

На правах рукописи

Низамиева Айгуль Альфредовна

**ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ МЕЖКЛЕТОЧНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В
СЕРДЕЧНОЙ ТКАНИ И ОСОБЕННОСТИ ИХ ВЛИЯНИЯ НА
ВОЗНИКНОВЕНИЕ ВОЛН РЕЕНТРИ**

Специальность: 1.5.2 Биофизика

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Москва – 2022

Работа прошла апробацию в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»

Научный руководитель: Агладзе Константин Игоревич, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией биофизики возбудимых систем МФТИ, Физтех

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук

Защита состоится **«22» декабря 2022 года в 13 часов 00 минут** на заседании диссертационного совета **ФБМФ.1.5.2.02**, созданного на базе федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)» (МФТИ, Физтех)

по адресу: 14170, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский переулок, д. 9.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке МФТИ и на сайте организации <https://mipt.ru>

Автореферат разослан **«22» ноября 2022 г.**

**Ученый секретарь
диссертационного совета**

Зубарев Илья Владимирович

Содержание

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.....	4
Актуальность темы исследования и степень ее разработанности	4
Цели и задачи работы	6
Научная новизна исследования	8
Практическая значимость работы	9
Положения, выносимые на публичное представление	10
Степень достоверности и апробация результатов	12
Публикации:.....	Ошибка! Закладка не определена.
ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.....	14
Исследование эффективности модельного биопейсмекера, полученного имплантацией светочувствительных клеток HI-1 в монослой культуры неонатальных крысиных кардиомиоцитов.....	16
Формирование проводящих путей в культуре неонатальных кардиомиоцитов	20
Изучение дрейфа волн реентри в контролируемом градиенте возбудимости сердечной ткани	25
Влияние жесткости и степени анизотропии матрикса на фенотипические особенности кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК.....	31
Заключение	37
Благодарности.....	41
Список использованной литературы.....	43

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Нормальная работа сердца является неотъемлемой составляющей для поддержания жизнедеятельности организма человека: оно выступает в качестве мощного насоса крови и через систему сосудов обеспечивает снабжение всех тканей организма кислородом, питательными веществами и сигнальными молекулами, а также обеспечивает доставку метаболитов клеток к органам их выделения. По данным статистики ВОЗ и метаанализа «Глобальное бремя болезней» [1,2], сердечно-сосудистые заболевания остаются лидирующей причиной смертности во всем мире, 85% летальных случаев приходится на ишемический инсульт головного мозга и инфаркта миокарда, и динамика летальности с 2000 по 2015 год от данных заболеваний только растет. Развитие заболеваний сердечно-сосудистой системы зависит от многих факторов (образа жизни, генетических предрасположенностей, особенности организма и другие), которые не всегда могут быть вовремя продиагностированы или скомпенсированы.

Одной из наиболее опасных форм аритмий являются пароксизмальные (внезапно возникающие) нарушения ритма сердца, один из частных примеров – фибрилляции предсердий («мерцательная аритмия») и желудочков (острое состояние). Аритмии сердца могут протекать как обособленно, так и возникать вследствие осложнения течения заболеваний сердечно-сосудистой системы (кардиомиопатий, каналопатий, синдрома удлиненного QT-интервала, сердечной недостаточности и пр.) или других систем. Пароксизмальные тахиаритмии характеризуются внезапным началом (а также возможно, и окончанием) с развитием приступа учащения сердечных сокращений более 100, а то и 300 уд./мин, возможным развитием острой недостаточности кровообращения и требуют неотложной помощи.

Механизм развития аритмий на тканевом уровне уже долго представляет интерес для изучения научным сообществом [3-7]. Дело в том, что сократительная функция сердца возможна благодаря слаженной работе его мышечных клеток – кардиомиоцитов. Подобно клеткам мозга, нейронам, кардиомиоциты способны к электрическому возбуждению, в ответ на которое происходит сокращение их актомиозинового комплекса (электромеханическое сопряжение), приводящего сердце в движение. Автоматизм электрического возбуждения обеспечивается проводящей системой сердца, клетки-пейсмейкеры которой способны к регулярной генерации потенциалов действия, что приводит к распространению волн возбуждения по сердечной ткани. В нормальном состоянии фронт волны возбуждения – прямой, однако в некоторых условиях, в частности, при встрече естественного препятствия, например, некротического или фиброзного участка сердечной ткани, возникшего вследствие сердечной недостаточности или инфаркта, волна возбуждения может изменить направление движения в сторону огибания препятствия, и вернуться в уже пройденный участок, таким образом закручиваясь в спираль. Такие волны получили название реентри (или ревербераторы), механизм их распространения исследуется на различных автоколебательных системах [8-9].

Было показано, что именно возникновение волн реентри является главной причиной возникновения аритмий [4,7]. Различают несколько режимов волн реентри: они могут иметь только один эктопический центр (при этом быть одно-, двухрукавными, и так далее), а также быть мультидоменными (*spiral breakup*). При возникновении мультидоменного режима в эпикарде (например, вследствие обширного фиброза) может развиваться фибрилляция желудочков, когда нагрузка на клетки миокарда увеличивается, сокращение отдельных клеток происходит с большей частотой, но насосная функция страдает. Именно в таких случаях для остановки распространения волн реентри и «перезапуска» нормального ритма сердца используют дефибриллятор, выдающий мощный разряд электрического тока.

В связи с высокой опасностью вышеописанных заболеваний сердечно-сосудистой системы является важным изучение фундаментальных механизмов их возникновения, а именно представляет интерес изучение данных состояний на тканевом и клеточном уровне, характер их возникновения и роль распространения волн реентри, и анализ факторов, обладающих аритмогенностью.

Для формирования теоретических и экспериментальных подходов исследований патологий сердца развиваются тканево-инженерные методы, которые позволяют в лабораторных условиях моделировать различные функциональные аспекты проводящей и сократительной способностей сердечной ткани и контролируемо воссоздавать факторы, влияющие на нарушение данных функций.

За последние десятилетия был осуществлен значительный прогресс в области тканевой инженерии для исследования проблем кардиологии. Одним из прорывных открытий (за которое была получена Нобелевская премия) было открытие клеточного репрограммирования и возможности индуцирования плюрипотентного состояния у соматических клеток человека [10], что открыло новые перспективы в области регенеративной медицины. С учетом наличия таких инструментов, представляется потенциально возможной разработка методов восстановления проводящей системы сердца с использованием собственных клеток пациента тканево-инженерными методами. Для развития таких методов необходимо детализированное понимание процессов, связанных с проведением волн возбуждения, в нормальных и патологических режимах.

Настоящая работа посвящена изучению аспектов фундаментальных механизмов, возникающих на межклеточном уровне и влияющих на режимы распространения волн возбуждения по сердечной ткани.

Цели и задачи работы

В рамках настоящего исследования главный интерес представляло изучение особенностей проведения волн возбуждения на тканевом уровне в различных

условиях топологии возбудимости сердечной ткани, достигаемой набором тканево-инженерных методов.

Цель исследования заключалась в определении роли межклеточных взаимодействий в сердечной ткани на распространение волн возбуждения, и возникновение волн реентри как частного, но отличительного по значимости случая.

В рамках выполнения исследования автором были сформулированы следующие задачи:

1) Изучение фундаментальных процессов функционирования сердечной ткани при различном процентном содержании кардиомиоцитов и фибробластов. Исследование механизма самоорганизации неонатальными кардиомиоцитами, в присутствии различного количества фибробластов, в функциональный синцитий, способный как к синхронному механическому сокращению, так и к электрическому проведению.

В рамках этой же темы необходимо определить пороговое значение процентного содержания кардиомиоцитов, при котором возможно проведение волны возбуждения по всему образцу. Исследование возможности возникновения волн реентри и однонаправленного блока в присутствии малого количества кардиомиоцитов.

2) Разработка экспериментальной модели оптического биопейсмейкера, интегрируемого в сердечную ткань. В рамках задачи необходимо произвести поиск оптимального метода интеграции фотосенсибильных клеток линии HL-1 ChR-2 в монослой культуры крысиных неонатальных кардиомиоцитов для возможности слаженного проведения волн возбуждения в полном объеме образца на физиологических частотах.

3) Изучение динамики распространения волн реентри в условиях варьируемой проводимости сердечной ткани. С использованием метода фотоконтроля в присутствии вещества из класса азобенzenов АзоТАБ, в транс-конформации блокирующего возникновение волн возбуждения, необходимо

создать градиент возбудимости сердечной ткани, отработать протокол контролируемого запуска волн реентри по образцу, охарактеризовать динамику дрейфа волн реентри в созданных условиях.

4) Изучение влияния свойств матрикса, таких как анизотропия и жесткость, на фенотип кардиомиоцитов, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека, а также на динамику проведения волн возбуждения.

Научная новизна исследования

В представленной работе приводятся оригинальные результаты научных исследований, раскрывающих новые аспекты межклеточных функциональных взаимодействий в сердечной ткани.

Впервые:

- показан неслучайный характер процесса самоорганизации сердечной ткани. Выявлены специфические вытянутые структуры из кластеров кардиомиоцитов, организующиеся в монослое сердечной ткани между окружающими их фибробластами – проводящие пути. Найдено пороговое значение, необходимое для возможности проведения волн возбуждения вдоль всего образца. Экспериментально измерена зависимость скорости проведения волны возбуждения от процентного содержания кардиомиоцитов, а также посредством иммуноцитохимии изучена структура образцов, которая показала наличие проводящих путей во всех проводящих образцах. Выявлены примеры морфологии сердечной ткани при низком содержании кардиомиоцитов, способствующих возникновению однонаправленного блока и волн реентри;

- создана оптическая экспериментальная модель биопейсмейкера, фоточувствительность которой обусловлена встраиванием канального родопсина-2 в мембраны клеток линии HL-1, выявлены аспекты формирования

функциональных межклеточных связей между интегрируемой и реципиентной культурой клеток, подобран оптимальный способ подсадки клеток для возможности стабильного проведения волн возбуждения на физиологически значимых частотах при оптической стимуляции;

- создана экспериментальная модель, в которой возможно методом фотоконтроля обратимо изменять возбудимость сердечной ткани, для изучения дрейфа волн возбуждения в сердечной ткани; экспериментально показан механизм дрейфа волн реентри в градиенте возбудимости и приведены гипотезы для объяснения такой динамики процесса;

- показано, что механизм влияния АзоТАБа на возбудимость сердечной ткани заключается не только в связывании с ионными каналами мембраны клетки, но и во влиянии на межклеточные контакты, что с точки зрения моделирования выражается не только в изменении ионных токов, но и в изменении коэффициента диффузии;

- выявлены существенные различия в кальциевой активности кардиомиоцитов, полученных из ИПСК человека, под влиянием такого фактора как степень анизотропии и жесткости подложки; наблюдается прямая корреляция скорости проведения волны возбуждения с увеличением жесткости подложки и повышением степени анизотропии матрикса.

