Г. И. Сердечная недостаточность — это болезнь или синдром?.....	107
Балашко С. И., Колядко А. Н., Лукашевич В. С., Полукошко Е. Ф., Никандров В. Н., Островский Ю. П. Клеточные технологии в кардиологии.....	113
Самойлович Е. О. Проблемы отмены вакцинации после ликвидации полиомиелита.....	122

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ 2003 № 2

Серия медико-биологических наук

на русском, белорусском и английском языках

Тэхнічны рэдактар Т. В. Лецьен

Камп'ютарная вёрстка С. М. Касцюк

Здадзена ў набор 26.03.2003. Падпісана ў друк 20.06.2003. Выхад у свет 28.06.2003. Фармат 60×84¹/₈. Папера афсетная. Афсетны друк. Ум. друк. арк. 15,81. Ум. фарб.-адб. 16,27. Ул.-выд. арк. 17,2. Тыраж 150 экз. Заказ 639.

Рэспубліканскае ўнітарнае прадпрыемства «Выдавецтва «Беларуская навука». ЛВ № 13 ад 31.12.2002 г. 220141. Мінск, Старабарысаўскі тракт, 40. Пасведчанне 457.

Рэспубліканскае ўнітарнае паліграфічнае прадпрыемства «Баранавіцкая ўзбуўненая друкарня». ЛП № 122 ад 30.12.2002 г. 225320. Баранавічы, Савецкая, 80.

© Выдавецтва «Беларуская навука»
Весці НАН Беларусі, серыя медыка-біялагічных навук, 2003

УДК 616.12-008.64 + 616.127[616-018.6-089.844]

*С. И. БАЛАШКО, А. Н. КОЛЯДКО, В. С. ЛУКАШЕВИЧ,
Е. Ф. ПОЛУКОШКО, В. Н. НИКАНДРОВ, Ю. П. ОСТРОВСКИЙ*

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В КАРДИОЛОГИИ

Республиканский научно-практический центр «Кардиология», Минск, Беларусь

(Поступила в редакцию 09.12.2002. Принята после рецензирования 10.12.2002)

ВВЕДЕНИЕ

Лечение сердечной недостаточности (СН) является одной из главных проблем кардиологии в настоящее время. Для коррекции СН разработан широкий спектр лекарственных средств и немедикаментозных подходов, таких как кардиомиопластика, вспомогательное кровообращение, трансплантация сердца и др. Тем не менее, увеличение частоты развития и распространенности данной патологии в человеческой популяции требует поиска и разработки принципиально новых, доступных и эффективных способов коррекции сердечной недостаточности.

Развитие биотехнологии, молекулярной и клеточной биологии сделало клетку не только главным объектом воздействий, но и средством лечения многих заболеваний. Так, уже сейчас, трансплантация клеточных культур с успехом выполняется в эндокринологии, гепатологии, при лечении болезни Паркинсона. Клеточные технологии нашли место и при лечении миодистрофий [8, 9, 42, 48].

В то же время возможности и резервы клеточных технологий продолжают оставаться малоизученными и нереализованными. Одной из причин этого является отсутствие ясности в представлениях о регенераторных способностях миокарда.

К ВОПРОСУ О СТРУКТУРНОМ РЕМОДЕЛИРОВАНИИ МИОКАРДА

Различные патологические процессы в миокарде (инфаркт миокарда, воспалительные процессы, идиопатическая дилатационная кардиомиопатия и др.) сопровождаются его комплексной адаптивнокомпенсаторной перестройкой — ремоделированием. Ремоделирование миокарда подразумевает под собой процесс последовательных адаптационных структурно-функциональных изменений мышцы сердца вследствие ее повреждения. Самая частая причина возникновения сердечной недостаточности — инфаркт миокарда. При инфаркте миокарда процессы ремоделирования затрагивают как инфарцированный, так и не затронутый ишемическим повреждением участок. Инфарктная зона постепенно растягивается и подвергается рубцеванию, а непораженные участки гипертрофируются, а впоследствии — дилатируются, приспособляясь к новым условиям функционирования. Микроскопически наблюдается удлинение и истончение миофибрилл, увеличение расстояния между кардиомиоцитами, рост процентного содержания соединительной ткани в миокарде [1, 6, 10, 16, 60, 61].

Отсутствие способности кардиомиоцитов млекопитающих к делению давно стало общепризнанным фактом: клетки миокарда не пролиферируют, замещение дефекта сердечной мышцы происходит в основном за счет пролиферации клеток стромы — фибробластов [49]. Есть мнение, что, если повреждение сердечной мышцы произошло, то оно необратимо и проявляется ремоделированием миокарда по вышеописанному сценарию, закономерно заканчиваясь развитием сердечной недостаточности в течение нескольких месяцев или лет [1—6, 46, 54, 57, 66].

По мнению ряда авторов кардиомиоциты не могут пролиферировать, так как строго ориентированные агрегаты сократительных белков в клетках миокарда создают препятствия для цитокинеза при митозе; именно поэтому для завершения его необходима умеренная дедифференцировка миофибрилл. Из-за отсутствия условий для реализации этих процессов, в ча-

стности, при инфаркте митотическое деление в кардиомиоцитах обычно не идет дальше карิโอкинеза. Кроме того, в ткани миокарда не найдены структуры, подобные сателлитным клеткам скелетных мышц, которые являются незрелыми миоцитами и имеют большой потенциал к митотическому делению.