Практическая значимость работы

Результаты, полученные в рамках исследования, неразрывно связаны с изучением механизма развития острых состояний сердца и развития сердечно-сосудистых заболеваний.

Полученная экспериментальная модель оптического биопейсмейкера в дальнейшем может помочь в разработке малоинвазивной технологии создания биологического водителя ритма.

Выявленный механизм самоорганизации сердечной ткани позволяет лучше понимать критические режимы функционирования сердечной мышцы, возникающие при развитии фиброза, например, при постинфарктном состоянии.

Созданная модель для фотоконтроля возбудимости сердечной ткани представляет собой экспериментальную базу для дальнейшего изучения влияния характеристик клеток сердечной ткани на распространение волн реентри, и таким образом представляя собой систему моделирования режимов фибрилляции в сердце.

Результаты работы в целом закладывают площадку для развития клинически применимых тканево-инженерных методов для диагностики и терапии заболеваний сердечно-сосудистой системы.

Положения, выносимые на публичное представление

- 1) Процесс самоорганизации сердечной ткани в форме монослоя при внесении суспензии на субстрат не является стохастическим процессом, как это предполагалось ранее, а имеет неслучайный характер. Кардиомиоциты (вероятно, за счет паракринных факторов), мигрируют для образования вытянутых кластеров – проводящих путей. Данная организация морфологии позволяет проведение волны возбуждения по площади образца при парадоксально низком процентном содержании кардиомиоцитов, составляющем всего 18%.
- 2) При низком содержании кардиомиоцитов, выявлены примеры морфологии проводящих путей, вызывающих появление однонаправленного блока и возникновения реентри. Данные процессы объясняются возникновением несоответствия потенциала, необходимого для изотропной передачи возбуждения на соседние клетки (sink-source mismatch). Зоны рефрактерности, возникающие также из-за неоднородности проведения

сигнала, выступают препятствием, на котором закручиваются волны реентри.

- 3) Показана возможность интеграции и образования электрических связей светочувствительных клеток HL-1 ChR2 в культуре неонатальных кардиомиоцитов. Наиболее эффективным среди исследованных способов подсадки светочувствительных клеток линии HL-1 ChR2 является кластерный способ подсадки. При таком способе подсадки обеспечивается стабильное проведение волн возбуждения на физиологически значимых частотах, даже в условиях снижения общей возбудимости монослоя.
- 4) Эффективность кластерной интеграции зависит от времени подсадки клеток и морфологии монослоев неонатальной культуры, что объясняется снижающейся способностью неонатальных кардиомиоцитов к формированию новых щелевых контактов (gap junctions) с соседними клетками с течением времени.
- 5) Метод подсадки клеток в виде суспензии не может быть признан эффективным для выполнения роли водителя ритма. Интеграция изолированных клеток критически чувствительна к условиям подсадки и не является стабильной на физиологических частотах.
- 6) Показано монотонное увеличение скорости проведения волны возбуждения с ростом интенсивности УФ-засветки (что соответствует увеличению концентрации цис-формы АзоТАБ), т.е. возможность моделирования плавного изменения возбудимости на культуре клеток.
- 7) Экспериментальные данные свидетельствуют о сдвиге спиральной волны преимущественно в сторону меньшей возбудимости (62%). При этом в рамках проведения краткосрочных экспериментов возможно наблюдение дрейфа центра волны в сторону большей возбудимости, или отсутствие

смещения. Этот результат свидетельствует о стохастичности динамической системы и наличии конкурирующих факторов.

- 8) Показано, что для объяснения эффекта дрейфа волн реентри в градиенте возбудимости необходимо учитывать не только изменение коэффициентов возбудимости, но и изменение коэффициента диффузии, если градиент был получен путем введения в раствор фоточувствительного агента, такого как AzoTAB. Этот вывод позволяет предположить, что в присутствии AzoTAB динамика дрейфа волны реентри в монослое сердечной ткани зависит не только от состояния ионных каналов, как это предполагалось ранее, но и от изменений в межклеточной проводимости (клеточных контактов), что также соотносится с результатами компьютерного моделирования.
- 9) Выявлено существенное влияние физических свойств матрикса (подложки) на формирование функционального электромеханического синцития, полученного путем дифференцировки ИПСК, и в частности, на фенотипические особенности кардиомиоцитов и характеристики проведения волн возбуждения в таком биоинженерном конструкте.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов подтверждается использованием общепризнанных методологий исследований, с применением высокоточного оборудования. Все проведенные эксперименты являются воспроизводимыми, для каждого из экспериментальных исследований набрано достаточное количество повторений, результаты обработаны с использованием статистических методов для подсчета погрешностей. Адекватность результатов работы подтверждается тем, что полученные значения скоростей проведения волн возбуждения соотносятся с известными из общедоступных данных в научной литературе. Верификация

данных обуславливается высокой корреляцией зависимостей, полученных экспериментально и с использованием компьютерных математических моделей.

Апробация результатов произведена за счет их представления сообществу коллег на профильных научных мероприятиях.

Основные результаты работы были представлены на 8 российских и международных конференциях, на двух из которых доклады были отмечены наградами:

- *Диплом за лучший доклад симпозиума:* Международный симпозиум «Nanoparticles and nanotechnology for Biomedical engineering, biotechnology and medicine», г. Варшава, Польша. 15-17 октября 2017 г., доклад: Nizamieva A., Slotvitskiy M., Tsvelaya V, Kudryashova N, Agladze K. «Conduction pathways in rat cardiac cell culture».
- *Диплом победителя конкурса докладов молодых ученых.* Российская конференция с международным участием «Экспериментальная и компьютерная медицина», г. Екатеринбург, 26-28 мая 2021 г., доклад: Nizamieva A. A., Balashov V. A., Tsvelaya V. A., Agladze K. I. «Optical bio-pacemaker experimental model».

По итогам исследования выпущено 12 печатных работ. Результаты исследования отражены в 3 публикациях, размещенных в рецензируемых научных изданиях, индексируемых базами Scopus и Web of Science. Подготовлен препринт по результатам исследования, приведенного в главе о дрейфе волн реентри в градиенте возбудимости, который в настоящий момент находится на рассмотрении в научном издании. Помимо публикаций, результаты работ также были опубликованы в 8 сборниках тезисов докладов конференций (индексируются РИНЦ).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении приведено обоснование актуальности исследуемой темы, а также цель работы и задачи, сформулированные автором для достижения цели исследования. Обозначены научная новизна исследования и научно-практическая применимость результатов, полученных в ходе выполнения работы. Приводятся основные положения, выносимые на публичное представление. Охарактеризована степень достоверности и апробация результата, приведен список опубликованных научных работ в рецензируемых журналах и описан вклад автора.

Первая глава исследования посвящена обзору развития и современного состояния научных знаний, связанных с тематикой представляемой работы. Описана природа проведения возбуждения в сердечной ткани: приведены некоторые положения теории активных сред, введены понятие потенциала действия и механизмы формирования волны возбуждения. Раскрыты аспекты поведения волн реентри в активных средах, приведены случаи однонаправленного блока и дрейфа волн реентри. Охарактеризованы подходы тканевой инженерии сердца: представлены различные экспериментальные 2D-модели сердца, рассмотрены подходы к варьированию свойств монослоев, влияющих на проведение волны возбуждения и образования волн реентри. Рассмотрено два способа фотоконтроля сердечной ткани: интеграция фотосенсибилизированных клеток в качестве альтернативных пейсмекеров в монослой и введение фоточувствительных веществ, обратимо блокирующих проведение волн возбуждения. Описаны математические модели, использованные в работе для верификации положений, объясняющих экспериментальные данные: модифицированная модель TNNP для проведения волны возбуждения в монослое сердечной ткани крысы, а также модифицированная клеточная модель Поттса для описания формирования проводящих путей в культуре кардиомиоцитов.

Вторая глава посвящена методам и материалам, использованным при выполнении исследования.

Приводится описание биологического материала, на котором велась экспериментальная работа: первичная культура неонатальных желудочковых кардиомиоцитов крысы и выделенная из нее культура фибробластов, иммортализованная линия клеток HL-1 ChR-2 с встроенным в мембрану клеток светочувствительным белком родопсином, культура кардиомиоцитов, полученных путем дифференцировки из ИПСК.

Приводятся пояснения по используемым для работы с клетками реактивам (для создания питательных сред для выделения и ведения культуры клеток, для адгезии клеток на подложках и для непосредственного проведения экспериментов).

Приводятся протоколы выделения первичной культуры неонатальных кардиомиоцитов крысы (модифицированный двухдневный протокол Вортингтона); протоколы формирования экспериментальных образцов с монослоями с различным содержанием кардиомиоцитов и фибробластов; протоколы сокультурирования первичной культуры неонатальных кардиомиоцитов и линии HL-1; протокол дифференцировки ИПСК.

Приводятся методы проведения экспериментов: метод оптического картирования с использованием кальций-зависимого красителя Fluo-4, с возбуждением с помощью оптического (УФ-диод, диодный источник синего света) и электрического (платиновые кольцевой и точечный электроды) стимула, для проведения экспериментов по отслеживанию динамики распространения волн возбуждения, а также волн реентри в условиях различной структуры монослоев; метод иммунофлуоресцентного анализа в сочетании с флуоресцентной конфокальной микроскопией, а также метод автоматического сортирования для исследования морфологии монослоев.

Приводятся методы обработки полученных результатов в компьютерных программах ImageJ (для обработки файлов, записанных при оптическом картировании; преимущественно для получения сведений о скорости распространения волны возбуждения и для визуализации волн реентри), Zen (для анализа морфологии монослоев), Wolfram Mathematica (для пост-обработки

данных и построения зависимостей), а также скриптов на языке программирования Python, используемого для численного моделирования и визуализации полученных результатов.

Третья глава посвящена основным результатам работы и разделена на подразделы, каждый из которых отражает выполнение одной из поставленных задач исследования соответственно. В данном автореферате представляется целесообразным рассмотреть результаты также для каждой задачи отдельно.

Исследование эффективности модельного биопейсмекера, полученного имплантацией светочувствительных клеток HL-1 в монослой культуры неонатальных крысиных кардиомиоцитов

В рамках данной задачи исследовались подходы к созданию экспериментальной модели оптического водителя ритма сердца. Производится поиск наиболее эффективного метода внесения и интеграции атриальных кардиомиоцитов линии HL-1 ChR2 со встроенным в мембрану светочувствительным белком, канальным родопсином, в монослой неонатальных кардиомиоцитов крысы (далее - NRVM). Для исследования были выбраны два подхода к сокультурированию: производили внесение из суспензии изолированных клеток HL-1 ChR2 в различной концентрации, а также малых кластеров клеток HL-1 ChR2, выращенных на агарозном геле (рисунок 1).

Интеграция изолированных клеток HL-1 ChR2 производилась через 6 и 48 ч, с начала культивации монослоев неонатальных кардиомиоцитов крысы. На 3-5 день с момента подсадки интегрированных клеток производилось оптическое картирование с целью выявления критических (пороговых) частот при оптической стимуляции синим светом, в ответ на которое реагируют возбуждением только клетки HL-1 (таблица 1). Выявлена монотонная возрастающая зависимость критической частоты проведения волн возбуждения при увеличении концентрации интегрируемых клеток, однако, все выявленные критические частоты (0,22 – 0,69

Гц) лежат ниже диапазона физиологически значимых частот для культуры NRVM (1-5 Гц).

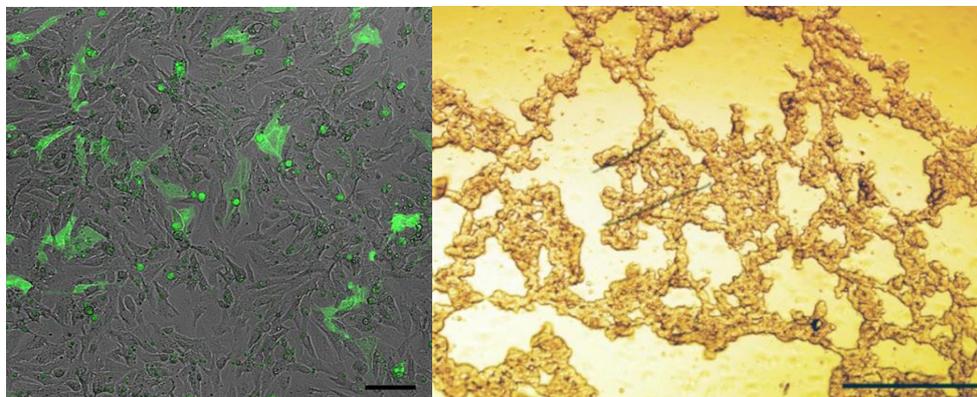


Рисунок 1 – слева: Клетки линии ChR2-HL-1, внесенные на первичную культуру NRVM. Масштабный отрезок — 100 мкм. Справа: Кластеры из светочувствительных клеток линии ChR2-HL-1: сетка, которую образуют ChR2-HL-1 на агарозном геле. Масштабный отрезок — 200 мкм

Таблица 1 – зависимость критической частоты оптической стимуляции, воспринимаемой сокультурой HL-1 и NRVM, в зависимости от концентрации вносимых клеток HL-1 ChR2

Концентрация HL-1, клеток/мм ²	Критическая частота оптической стимуляции, Гц
30	0,22 ± 0,11
70	0,26 ± 0,07
140	0,42 ± 0,05
550	0,62 ± 0,12
1100	0,69 ± 0,25

Повышение концентрации вносимых изолированных клеток из суспензии приводило к спонтанному образованию значительного количества малых

кластеров, и таким образом данные концентрации не вошли в статистику по подсчету критических частот для интегрированных изолированных клеток.

Подсадка кластеров также производилась с интервалом 6 и 48 часов от момента начала ведения культуры NRVM. При этом стоит отметить, что время интеграции оказалось существенным фактором, влияющим на возможность образования функциональных межклеточных связей между клетками линий HL-1 и NRVM. На рисунке 2 представлены различия таких кластеров. Кластеры, посаженные после 48 часов, не были способны к распластыванию, вероятно, из-за сниженной адгезии к клеткам первичной культуры по сравнению со стеклом, покрытым фибронектином.

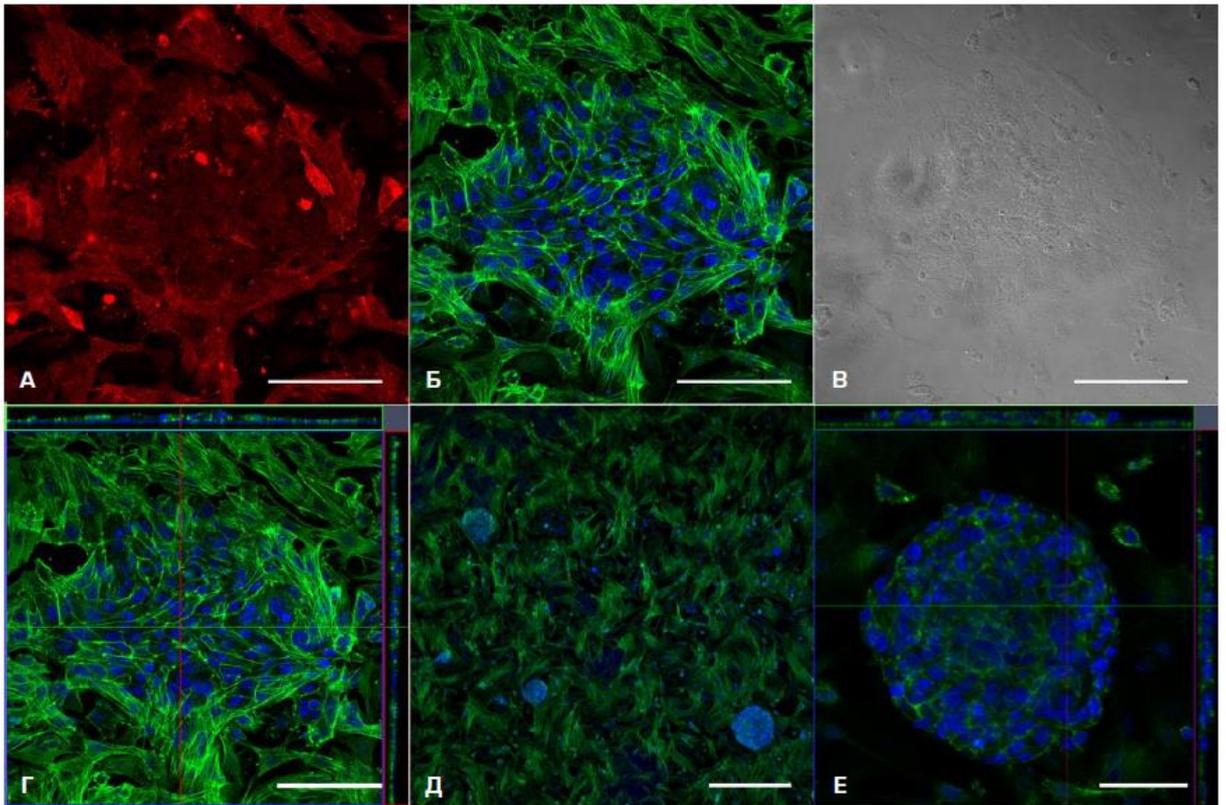


Рисунок 2 - Кластеры HL-1, интегрированные в культуру NRVM: А-Г — кластеры, внесенные через 6 ч. после культивирования первичной культуры; Д — кластеры, внесенные на 48-часовую культуру; Е - трёхмерная реконструкция одного из кластеров. Красный — α -актинин, зелёный — f-актин, синий — ядра клеток (DAPI). Изображения, полученные с помощью конфокальной микроскопии. Масштабный отрезок: А-Г — 100 мкм; Д — 300 мкм, Е — 50 мкм

Для выявления факторов, способных повлиять на критические частоты проведения возбуждения, к образцам добавлялся блокатор натриевых каналов – лидокаин, в концентрации 0,86 мМ в течение 5 мин. В результате эксперимента было выявлено статистически значимое снижение возбудимости сокультуры (рис. 3), при этом на большинстве образцов произошло полное ингибирование ответа на световое раздражение. В частности, при засветке образца с изолированными клетками HL-1, внесенными на 6-часовую культуру NRVM, ответ на оптический стимул наблюдался только в 6 из 24 образцов. При общей засветке образца с клетками HL-1, внесенными на 48-часовую культуру, ответ на оптический стимул наблюдался в 3 из 13 случаев.