Доказано [5, 57], что митозы кардиомиоцитов, заканчивающиеся цитокинезом, редки, располагаются в основном в периинфарктной области и, следовательно, не могут заместить дефект в результате инфаркта миокарда. Д. С. Саркисов (1979) [4] считает, что уменьшение размеров рубца, показанное в опытах Л. В. Полежаева, связано не с репаративной регенерацией, а с предотвращением вторичных волн некроза миокарда. С позиций разработанной им теории внутриклеточной регенерации сердце относится к органам, в которых при повреждении преобладают не пролиферативные процессы в паренхиме, а фибропластические реакции стромы, которые почти необратимы [18, 52].

Возможный вклад пролиферации в пластические процессы в миокарде был проанализирован путем измерения митотического индекса кардиомиоцита у пациентов, перенесших трансплантацию сердца, и у больных с дилатационной кардиомиопатией. По данным тех же авторов, митотический индекс кардиомиоцита в патологическом сердце (кардиомиопатия) примерно в 10 раз выше, чем в нормальном миокарде, следовательно, пролиферация клеток миокарда играет важную роль в компенсаторно-восстановительных процессах патологического миокарда [15, 18, 52].

Приведенные данные нельзя считать окончательными, поскольку в литературе отсутствуют сведения о продолжительности жизни миокардиоцитов. Хотя выявленный прирост не может компенсировать массивную гибель клеток миокарда при ишемическом некрозе (рубцовая ткань быстрее заместит дефект), следует признать, что частичное возмещение популяции кардиомиоцитов путем их пролиферации и внутриклеточной регенерации может составить определенный регенераторный резерв сердечной мышцы.

ЗНАЧЕНИЕ АПОПТОЗА В РАЗВИТИИ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Апоптоз, или программируемая клеточная гибель, впервые был описан J. Керг и его сотрудниками в 1972 г. [34]. Этот процесс представляет собой эволюционно развитый, физиологический в отличие от некроза механизм клеточной гибели, который регулирует клеточную массу и архитектуру многих тканей. Известны четыре основные характеристики апоптоза:

- 1) уменьшение объема апоптотирующей клетки;
- 2) конденсация и фрагментация хроматина на ранних стадиях апоптоза с формированием так называемых апоптотических телец;
- 3) изменение мембраны апоптотирующей клетки, приводящее к распознаванию ее фагоцитами;
- 4) сопряженность апоптоза с активным белковым синтезом [12, 20, 23, 40, 46, 53].

Таким образом, апоптоз является гибелью клетки, включающей в себя генетическую или опосредованную программу, не зависящую от природы пускового сигнала. Другими словами, апоптозу присуща экспрессия генов *de novo*, а пусковые сигналы сами по себе не являются летальными для клетки.

Апоптоз привлек к себе внимание кардиологов как потенциальный патогенетический фактор при различных сердечно-сосудистых заболеваниях. Морфологические признаки апоптоза обнаружены как в сосудах, так и в самом миокарде в ответ на воздействие гипоксии, окислительного стресса, реперфузии при ишемии миокарда, постинфарктных изменениях и при развитии сердечной недостаточности.

Основными физиологическими индукторами апоптоза в организме являются: семейство TNF: (FAS-лиганд, TNFa), нейротрансмиттеры, ионы Ca^{2+} , глюкокортикостероиды, ангиотензин и аденозинтрифосфорная кислота (АТФ). Ингибиторы программируемой смерти клеток у человека представлены факторами роста, экстрацеллюлярным матриксом, нейтральными аминокислотами, эстрогенами, андрогенами, противовоспалительными цитокинами и др. [13, 27, 35, 45, 47, 51, 56, 70, 74].

При ишемии и реперфузии, особенно на ранних стадиях реперфузии, когда имеет место депрессия сократительной функции миокарда, отмечается более чем 600% прирост H_2O_2 [46]. Кроме того, сами кардиомиоциты [30, 43, 59], а также макрофаги [11, 14, 28, 59] продуцируют оксид азота и другие активные формы кислорода, которые, как известно, являются индукторами апоптоза. При этом происходит торможение активности супероксиддисмутазы, катала-

зы, глутатионпероксидазы, снижается уровень токоферола. Другими словами, отмечается резкий дефицит в организме антиоксидантов, что сопровождается повышением перекисного окисления липидов [17] и может служить пусковым моментом в развитии апоптоза кардиомиоцитов. Для объяснения природы апоптоза кардиомиоцитов необходимо учесть некоторые результаты исследования в области ренин-ангиотензиновой системы человека.

Для клеток, имеющих терминальную дифференцировку, а к таковым относятся кардиомиоциты, апоптоз не является характерным. Однако при кардиомиопатиях, гипертрофии миокарда и хронической сердечной недостаточности различной этиологии часто происходит прогрессивное снижение сократительной способности левого желудочка. Причем нередко этот процесс протекает в отсутствии каких-либо признаков ишемии миокарда. Поэтому в качестве одной из рабочих гипотез, объясняющих механизм развития хронической сердечной недостаточности, является гипотеза программируемой смерти клеток.

Все современные методики в лечении хронической сердечной недостаточности, которые направлены на улучшение прогноза болезни, можно разделить на несколько основных групп, каждая из которых имеет вполне конкретную мишень:

1. Блокада гибели кардиомиоцитов (некроза и апоптоза).
2. Улучшение насосной функции сердца (повышение сердечного выброса и ресинхронизация сердечной деятельности).
3. Уменьшение ремоделирования сердца (дилатации камер).
4. Увеличение жизнеспособного миокарда (выход кардиомиоцитов из «спячки» или создание новых кардиомиоцитов).