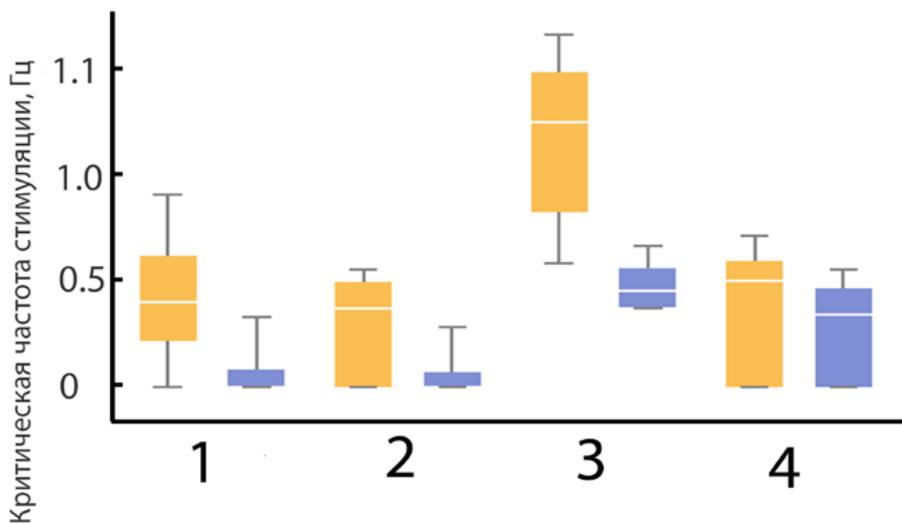


Рисунок 3 - Критические частоты, воспринимаемые сердечными монослоями из разных групп в ответ на точечный световой импульс. 1 — отдельные клетки, внесенные на 6-часовые монослои, 2 — отдельные клетки, внесенные на 48-часовые монослои, 3 — кластеры, внесенные на 6-часовые монослои, 4 — кластеры, внесенные на 48-часовые монослои. Нижний и верхний квартили с медианой, отмечены 5 и 95 перцентили. Оранжевые и фиолетовые столбцы показывают распределения до и после воздействия 0,86 мМ лидокаином

В ходе выполнения данной задачи был выявлен наиболее эффективный способ внесения клеток в первичную культуру: кластерный метод с началом времени интеграции - спустя 6 ч. культивации монослоя NRVM. Такие сокультуры показывали стабильный ответ на оптический стимул путем генерации и

изотропного проведения волн возбуждения на физиологически значимых частотах. В случае с внесенными изолированными клетками отклик на оптический стимул был зафиксирован для 88 % образцов на значениях частот, ниже физиологических, что может быть объяснимо эффектом sink-source mismatch, при котором генерируемого клеткой HL-1 потенциала действия недостаточно для создания тока, достаточного для активации соседних клеток культуры NRVM. Стоит также отметить, что образцы с кластерным методом внесения в культуру оказались гораздо более устойчивыми (100% при кластерном методе и 25% при внесении изолированных клеток) к воздействию блокатора натриевых каналов, лидокаина. При этом важным фактором для функциональной интеграции кластеров является время их подсадки, ввиду влияния этого фактора на образование межклеточных контактов между клетками интегрируемой культуры и монослоя, что также сказывается на способность сокультуры к слаженному проведению волны возбуждения. Полученные результаты в дальнейшем могут быть применены в разработке биологического водителя ритма.

Формирование проводящих путей в культуре неонатальных кардиомиоцитов

Сердечная ткань состоит из нескольких типов клеток, из которых условно мы выделяем два типа: кардиомиоциты (проводящие элементы) и фибробласты (непроводящие элементы). В рамках данной задачи мы условно принимаем за кардиомиоциты все типы проводящих клеток первичной культуры NRVM, а фибробластами называем все непроводящие типы клеток.

Будучи слабо- или непроводящими, фибробласты представляют собой препятствие для проведения волны возбуждения и таким образом могут вызывать «аритмогенные» состояния (рисунок 4,5).

В рамках выполнения данной задачи экспериментально была исследована зависимость средней скорости проведения волны возбуждения от процентного

содержания в образце фибробластов (рисунок 5, подсчет произведен по площади). Ранее данная зависимость была исследована только *in silico*, и в представлении достаточно обобщенных моделей.

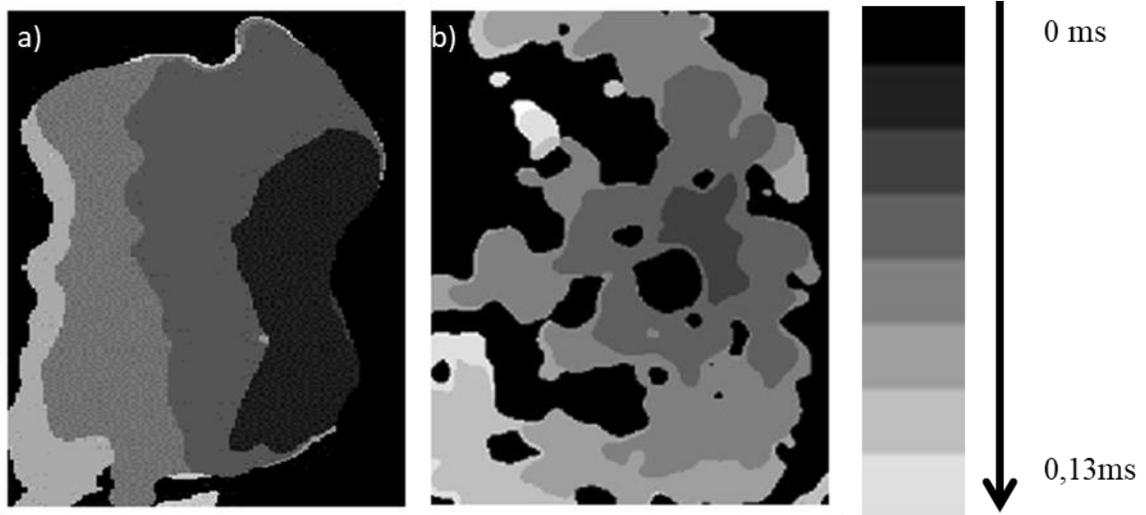


Рисунок 4 – карта активации проведения волны возбуждения: а) в монослое NRVM с высоким содержанием кардиомиоцитов (80%); б) в монослое NRVM с низким содержанием кардиомиоцитов (32%). Градиент серого указывает на время распространения фронта волны возбуждения с шагом 1,625 мс

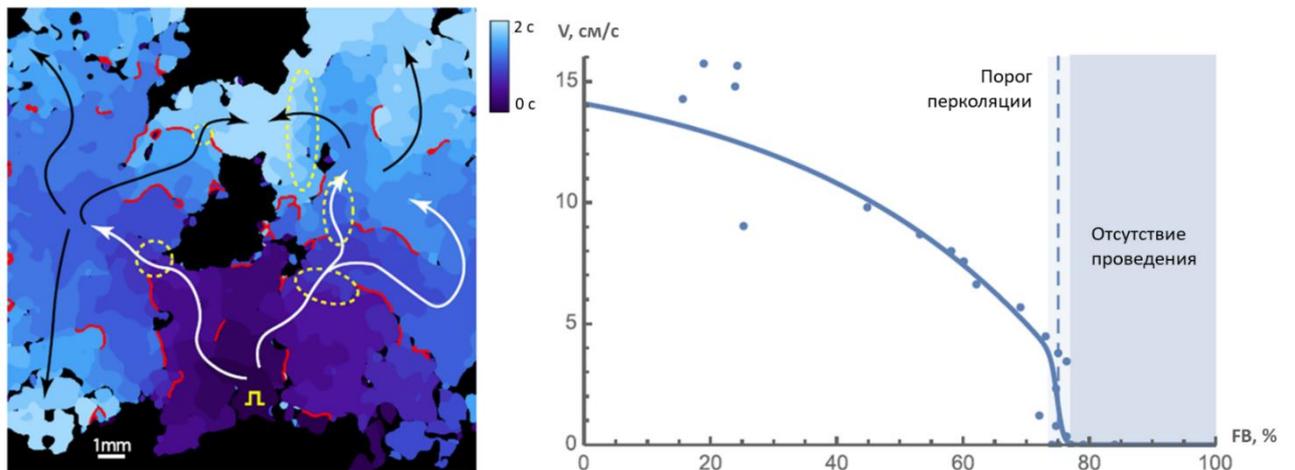


Рисунок 5 - Распространение волн возбуждения в монослое NRVM с высокой долей непроводящих клеток. слева: карта активации для образца с 66% непроводящих клеток. Время активации обозначено цветом. Красные линии показывают области, где проведение волны возбуждения было заблокировано. Белые и черные стрелки показывают основные направление распространения волны возбуждения. Желтый квадратный знак импульса указывает на

расположение стимулирующего электрода. Желтые пунктирные линии очерчивают области медленной проводимости. Справа: Снижение скорости проведения волны возбуждения с увеличением доли непроводящих клеток в образцах. Порог перколяции, ниже которого проведения не обнаружено, показан пунктирной линией и составил $75 \pm 2\%$.

В результате проведенного исследования экспериментальный порог проведения волны возбуждения вдоль всего образца (порог перколяции), составил всего 18% кардиомиоцитов, что не было сопоставимо с 40%, получаемыми при допущениях обобщенных моделей, оперирующих фактом случайного характера организации клеток в монослое [11]. При детализированном анализе образцов с низким содержанием кардиомиоцитов были выявлены повторяющиеся паттерны в морфологии получаемых из суспензии монослоев первичной культуры: кардиомиоциты объединяются в вытянутые кластеры – которые мы в данной работе будем называть проводящими путями (рисунки 6, 7).

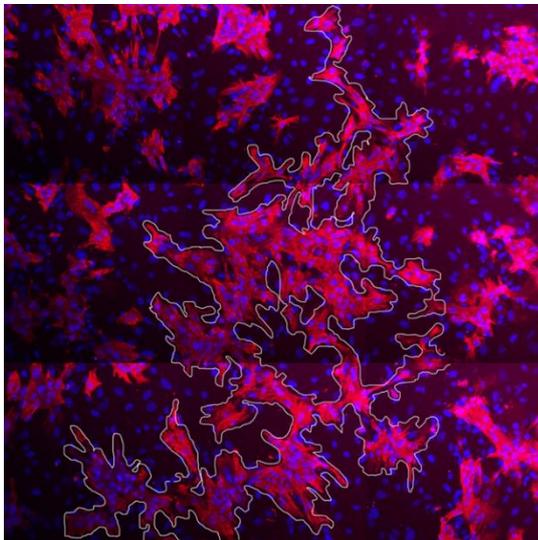


Рисунок 6 - Проводящий путь в монослое сердечной ткани с содержанием 31% кардиомиоцитов и 69% непроводящих клеток (фибробластов). Граница проводящего пути очерчена белым цветом. Кардиомиоциты помечены анти- α -актинином антителом анти- α -актинин и окрашены в розовый цвет. Ядра показаны синим цветом.