Последним из рассматриваемых нами принципов лечения хронической сердечной недостаточности и ограничения прогрессирования болезни является увеличение зоны активно сокращающегося жизнеспособного миокарда. И в этом случае можно выделить несколько подходов:

1. Выход живых, но гибернирующих кардиомиоцитов из состояния «спячки»:
 - а) медикаментозным путем (ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (иАПФ), В-адреноблокаторы (В-АБ), цитопротекторы);
 - б) хирургическим путем (реваскуляризация миокарда).
2. Создание новых кардиомиоцитов (трансплантация клеток):
 - а) с использованием клеток скелетных мышц;
 - б) с использованием стромальных (стволовых) клеток;
 - в) с использованием кардиомиоцитов (КМЦ) [73].

Направление, связанное с восстановлением активности «спящих» или гибернирующих клеток миокарда, в последние годы завоевало большую популярность. Действительно, исследования последнего десятилетия доказали, что у больных с застойной сердечной недостаточностью при хронической ишемии миокарда часть кардиомиоцитов впадает в «спячку». Таким образом, миокард больного с сердечной недостаточностью условно состоит из кардиомиоцитов трех типов: живых, мертвых и «спящих». «Спящие», или гибернирующие КМЦ представляют собой своеобразный резерв. Они живы, но активно не сокращаются и потребляют минимум кислорода, «экономя» его для работающих КМЦ. Обычные методы исследования, например, эхокардиография показывает зону акинезии, в которой могут располагаться как погибшие, так и «спящие» кардиомиоциты. Для выявления живых кардиомиоцитов в зоне видимого рубца (определения жизнеспособного миокарда) используются специальные методики:

- стресс-эхокардиография с введением малых доз добутамина;
- перфузионная сцинтиграфия миокарда;
- магнитно-резонансная томография и спектроскопия;
- позитронно-эмиссионная томография [7, 17, 25, 33].

При продолжающейся гипоксии эти «спящие» КМЦ могут погибнуть (некроз = убийство, апоптоз = самоубийство клеток), а при появлении кислородного ресурса, наоборот, вернуться к активной работе. Поэтому при наличии жизнеспособного миокарда как хирургическое (реваскуляризация), так и медикаментозное лечение (комбинация иАПФ с В-АБ) могут быть эффективными. Трудно не согласиться с тем, что успешная реваскуляризация может полностью восстановить сократимость, тогда как адекватное лечение комбинацией иАПФ и В-АБ восстанавливает жизнедеятельность части гибернирующего миокарда. По данным ряда авторов прирост фракции выброса левого желудочка (являющейся одним из ведущих показателей, характеризующих контрактильность миокарда) на фоне лечения комбинацией эналаприла с бисопрололом составил 12% (в случае хирургической реваскуляризации (19%), уменьшение

размеров ЛЖ (6.7% (хирургическая реваскуляризация (14%), снижение индекса асинергии (на 9.3% (реваскуляризация (13.5%).

Однако у больных с отсутствием жизнеспособного миокарда и обширными областями некроза (очагового и/или диффузного) ни хирургическое, ни, тем более, медикаментозное лечение не эффективно, поскольку, по сути дела, спасать уже нечего. В этих случаях единственной альтернативой может быть лишь фантастическая идея создания новых сократительных элементов. Еще несколько лет назад это казалось нереальным, но новый век и новые технологии стремительно наступают. Сегодня трансплантация клеток для замещения погибших КМЦ становится одним из магистральных направлений в лечении больных с ХСН [2, 4, 9, 42, 58, 62, 74].

КЛЕТОЧНАЯ КАРДИОМИОПЛАСТИКА: СУТЬ МЕТОДА, РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Трансплантация клеток обладает рядом преимуществ по сравнению с пересадкой целого органа (сердца) [43]:

1) заместительная клеточная терапия позволяет культуральными методами избавиться от примеси сверхантигенных донорских клеток, которые в первую очередь вовлекаются в процесс иммунного отторжения. Большинство фетальных клеток имеют слабоэкспрессированные комплексы главных антигенов гистосовместимости, что на порядок уменьшает уровень посттрансплантационных осложнений [12];

2) фетальный клеточный материал и стволовые клетки имеют большой потенциал роста и пролиферации, выраженную способность к дифференцировке и функционально более активны (фетальные клетки продуцируют факторы роста и регенерации);

3) подсадку клеток можно регулировать по дозам и многократно повторять;

4) эмбриональные и фетальные клетки и ткани лучше переносят тепловую ишемию и холодовую консервацию;

5) стоимость клеточной трансплантации значительно ниже, чем пересадка органа.

Трансплантация клеток в кардиологии основана на двух основных принципах: 1) сердечная недостаточность развивается, когда критическое число кардиомиоцитов необратимо потеряно; 2) функция миокарда может быть улучшена «заселением» областей «мертвого» миокарда новым пулом сокращающихся клеток. Жизнеспособность этой идеи подтвердилась экспериментами, в которых было выявлено, что инъекции фетальных клеток миокарда в постинфарктный рубец приводит к развитию новых интрамиокардиальных фрагментов, формированию связей между кардиомиоцитами хозяина и донорскими клетками, способствующих улучшению контрактильной функции миокарда в период до 6 месяцев после трансплантации. Дополнительным доказательством способности трансплантированных клеток к физиологической интеграции с тканью реципиента явились результаты пересадки сино-атриальных клеток в стенку левого желудочка сердца собак с полностью разрушенной проводящей системой, где клетки предсердия проявляли свою пейсмекерную активность. Скелетные миообласты, однако, которые могут рассматриваться как предшественники клеток поперечно-полосатых мышц, формируют миотубулы после «привития» в инфарцированную зону миокарда. Это отличие связано с формированием медленного типа миозина и улучшением локальной и глобальной контрактильности миокарда. При этом, в отличие от донорских кардиомиоцитов, миообласты донора не формируют связей с кардиомиоцитами хозяина, оставаясь в зоне рубца в виде «островков» [41, 64].