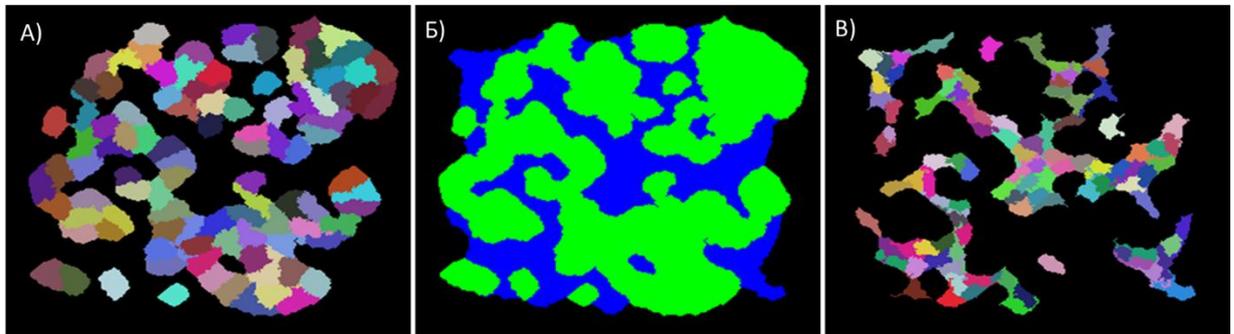


Рисунок 7 – морфология кластеров кардиомиоцитов и фибробластов, обработанное изображение, полученное методом конфокальной микроскопии а) кардиомиоциты. Различными цветами обозначены границы цитоплазмы клеток. б) общая морфология образца. Синим цветом обозначны фибробласты, зеленым – кардиомиоциты. в) фибробласты. Различными цветами обозначены границы цитоплазмы клеток.

Именно формирование проводящих путей, то есть наличие систематизированного, неслучайного характера – в противопоставлению стохастическому пространственному распределению клеток в обобщенных моделях - может объяснить возможность проведения волн возбуждения на образцах с низким содержанием кардиомиоцитов.

Особенности проведения волн возбуждения в присутствии высокого процента фибробластов были изучены как экспериментально, так и с использованием компьютерного моделирования. Условия эксперимента были также просимулированы на модифицированной клеточной модели Поттса [13]. Проведенное моделирование подтвердило гипотезу о значительном снижении порога перколяции при введении условий кластеризации клеток культуры.

Дополнительно был исследован вопрос аритмогенности фактора высокого содержания фибробластов. На рисунке 8 представлен пример морфологии образца, образующего «клеточный диод»: проведение через границу двух кластеров

возможно только в одном направлении. Было также показано, что на подобной морфологии при втором стимуле возникает волна реентри.

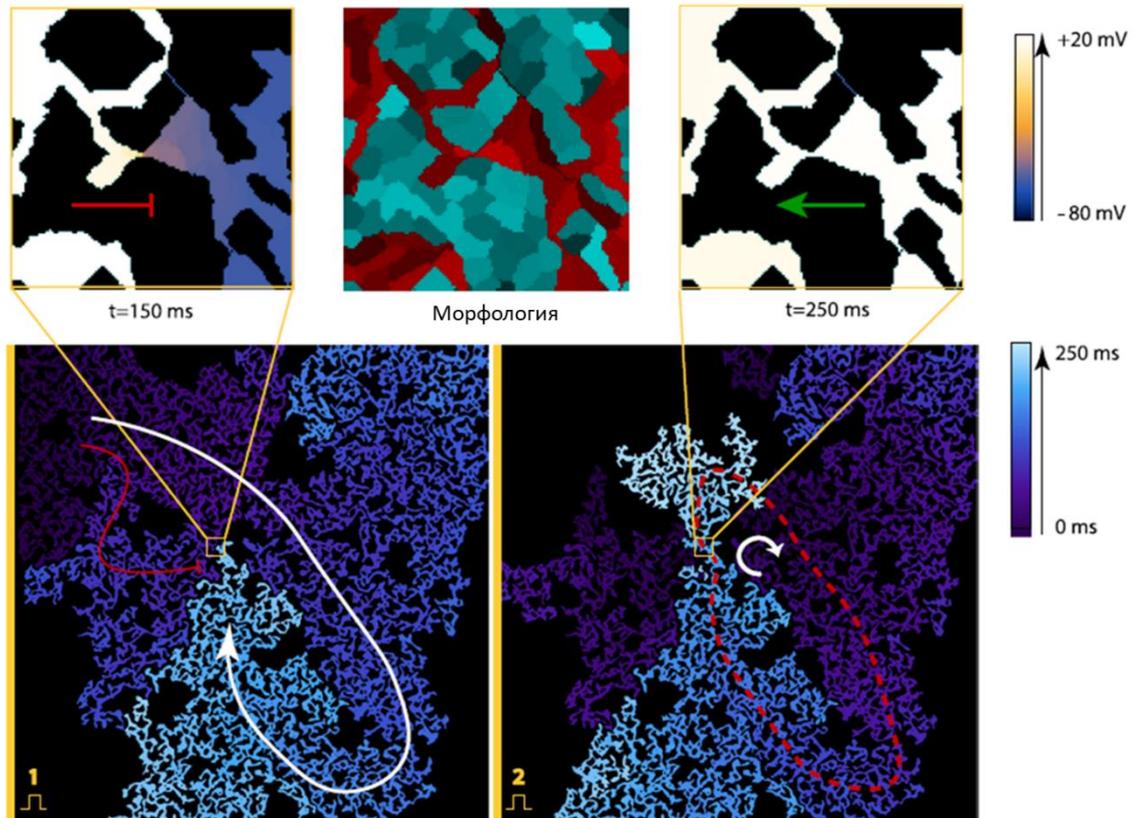
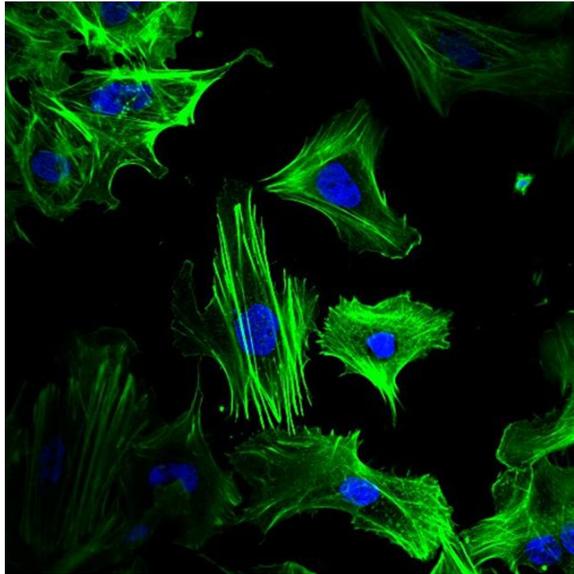


Рисунок 8 – пример участка морфологии монослоя NRVM, на которой возникает однонаправленный блок, приводящий к закручиванию волны реентри. В виртуальном образце было 29% кардиомиоцитов. Изображения в верхнем ряду показывают увеличенное изображение места, где произошел однонаправленный блок: центральное изображение показывает его морфологию, а изображения по бокам показывают распространение волны возбуждения в разных направлениях. Направление фронта волны обозначено цветом. На центральном изображении кардиомиоциты представлены оттенками красного цвета, а непроводящие фибробласты - голубым. На нижних изображениях представлены карты активации во всем образце. На левом нижнем изображении показан однонаправленный блок после первого стимула, запущенного с левой границы. На правом нижнем изображении показано формирование реентри после второго стимула. Время активации обозначены цветом. Стрелками показаны основные направления движения волны возбуждения. Красная пунктирная линия представляет цикл реентри.



*Рисунок 9 – изображение клетки с анизотропией цитоскелета. Синим изображены ядра клеток, зеленым – *f*-актин (белок цитоскелета).*

Механизм формирования проводящих путей можно объяснить функциональными взаимодействиями клеток одинакового типа без непосредственного электрофизиологического контакта – паракринными факторами. Клетки одного типа «чувствуют» присутствие друг друга и мигрируют в необходимом направлении для образования функциональных связей. На рисунке 9 приводится иллюстрация клетки, на которой видна вертикальная анизотропия цитоскелета, а вытянутая «пода» может свидетельствовать о зафиксированном процессе миграции клетки.

Изучение дрейфа волн реентри в контролируемом градиенте возбудимости сердечной ткани

В рамках данной задачи исследовалась динамика распространения волн реентри в условиях варьируемой проводимости сердечной ткани. Градиент возбудимости создавался с использованием вещества из класса азобенzenов АзоТАБ (азобензен триметиламмоний бромид), в транс-конформации блокирующего возникновение волн возбуждения, в цис-конформации не

влияющего на проведение возбуждения, и переходящего между изоформами под воздействием света ультрафиолетового диапазона.

Для возможности проведения эксперимента с градиентом возбудимости сперва была подобрана оптимальная концентрация АзоТАБ, а также максимальное и минимальное значение интенсивности ультрафиолета. Ранее в работе по измерению электрофизиологических параметров клеток на пэтч-клампе было показано, что дозозависимость транс-АзоТАБа для неонатальных кардиомиоцитов крысы имеет форму, которая указывает на отсутствие конкурентного ингибирования. Она имеет резкое увеличение скорости ингибирования в интервале концентраций 30-100 μM [12]. Для культуры ткани полное ингибирование проведения волн возбуждения происходило при концентрации 100-120 μM транс-азотаба. Таким образом была подобрана рабочая концентрация азоТАБ в 120 μM .

Далее для получения градиента возбудимости была получена зависимость возбудимости от интенсивности засветки УФ в присутствии АзоТАБ. Полученная зависимость скорости проведения волны возбуждения в монослое кадиомиоцитов от интенсивности ультрафиолета в присутствии азоТАБ (120 μM) представлена на рисунке 10. Скорость нормирована на максимальную в эксперименте (при 100%-ой засветке); интенсивность приведена в мВт/см². При засветке УФ 20% скорость проведения волны возбуждения падала в 1.7 раза относительно 100%-ой засветки. Далее наблюдался резкий спад скорости до нулевой, что соответствует существованию некоторого порога активации. Исходя из полученных результатов, можно утверждать о монотонной зависимости – при увеличении интенсивности засветки скорость волн увеличивается, характер зависимости близок к линейной на интервале от 20 до 100%-ой засветки.

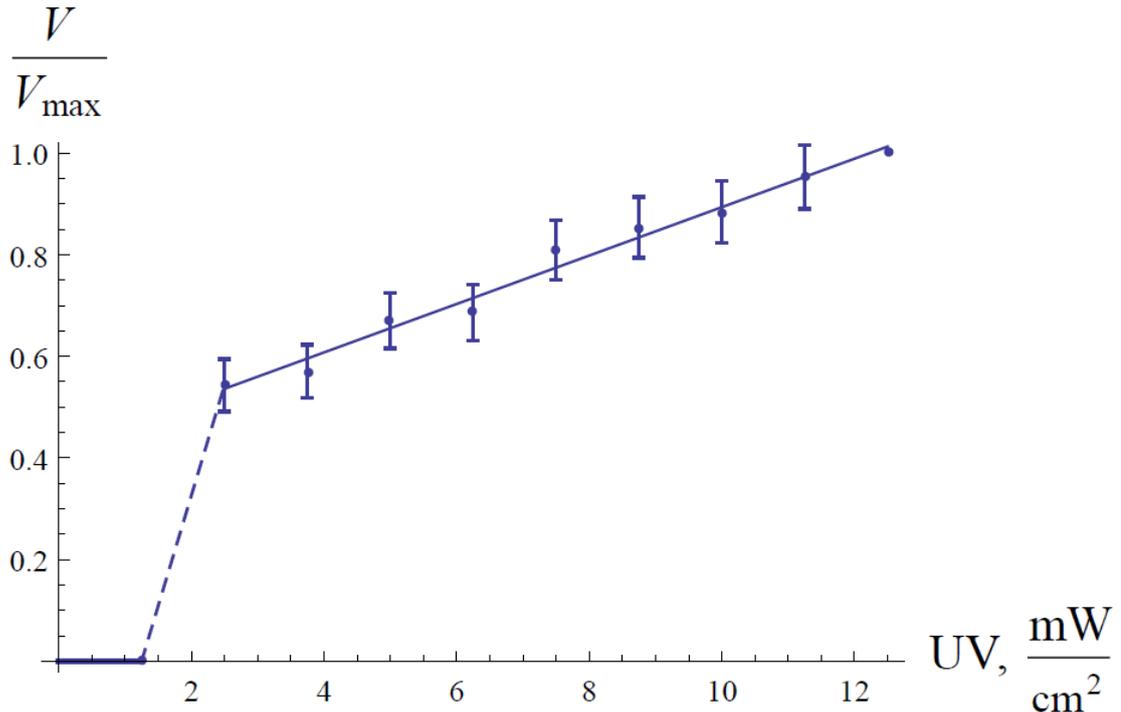


Рисунок 10 - Зависимость скорости проведения волны возбуждения в монослое кардиомиоцитов от интенсивности ультрафиолета в присутствии азоТАБ ($120 \mu\text{M}$). Скорость нормирована на максимальную в эксперименте (при 100%-ой засветке); интенсивность приведена в mW/cm^2 .

Был проведен ряд экспериментов по тестированию влияния АзоТАБа в различных изоформах на культуру сердечной ткани. При концентрации транс-АзоТАБа около $120 \mu\text{M}$ спонтанное и вынужденное возбуждение на культуре ткани полностью подавлялось в течение 5 минут. После свечения ультрафиолетом (3 минуты) АзоТАБ переходил в цис-форму, и возбуждение восстанавливалось.

При проведении эксперимента с четкой границей, то есть засвечиванием половины образца ультрафиолетом с интенсивностью от 30% до 100% интенсивности источника, при подаче стимула с засвеченной части возбуждение не проходит на не засвеченную половину образца (Рисунок 11 А). Это показывает возможность использования АзоТАБа для моделирования необходимой топологии возбудимости.

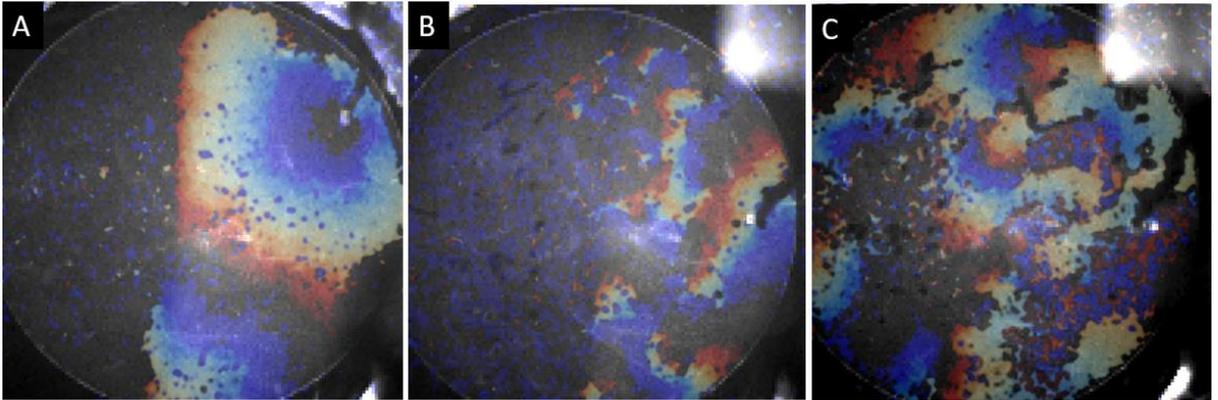


Рисунок 11 - Волна возбуждения на границе засветки ультрафиолетом образца с концентрацией азота $120 \mu\text{M}$. А: Граница с засветкой УФ 20 на 80%; В: Реентри на границе возбудимости среды; С: Множественные реентри в градиенте возбудимости среды.

Был проведен эксперимент, в котором по определенному протоколу запускалась волна реентри по середине образца с созданным градиентом возбудимости. Согласно полученным экспериментальным данным, смещение спиральной волны, в течение длительности записи – 10 с, наблюдалось с большей вероятностью в сторону меньшей возбудимости (что соответствует меньшей скорости распространения волны возбуждения) – 62% (13 из 21 эксперимента). Кроме того, мы наблюдали смещение в более возбудимую область – 29% (6/21), а также отсутствие перемещения – 9% (2/21), хотя и с меньшей вероятностью (Рис. 12).

Согласно временной развертке, представленной справа на рис. 12, можно увидеть, что на различных промежутках времени смещение центра волны реентри направлено в противоположные стороны: по градиенту возбудимости и против. Гипотеза автора для объяснения данной статистики заключается в том, что при экспериментальной съемке на видео попадает короткий промежуток времени (10с), и в зависимости от момента начала и окончания времени съемки на одном и том же образце можно получить общее смещение центра волны реентри в противоположную сторону. Для уточнения влияния различных параметров на дрейф волны было проведено компьютерное моделирование с использованием модифицированной модели Корхонена [14].

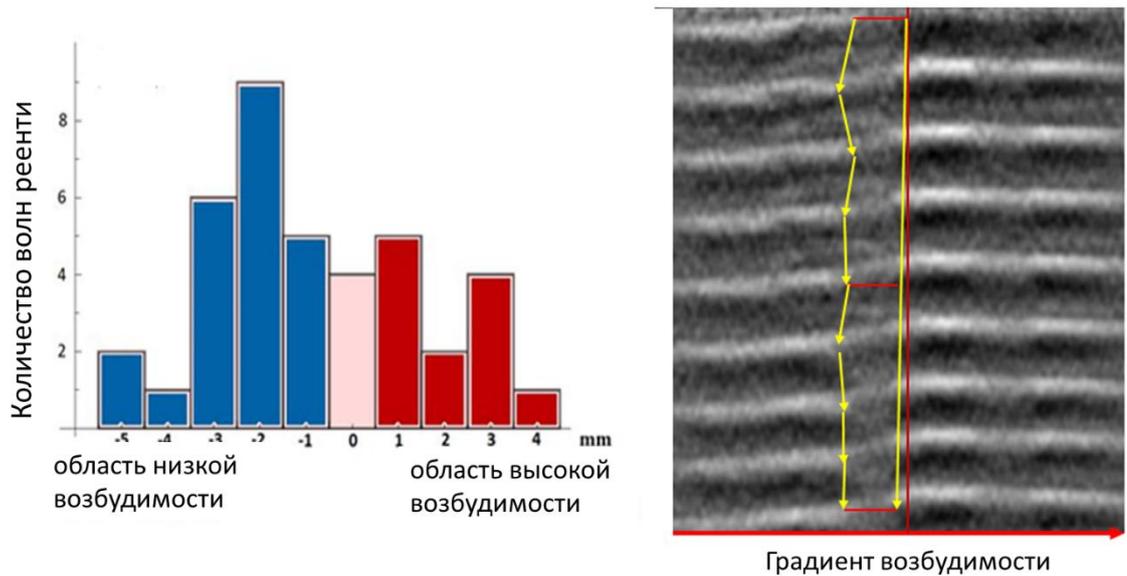


Рисунок 12 - Гистограмма смещения спиральной волны в градиенте возбудимости и иллюстрация из эксперимента дрейфа ядра волны против смоделированного градиента возбудимости. Желтыми стрелками обозначена тенденция смещения за конкретный промежуток времени.

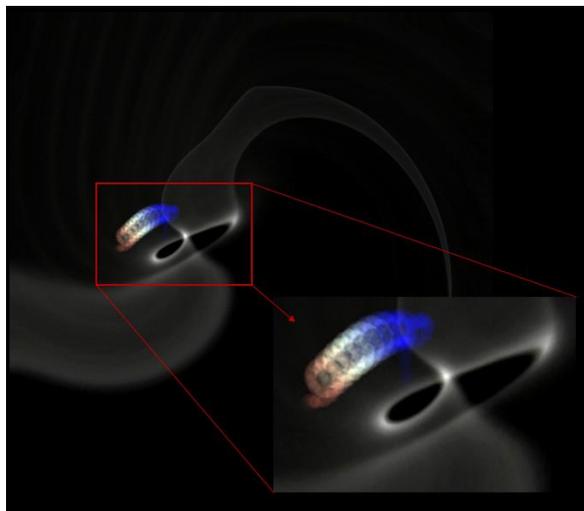


Рисунок 13 - Моделирование дрейфа одиночной спиральной волны в градиенте возбудимости аналогично эксперименту за один оборот спирали от инициации реентри. Белым показана граница спирали. Цветными переходами от синего к красному показана траектория меандринга и направление дрейфа волны. Увеличение возбудимости направлено в правую сторону.