Пересадка клеток в миокард может применяться для восполнения дефицита кардиомиоцитов в рубцовой или некротической зонах сокращающихся камер сердца, для улучшения насосной функции сердца, регуляции процессов ремоделирования ЛЖ после инфаркта миокарда, для лечения дилатационной кардиомиопатии и других целей.

При этом полагают, что восстановление функции миокарда может быть достигнуто путем увеличения количества сократительных клеточных элементов и/или путем повышения процессов внутриклеточной регенерации в кардиомиоцитах реципиента. Для этих целей используют пересадку кардиомиоцитов, гладкомышечных клеток, ген-модифицированных клеток (фибробласты, скелетные миообласты), проводят целенаправленную экспрессию регуляторных генов клеточного цикла (иницирование пролиферации) и используют другие высокотехнологические методы клеточной терапии [18, 19, 21, 51, 42, 44, 75, 78].

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КЛЕТОК, ТРАНСПЛАНТИРОВАННЫХ В МИОКАРД

Известно, что клетки нативного миокарда электромеханически интегрированы специализированными контактами в области вставочных дисков, в составе которых имеются fascia adherens (зона прикрепления миофибрилл), щелевые контакты, десмосомы [8, 10, 19, 37]. Десмосомы и fascia adherens выполняют механическую функцию, фиксируя клетки миокарда между собой, а щелевым контактам отводится роль проводника электрических импульсов. Поскольку электромеханическая интеграция между кардиомиоцитами (основа скоординированной активности миокарда, за счет которой сердечная мышца действует как единое целое, изучению электромеханических взаимодействий кардиомиоцитов донора и реципиента в экспериментальных работах уделяется большое внимание.

Так, Klug et al (1995) [68] через 10 недель после пересадки фетальных кардиомиоцитов описывают появление всех компонентов вставочных дисков между клетками хозяина и донора в миокарде собак.

Leog et al. (1996) [53], трансплантируя аллогенную фетальную ткань сердца крысам на различных сроках после ишемического повреждения, нашли, что клетки переживали до 65 дней, сохраняли фетальный фенотип и не дифференцировались в зрелые кардиомиоциты. В работах 1996—1997 гг. [39, 48, 73,] посвященных пересадке фетальных и кардиомиоцитов новорожденных крыс, было обнаружено, что культура кардиомиоцитов *in vitro* росла, формируя сердечноподобную ткань и по строению, и по функции. Культивируемые клетки содержали организованные саркомеры и были соединены межклеточными контактами, включающими десмосомы и f. adherens, регулярно, спонтанно и синхронно сокращались. Суспензия этих клеток была пересажена в криоповрежденный миокард. Исход пересадки был прослежен в течение 8 и 24 недель. Было отмечено, что пересаженные кардиомиоциты формируют сердечноподобную ткань: происходит увеличение числа клеток, экспрессируются сократительные белки в саркомерах, между новообразованными клетками формируются десмосомы и f. adherens, происходит ангиогенез, уменьшается рост постинфарктного рубца. Несмотря на применение циклоспорина, в отдаленные сроки после трансплантации (24 недели) вокруг пересаженных клеток возникли признаки хронического отторжения (лимфоцитарная инфильтрация, уменьшение размеров трансплантата) [19]. Сравнительный анализ показал, что трансплантация была более успешной при введении фетальных кардиомиоцитов (выживало 92% клеток), чем 5-дневных (новорожденных) животных (50%), а клетки, выделенные из 22-дневных (молодых) и 32-дневных (взрослых) крысиных сердец, не выживали в сердце после трансплантации [73]. Указанный факт был подтвержден Reinecke et al., которые обнаружили, что клетки миокарда взрослых крыс не выживали при пересадке [44, 50, 67, 72].

ПЕРЕСАДКА БЛАСТОВ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ

Скелетные миобласты во взрослом организме встречаются в виде сателлитных клеток, составляя неотъемлемую часть соматической поперечно-полосатой мускулатуры, их содержание составляет там до 4—8% [33]. Сателлитные клетки, являясь стволовыми клетками, способны пролиферировать и дифференцироваться в зрелые скелетные миоциты. В отличие от кардиомиоцитов, клетки поперечно-полосатой мускулатуры электромеханически дезинтегрированы. Первые работы по пересадке скелетных миобластов в миокард относятся к 1993 г., когда в качестве трансплантата была использована стандартная клеточная линия скелетных мышечных миобластов, клетки которой были пересажены в здоровый миокард крысы [29]. Переживание клеток наблюдалось в течение 3-х месяцев. Иммуногистохимически к этому сроку было выявлено наличие дифференцированных мышечных трубочек (экспрессия скелетной изоформы тяжелой цепи миозина), электронная микроскопия не показала никаких контактов между клетками трансплантата и хозяина.

Chiu et al. (1995) [39] произвели пересадку сателлитных клеток в поврежденный миокард собак. Они выдвинули предположение, что скелетные миобласты могут дифференцироваться в волокна сердечной мышцы и таким образом восстанавливать поврежденный миокард. Сателлитные клетки были выделены из скелетной мышцы, культивированы, помечены 3H-тимидином и внедрены в криоповрежденный миокард. Через 18 недель наличие изотопной метки в пределах плотного рубца подтвердило выживание внедренных клеток. Было показано образование вставочных дисков между пересаженными клетками и наличие центрально расположенных ядер в них, подобных таковым в волокнах сердечной мышцы. Эти наблюдения позволили авторам заключить, что сателлитные клетки подвергаются дифференцировке в

сердечноподобные мышечные клетки в соответствующем микроокружении. Исследования Youn et al. (2002) [72] подтверждают эти оптимистические данные; более того, ими были найдены клеточные контакты между кардиомиоцитами и миообластами.

P. C. Smits et al. (2002) [65] установили, что при пересадке миообластов новорожденных крыс в криоповрежденный миокард взрослых животных: пересаженные миообласты на 3 день начинают формировать многоядерные мышечные трубочки, которые дифференцируются в фенотип зрелых быстрых мышечных волокон. Несмотря на повышенный интерес к трансплантации кардиомиоцитов и миообластов в миокард, это не останавливает исследователей в поиске альтернативных подходов в клеточной трансплантологии при лечении сердечной недостаточности [5, 33, 36, 58].

ПЕРЕСАДКА КЛЕТОК КРАСНОГО КОСТНОГО МОЗГА

Красный костный мозг млекопитающих содержит стволовые клетки. Среди них выделяют клетки гемопоэза, способные пролиферировать и дифференцироваться в элементы крови, и мезенхимальные стволовые клетки, которые обладают способностью пролиферировать и формировать клетки мозга, хряща, мускулатуры и др. [13, 31, 32, 45].

Доказано, что различные мезенхимальные клетки обладают способностью к миогенному образованию. Миогенное преобразование фибробластов линии 10T1/2 наблюдалось и *in vivo* после инъекции их в регенерирующую мышцу. Исследования Ferrari et al. (1998) подтверждают, что костномозговые клетки мышей, введенные в скелетную мышцу, могут участвовать в процессе ее регенерации и формировать полностью дифференцированные мышечные волокна [50].

T. Siminiak et al. и соавт. (2002) [60] получили кардиомиогенную линию из мышечных клеток стромы красного костного мозга и индуцировали в них процессы дифференцировки в кардиомиоциты. Полученные клетки экспрессировали множество специфических для клеток миокарда генов и имели фенотип фетальных желудочковых кардиомиоцитов. Дифференцированные таким образом клетки миокарда были связаны между собой вставочными дисками, формировали мышечные трубочки, спонтанно сокращались, имели «кардиомиоцит-подобную» ультраструктуру, включая типичные саркомеры, центрально расположенное ядро, множественные гранулы гликогена и митохондрии. Мышечные трубочки генерировали потенциалы действия, напоминающие таковые у желудочковых кардиомиоцитов.

W. S. Colucci (1996) [18] выдвинул гипотезу, что микроокружение миокарда создаст определенные условия и сигналы для кардиомиогенной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток.

В последнее время появились сообщения о пересадке в крио- или ишемически поврежденный миокард гладкомышечных клеток и кардиомиоцитов, полученных от трансгенных животных, однако использование ни тех ни других не зарекомендовало себя в качестве полноценной замены функции утраченных нативных кардиомиоцитов [64, 72].

РЕЗУЛЬТАТЫ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КЛЕТОК В ПОВРЕЖДЕННЫЙ МИОКАРД

По данным целого ряда исследователей многие показатели функциональной активности сердца достоверно улучшались после пересадки в миокард, подвергнутый или крио- или ишемическому повреждению. Однако последние исследования показали, что улучшение контрактильности скомпрометированного миокарда не связано с сократительной активностью трансплантированных клеток вне зависимости от их вида, даже если они сокращались в культуре или формировали межклеточные контакты с кардиомиоцитами реципиента [12, 16, 17, 19, 65, 71].

Так, по мнению Thompson et al. [67], миообласты непосредственно не улучшают насосную функцию сердца, уменьшают ригидность зрелого рубца. В результате систолическая функция миокарда возрастает опосредованно через улучшение диастолической.

Трудно не согласиться с выводами, что пересаженные миообласты не могут непосредственно участвовать в выполнении сократительной функции. Происходит это в силу нескольких причин [36]:

- 1) скелетная мышца не обладает автоматизмом;
- 2) скелетная мышца имеет очень короткую продолжительность потенциала действия и короткий рефрактерный период, поэтому на фоне нормальной электрической активности сердца она может формировать тетанус;

3) миобласты не образуют никаких контактов с клетками миокарда хозяина [14, 15, 19, 38].

Одновременно указывается на наличие структурных предпосылок для участия скелетной мышечной ткани и в механической и в электрической систоле миокарда:

1) кардиомиоциты, примыкающие к зоне инфаркта, формируют новые вставочные диски, и это может означать их потенциальную способность формировать контакты с другими клеточными типами;

2) были обнаружены вставочные диски между миобластами и кардиомиоцитами в культуре и после трансплантации миобластов в миокард [8, 10, 19, 37];

3) щелевые контакты позволяют кардиомиоцитам стимулировать клетки скелетной мышцы и вызывать синхронизированные с сердечным ритмом сокращения;

4) быстрые мышечные волокна пересаженных миобластов могут трансформироваться в устойчивые к утомлению медленные мышечные волокна. Поэтому высказывается мнение [19], что новообразованная мышца может подходить для работы сердца.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К РЕШЕНИЮ ПРОБЛЕМ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Несмотря на то, что проблемы клеточной кардиомиопластики в мировой литературе дискутируются уже довольно давно и обсуждается вопрос, какой вид клеток наиболее рационально использовать для кардиомиопластики, все же в последнее время наметилась тенденция для сужения стратегии в выборе типа донорских клеток. Исследованию этого вопроса посвящено совсем немного работ, однако в настоящее время сделан выбор в пользу стволовых клеток красного костного мозга и миобласты поперечно-полосатой мускулатуры [41, 64].