На первом шаге вычислительного моделирования был поставлен 2D эксперимент со спиральной волной: размер образца – $5*5$ см². Спиральная волна была получена с помощью протокола S1S2 в среде с одинаковой возбудимостью и одинаковым коэффициентом диффузии по всему образцу. Для запуска реентри, волна запускалась на образце с градиентом возбудимости в качестве начальных условий. При таких условиях, когда градиент возбудимости формировался только изменением токов, дрейф реентри не наблюдался, поэтому в модель было введено небольшое изменение коэффициента диффузии для моделирования градиента возбудимости. При введении обоих градиентов в модель возбуждение реентри происходило следующим образом: протоколом S1S2 в среде без градиентов создавалось реентри, далее матрица весов среды (множество параметров в каждой точке пространства) выбиралась в качестве начальной в среде с градиентами. Наблюдалось зигзагообразное движение ядра реентри с одновременным меандрингом с общим трендом в сторону меньшей возбудимости (рис. 13). На рисунке 14 приведены временные развертки моделирования вращения реентри в такой среде при разных значениях градиента возбудимости: 4х- 3х- и 2х- кратный градиент возбудимости. Видно, что при росте градиента возбудимости скорость дрейфа ядра реентри в сторону, противоположную направлению градиента, растет и траектория “выпрямляется”.

При моделировании различной степени градиента было также показано, что от резкости изменения диффузии в среде общая тенденция дрейфа реентри оставалась сторону меньшей возбудимости. Вероятность движения реентри в сторону меньшей возбудимости в среднем (по всем рамкам считывания) составила 70%. Но необходимо подчеркнуть, что рассмотрения разных длин рамок считывания влияет на этот результат, поэтому рассмотрено только соответствующее эксперименту временное окно.

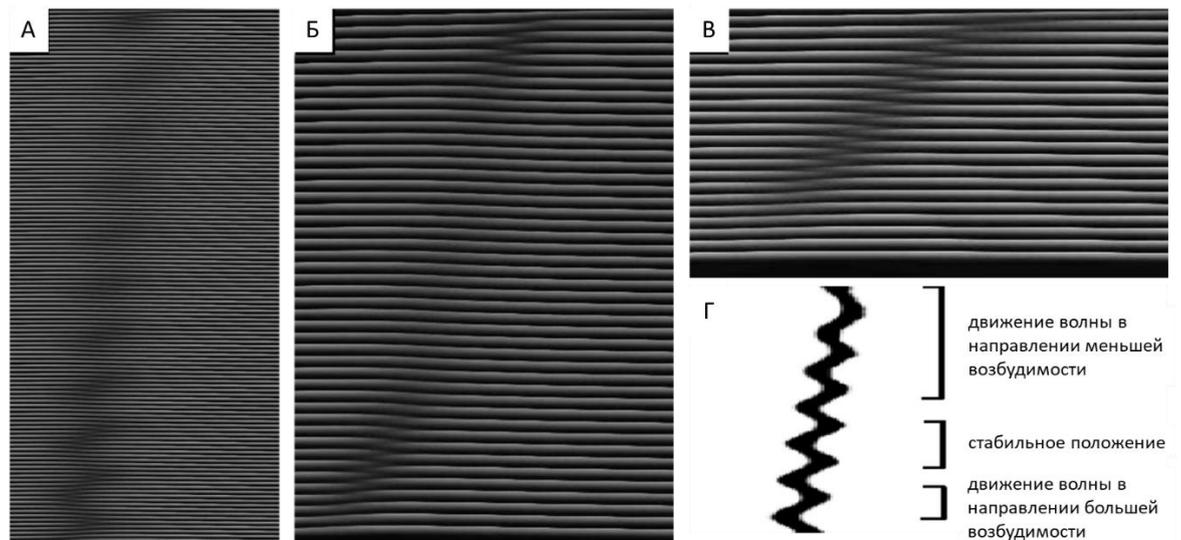


Рисунок 14 - Временные развертки моделирования вращения реентри в градиенте возбудимости среды при разных значениях градиента возбудимости; А: 4х кратный градиент возбудимости; Б: 3х кратный градиент возбудимости; В: 2х кратный градиент возбудимости; Г: возможные тенденции движения волны в градиенте возбудимости: в стороны меньшей возбудимости, стабильная позиция без дрейфа, в стороны большей возбудимости.

Влияние жесткости и степени анизотропии матрикса на фенотипические особенности кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК

Для выявления влияния такого фактора как ориентированность подложки на сократительные функции монослоев, полученных из ИПСК, и как результат, на способность к проведению волн возбуждения, исследовались 4 типа различных подложек:

- 1) стекло – в качестве контрольного материала; изотропная подложка;
- 2) культуральный пластик – изотропная подложка;
- 3) стекло с нанесенными поверх полимерными нановолокнами, ориентированными произвольно, (рис. 15 б) – присутствует локальная анизотропия вдоль направления отдельных волокон, но в силу отсутствия скоординированного направления волокон общая ориенти-рованность образца достаточно изотропная;

- 4) стекло с нанесенными поверх полимерными нановолокнами, сонаправленными по всему образцу (рис. 15 а) – подложки с высокой степенью анизотропии, имеется выделенное направление.

Стоит отметить, что все типы подложек покрывались специализированными агентами для адгезии и роста клеток.

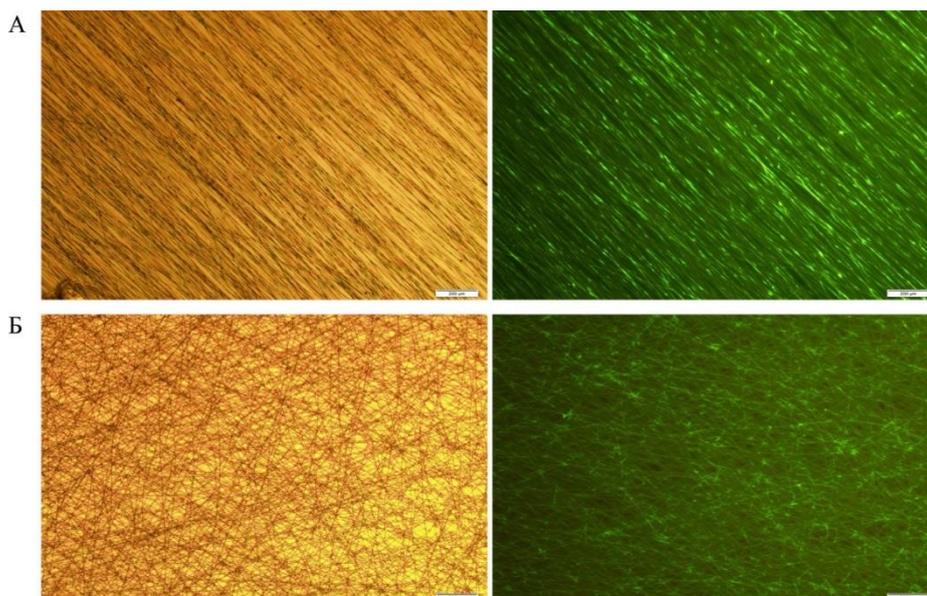


Рисунок 15 – Два типа направления полимерных нановолокон на использованных образцах а) волокна, ориентированные вдоль одного направления б) волокна, имеющие произвольную ориентацию. Слева показаны изображения волокон в прямом свете, справа – изображения с флуоресцентного микроскопа, ярко-зеленым цветом обозначена флуоресценция встроенного в волокна белка GFP.

При анализе монослоев из дифференцированных клеток, развивающихся на подложках с нановолокнами 1 и 2 типа было отмечено, что в случае изотропных волоконных подложек не наблюдается статистической разницы в развитии и морфологических, механических характеристиках по сравнению с контрольными образцами, выращенными на стекле и культуральном пластике. В случае же анизотропных подложек, при высадке клеток на выровненные волокна (рис. 16), формирование конфлюэнтного монослоя занимало в два раза больше времени.

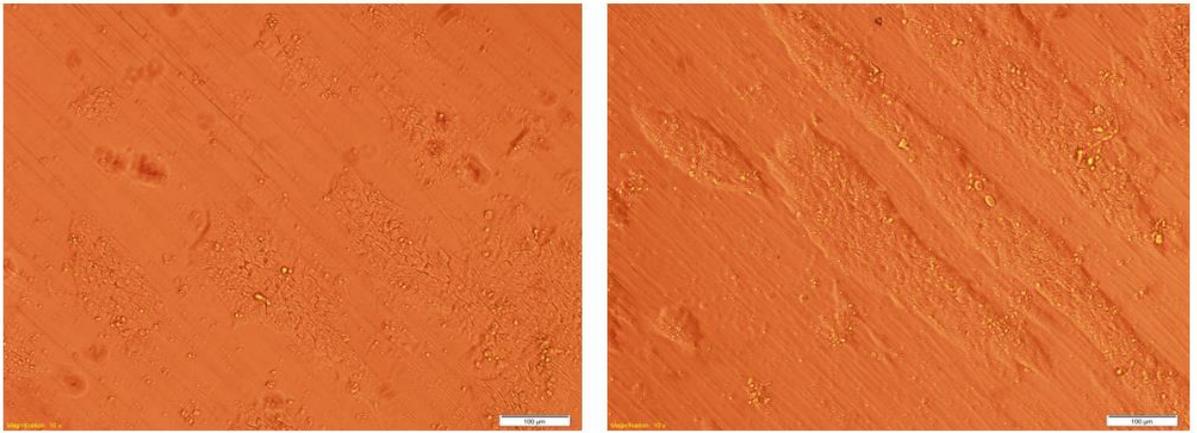


Рисунок 16 – Формирование кластеров колониями ИПСК, высаженными на выровненные нановолокна на второй день после посадки.