В этом отношении, наиболее привлекательными кандидатами для трансплантации являются стволовые клетки красного костного мозга, разделяющие возможность быть использованными в качестве аутографтов при «пластическом» подходе к лечению сердечной недостаточности. Однако стволовые клетки обладают важным преимуществом перед миобластами — обладая свойством плюрипотентности — т. е. под влиянием паракринной функции нативного миокарда трансформироваться не только в кардиомиоциты, но и клетки соединительной ткани [18, 21, 44, 51, 52, 61].

Показано, что привнесенные в миокард клетки выделяют различные биоактивные вещества: ростовые факторы, цитокины и др. Особенно это касается стволовых (в том числе и фетальных) клеток, основные эффекты от имплантации которых выражаются в мощной индукции репаративных процессов в месте повреждения. В то же время, микроокружение, в которое попадают введенные клетки, также оказывает влияние на их развитие.

Вводя клетки инъекционно, мы должны констатировать, что определенная их часть, иногда значительная, гибнет от ишемии, так как в месте инъекции отсутствует необходимый уровень васкуляризации, который формируется позже. Так, после пересадки изогенных новорожденных кардиомиоцитов в криповрежденный крысиный миокард через 18 ч погибало до 45% трансплантируемых клеток. Пул оставшихся клеток в динамике нарастал довольно медленно, если вводилось 3–10 млн. клеток, а при пересадке 10–25 млн. КМЦ их количество далее не увеличивалось [75]. Авторы видят причины этого в тепловом шоке пересаженного материала.

Для решения проблемы реперфузионного повреждения клеток исследователи [44] подвергли культуру миобластов своеобразной «тренировке» перед трансплантацией: путем воздействия высоких температур и гипоксии. Будучи пересаженными в сердце, эти клетки оказывались более жизнеспособными. Другим способом преодоления проблемы «гипоксической» гибели пересаженных кардиомиоцитов является, судя по всему, двух- (или даже многофазная) трансплантация клеток, когда новые культуры вводятся в уже «реванскуляризованный миокард».

Не имея стройной теории механизма ремоделирующего действия трансплантированных клеток, авторы сходятся в том, что в результате пересадки можно достичь: 1) предупреждения развития постинфарктной аневризмы; 2) ускорения процессов ремоделирования ЛЖ; 3) предотвращения распространения очага некроза; 4) улучшения диастолических свойств миокарда; 5) улучшения нагнетательной функции сердца.

Экспериментальные данные показали, что стволовые мезенхимальные клетки красного костного мозга человека, трансплантированные в миокард и дифференцирующиеся в клетки нативного сердца и сосудов, могут улучшать контрактильную функцию миокарда [15, 19, 42, 51, 56, 61, 65, 67]. Это позволило тем же авторам начать клинические исследования. При этом метод трансплантации аутологичных стволовых клеток красного костного мозга был использован в сочетании с аорто-коронарным шунтированием у больных с инфарктом мио-

карда в сроке более 10 дней. Наиболее оптимальной площадью инфарцированной зоны для клеточной «пересадки» на текущий момент принято считать 5—50 см². За сутки до планируемой операции у больного забирается 100—200 мл красного костного мозга, из которого затем извлекаются стволовые мезенхимальные клетки в концентрации 1.7×10^6 /мл, стандартная операция аортокоронарного шунтирования дополняется 6—10 инъекциями полученной культуры объемом 0.2—0.3 мл каждая. В результате уже в сроки от 2 недель до 6 мес достоверно улучшается кровоснабжение и сократимость инфарктной зоны по сравнению с дооперационными данными, однако полученные результаты требуют дальнейшего изучения [64].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время возможности клеточной кардиомиопластики путем трансплантации клеток различных фенотипов в миокард продолжают интенсивно изучаться. Кардиомиоциты взрослых животных имеют слабо выраженную способность к росту *in vitro* и *in vivo*. В то же время фетальные клетки (в частности, фетальные кардиомиоциты) имеют больший потенциал к росту как в культуре, так и в организме реципиента по сравнению со зрелыми клетками миокарда, выделяя при этом в окружающие ткани биоактивные вещества, индукторы регенерации миокарда и **ингибиторы апоптоза**. Это имеет большое значение, поскольку апоптоз кардиомиоцитов является на клеточном уровне субстратом прогрессирования сердечной недостаточности. Между тем, использование аллогенных фетальных кардиомиоцитов в клинической практике ограничено по этическим соображениям и из-за необходимости использовать иммуносупрессию, которая к тому же не гарантирует длительного переживания пересаженного материала.

Для клинического применения предпочтительнее аутологичный материал, в качестве которого могут быть использованы скелетные миобласты и мезенхимальные стволовые клетки костного мозга, а также генмодифицированные клетки. Генетически измененные клетки могут формировать мышечный фенотип в несократимых клетках, например, в фибробластах или стволовых мезенхимальных клетках, а также экспрессировать необходимые ростовые факторы, и вещества, которые улучшают функцию миокарда реципиента.

В заключение, следует отметить, что трансплантация клеток представляет собой новый и эффективный подход к лечению ишемических, а в перспективе — и неишемических кардиомиопатий. Однако, судя по всему, клеточная кардиомиопластика не может представлять собой альтернативу, а скорее всего будет сопутствовать уже разработанным медикаментозным и хирургическим подходам к лечению кардиологических заболеваний.

Литература

1. Амосова Е. Н. Кардиомиопатии. Киев, 1999.
2. Кушаковский М. С. Аритмии сердца. СПб., 1998.
3. Мареев В. Ю. // Рус. мед. журн. 1999. № 2. С. 76—78.
4. Моисеев В. С., Сумароков А. В., Стяжкин В. Ю. Кардиомиопатии. М., 1993.
5. Моисеев В. С. // Сердечная недостаточность. 2000. № 4. С. 121—131.
6. Мухарьямов Н. М., Попович М. И., Затушевский И. Ф. Дилатационная кардиомиопатия. Кишнев, 1986.
7. Терещенко С. Н., Демидова И. В. Хроническая сердечная недостаточность: диагностика и лечение. Метод. рекомендации. М., 2000.
8. Терещенко С. Н., Джаиани Н. А., Мареев В. Ю. // Сердечная недостаточность. 2000. № 1. С. 8—20.
9. Терещенко С. Н., Джаиани Н. А., Моисеев В. С. // Тер. арх. 2000. № 4. С. 75—77.
10. Шахламов В. А., Азнаурян А. В. // Материалы конф. Электронная микроскопия — 97. Ереван, 1997. С. 76.
11. Albina J. E., Cui S., Mateo R. B. et al. // J. Immunol. 1993. Vol. 150, N 2. P. 5080—5085.
12. Araki S., Shimada Y., Kaji K. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1990. Vol. 168, N 6. P. 1194—1200.
13. Bayes-Genis A., Salido M., Sole F. et al. // E. Heart. J. 2002. Vol. 4. P. 276.
14. Beckerman K. P., Rogers H. W., Corbett J. A. et al. // J. Immunol. 1993. Vol. 150, N 3. P. 888—895.
15. Bennet M. R., Evan G. I., Newby A. C. // Circ. Res. 1994. Vol. 74, N 2. P. 525—536.
16. Bristow M. R. // Circulation. 1999. Vol. 97. P. 1340—1341.
17. Chekanov V., Nikolaychik V., Tchekanov G. et al. // E. Heart. J. 2002. Vol. 4. P. 505.
18. Colucci W. S. // New Engl. J. Med. 1996. Vol. 335. P. 1224—1226.
19. Cosin-Sales J., Perez A., Inogus S. et al. // E. Heart. J. 2002. Vol. 4. P. 42.
20. De Moissac D., Guervich R. M., Zheng H. et al. // J. Mol. Cell. Cardiol. 2000. Vol. 32. P. 53—63.
21. Dzau V. J., Horiuchi M. // E. Heart. J. 1996. Vol. 17. P. 978—980.
22. Esterbauer H., Wang G., Puhl H. // Br. Med. Bull. 1993. Vol. 49, N 2. P. 566—576.
23. Evan G. I., Wyllie A. H., Gilbert C. S. et al. // Cell. 1992. Vol. 69. P. 1119—12833.
24. Evan G., Littlewood T. // Curr. Opin. Gouct. Dev. 1993. Vol. 3. P. 44—49.

25. Gottlieb R.A., Burleson K.O., Kjoner R.A. et al. // *J. Clin. Invest.* 1994. Vol. 94. P. 1621–1628.
26. Gronda E., Vitali E. // *Eur. J. Heart Failure.* 1999. Vol. 1. P. 320–325.
27. Han D.K., Haudenschild C.C., Hong U.K. et al. // *Am. J. Pathol.* 1995. Vol. 147, N 2. P. 267–277.
28. Herskowitz A., Choi G., Ansari A.A. et al. // *Am. J. Pathol.* 1995. Vol. 146, N 2. P. 419–428.
29. Hickman J.A. // *Cancer Metastasis Rev.* 1992. N 2. P. 121–139.
30. Hill M.F., Singal P.K. // *Am. J. Pathol.* 1996. Vol. 148, N 1. P. 291–300.
31. Hu Y., Davison F., Mayre M. et al. // *E. Heart. J.* 2002. Vol. 4. P. 380.
32. Jaquet K., Krause K., Stute N. et al. // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002. Vol. 39.
33. Jaquet K., Krause K., Stute N., Zander A. et al. // *E. Heart. J.* 2002. P. 30.
34. Kerr J.F.R., Wyllie A.H., Curne A.R. // *Br. J. Cancer.* 1972. Vol. 26, N 2. P. 239–257.
35. Kretzner L., Blackwood E., Eisenman R. // *Nature.* 1992. Vol. 359. P. 426–429.
36. Kuramochi Yukio. // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002. Vol. 39.
37. Ma Y., Tolmachov O., Themis M. et al. // *E. Heart. J.* 2002. Vol. 4. P. 379.
38. Maeda M., Holder E., Lowes B. et al. // *Circulation.* 1997. Vol. 95, N 1. P. 17–20.
39. Malhotra R., Brosius F.C. // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. P. 12567–12575.
40. Massaeri H., Pierce G.N. // *Cardiovasc. Res.* 1995. Vol. 29, N 5. P. 597–603.
41. Menasche P.H. // *Book proceedings. Postgraduate programme 2002 the 16-th Annual Meeting the European Association for cardio-thoracic surgery. Monte-Carlo, Monaco.* 2002. P. 32–34.
42. Mestroni L., Rocco C. et al. // *Cardiology Clinics.* 1998. Vol. 16. P. 603–609.
43. Muller-Ehmsen J., Peterson K.L., Kedes L. et al. // *E. Heart. J.* 2002. Vol. 4. P. 379.
44. Muller P., Pfeiffer P., Seeland U. et al. // *E. Heart. J.* 2002. Vol. 4. P. 506.
45. Muller-Ehmsen J., Peterson K.L., Kedes L. et al. // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002. Vol. 39.
46. Olivetti G., Abbi R., Quaini F. et al. // *New Engl. J. Med.* 1997. Vol. 336. P. 1131–1141.
47. Oral N., Kapadia S., Nakano M. et al. // *Clin Cardiology.* 1995. Vol. 18. P. 20–27.
48. Ortiz-Lopez R., Li H., Su J. et al. // *Circulation.* 1997. Vol. 95. P. 2434–4240.
49. Parkes J.L., Cardell R.R., Hubbard F.C. et al. // *Am. J. Pathol.* 1991. Vol. 138. P. 765–775.
50. Qayum M.S., Takizawa K., Frantzen M. et al. // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002. Vol. 39.
51. Reed V.C., Hardwick S.J., Mitchinson M.S. // *FEBS Lett.* 1993. Vol. 33. P. 218–220.
52. Sabbah H.N., Sherov V.G., Riddle J.M. et al. // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1992. Vol. 24. P. 1333–1347.
53. Sabbah H.N., Shimojima H. et al. // *Am. J. Pathol.* 1995. Vol. 147, N 2. P. 251–266.
54. Sakamoto A., Ono K., Abe M., Jasmin G. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. Vol. 94. P. 13873–13878.
55. Saw J., Lansdorp P.M., Qayumi K. et al. // *Eur. Heart. J.* 2002. Vol. 4. P. 540.
56. Sharov V.G., Shimojima H. et al. // *Am. J. Pathol.* 1996. Vol. 148, N 1. P. 41–49.
57. Sharov V.G., Sabbah H.N., Shimoyama H. et al. // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1994. Vol. 43. P. 287–297.
58. Shaw A.R.M., Lee R.J. // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002. Vol. 39.
59. Shindo T., Ikeda U., Ohkawa F. et al. // *Cardiovasc. Res.* 1995. Vol. 29, N 6. P. 813–818.
60. Siminiak T., Kalawski R., Fiszler D. et al. // *E. Heart. J.* 2002. Vol. 4. P. 16.
61. Sinagra G., Mestroni L., Camerini F. // *Cardiology Clinics.* 1999. P. 3–8.
62. Skobel E., Schuh A., Schwart E.R. et al. // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002. Vol. 39.
63. Siezak J., Tribuiova N., Pristacova J. et al. // *Am. J. Pathol.* 1995. Vol. 147, N 3. P. 772–781.
64. Stamm C., Westphal B., Kleine B. et al. // *Book of abstracts the 16-th Annual Meeting the European Association for cardio-thoracic surgery. Monte-Carlo, Monaco.* P. 570.
65. Smits P.C., Maat L., Lee R.C.H. et al. // *E. Heart. J.* 2002. Vol. 4. P. 380.
66. Takizawa K., Frantzen M. et al. // *Circulation.* 1994. Vol. 90, N 2. P. 556–573.
67. Thompson C.A., Nasser B.A., Makower J. et al. // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002. Vol. 39.
68. Tyagi S., Kumar S., Voelker D.J. et al. // *J. Cell. Biochem.* 1996. Vol. 63, N 2. P. 185–198.
69. Yamada T., Horilichi M., Dzau V.S. // *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA).* 1996. Vol. 93, N 1. P. 156–160.
70. Yamamoto S., Sawada K., Shimomura H. et al. // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2000. Vol. 32. P. 161–175.
71. Yaoita H., Ogawa K., Maehara K., Maruyama Y. // *Circulation.* 1998. Vol. 97. P. 276–281.
72. Youn T., Sohn B.-R., Piao H. et al. // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002. Vol. 39.
73. Yue T.L., Ma X.L., Wang X. et al. // *Circ Res.* 1998. Vol. 82. P. 166–174.
74. Yue T.L., Ohlstein E.H., Ruffolo R.R. // *Current opinion in chemical biology.* 1999. Vol. 3. P. 474–480.
75. Watschinger B., Sayegh M.N., Hancock W.W. et al. // *Am. J. Pathol.* 1995. Vol. 146, N 5. P. 1065–1072.

*S. I. BALASHKO, A. N. KOLYADKO, V. S. LUKASHEVICH,
E. F. POLUKOSHKO, V. N. NIKANDROV, Y. P. OSTROVSKY*

CELL TECHNOLOGIES IN CARDIOLOGY

Republican Scientific and Practical Center "Cardiology", Minsk, Belarus

Summary

The treatment of congestive heart failure (CHF) is leading problem of the Health Care in our time. The principal achievement of two recent decades: not only to treat symptoms of decompensation but also to try to decelerate progression of the disease. All current methods of therapy for CHF, which are aimed just at improving the prognosis of disease, can be subdivided into several principal groups: 1) blockade of cardiomyocyte death; 2) improvement of the heart pump function; 3) decrease of heart remodeling; and 4) increase in the volume of viable myocardium. The article has been showing modern points of view on each of the above-mentioned fields.