Дополнительно стоит отметить, что при высаживании клеток на выровненные волокна, происходит вытяжение цитоскелета клетки вдоль волокна (рис. 17), что также было отмечено в случае с культурой NRVM. Наблюдается формирование кластеров, ориентированных вдоль волокон, что соответствует морфологии, напоминающей ориентацию миокарда в человеческом сердце.

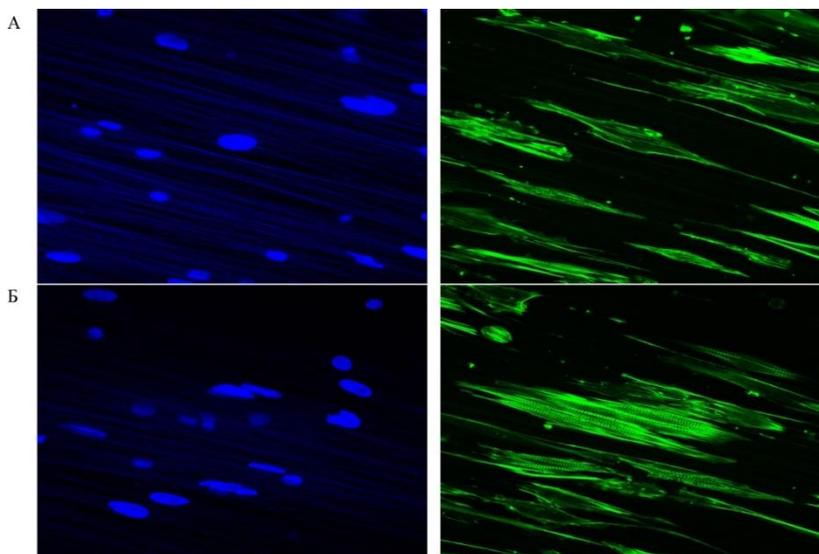


Рисунок 17. Вытягивание цитоскелета кардиомиоцитов на образцах с направленными волокнами а) (верхний ряд): формирование монослоя при концентрации посева 100 тыс. клеток на стекло б) (нижний ряд): формирование монослоя при концентрации посева 50 тыс. клеток на стекло. Слева

представлены изображения, где синим цветом передана локализация ядер клеток (DAPI), на изображениях справа зеленым цветом передана локализация цитоскелета клеток (f-актин).

В процессе дифференцировки на направленных волокнах кардиомиоциты начинают формировать тяжи. Их расположение также направлено вдоль волокон, что показано на рисунке 18.

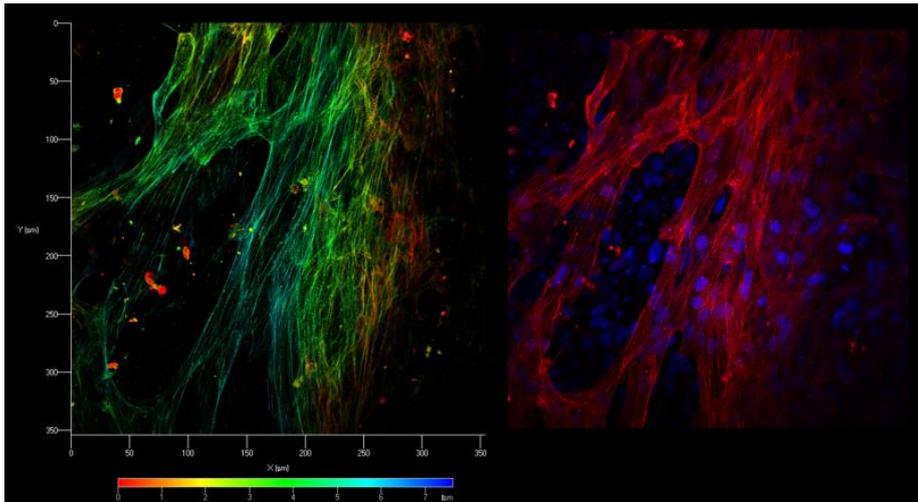


Рисунок 18. Формирование тяжей, полученных при культивировании кардиомиоцитов, полученных из ИПСК, на выровненных волокнах. На рисунке слева с помощью цветовой градации обозначено пространственное расположение тяжей: от красного (ближе) к синему (дальше). На рисунке справа красным цветом передана локализация сократительного аппарата кардиомиоцитов (α -актинин), зеленым обозначен f-актин, синим – ядра клеток. Изображение получено с использованием конфокальной микроскопии.

Самыми последними при дифференцировке стали проявлять сокращения клетки на изотропных образцах, то есть хаотично направленных волокнах. Там же наблюдались самые несинхронные сокращения и неоднородность распределения сокращающихся тяжей и кластеров кардиомиоцитов, полученных направленной дифференцировкой. Самые мощные сокращения регистрировались на пластике, что можно наблюдать на картах сокращений на рисунке 19.

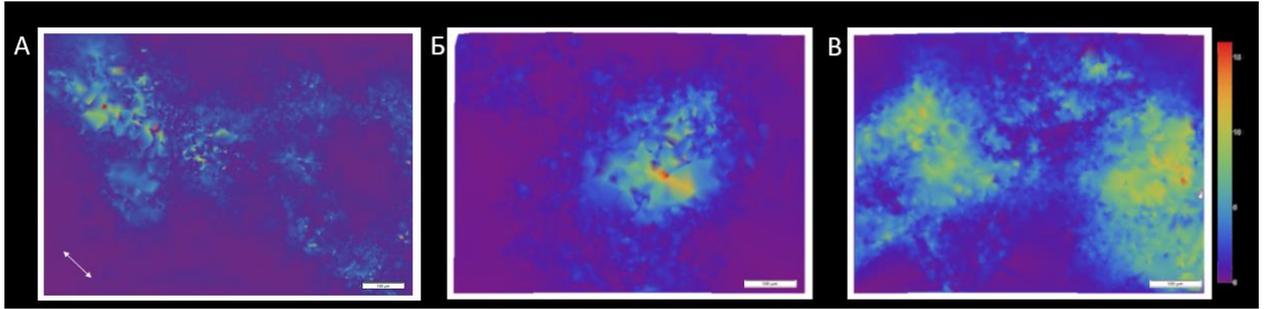


Рисунок 19. Карты сокращений для индуцированных из ИПСК кардиомиоциты, дифференцированные на анизотропном (А) и изотропном (Б) нановолоконных каркасах и стекле (В). Цветовая функция отображает локальные скорости смещения во время сокращения (мкм / с). Стрелка показывает ориентацию анизотропных волокон.

Формирование функционального проводящего синцития протекало на всех подложках по-разному. На изотропной подложке (хаотично ориентированных волокон) формирование синцития почти не происходило. Клетки сбивались в кластеры и сокращались в них, не соединяясь друг с другом. Также было проведено оптическое картирование образцов на разных подложках после 50-ого дня от начала дифференцировки (Рисунок 10), то есть со зрелыми кардиомиоцитами. Как показано на рисунке 10в при точечной стимуляции образца на изотропной подложке волна возбуждения не распространялась, а происходило возбуждение лишь соседних с электродом клеток. На рисунке 20а и 20б показаны активационные карты образцов на анизотропной подложке, то есть на направленных волокнах. Как показано возбуждение распространяется крайне неравномерно. Быстрее волна возбуждения проходит против волокон. Наиболее равномерно возбуждение распространялось на образцах с подложкой из стекла и пластика. Сравнив активационные карты, обнаружилось, что самый однородный монослой из дифференцированных в кардиомиоциты клеток формируется на пластике.

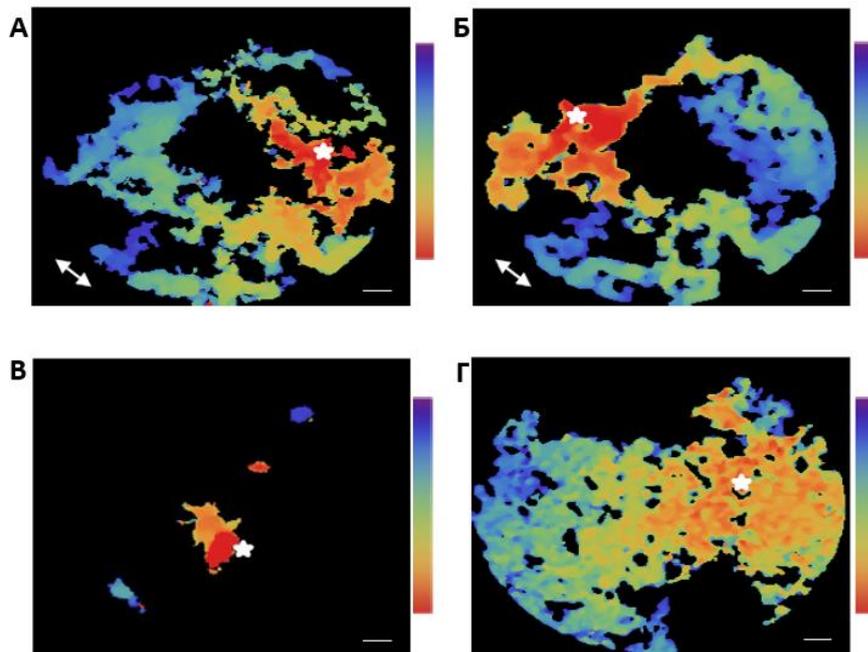


Рисунок 20. Карты активации, полученные при обработке видеозаписей оптического картирования монослоев, образованных кардиомиоцитами, полученными из ИПСК, на различных типах подложек. На рисунках а) и б) изображены активационные карты распространения волн возбуждения по монослоям, выращенным на анизотропных подложках; стрелками обозначены направления ориентации волокон; в) на подложке с произвольно направленными волокнами (изотропной); г) на стекле. Звездочкой обозначены места стимуляции монослоев с использованием точечного электрода.

Для выявления влияния жесткости подложки на фенотипические особенности кардиомиоцитов, были произведены эксперименты по высаживанию монослоя культуры на подложки из полидиметилсилоксана (PDMS) различной степени жесткости. Было выявлено, что на наиболее жестких подложках наблюдается максимальное значение скорости проведения волны возбуждения (рис. 21).

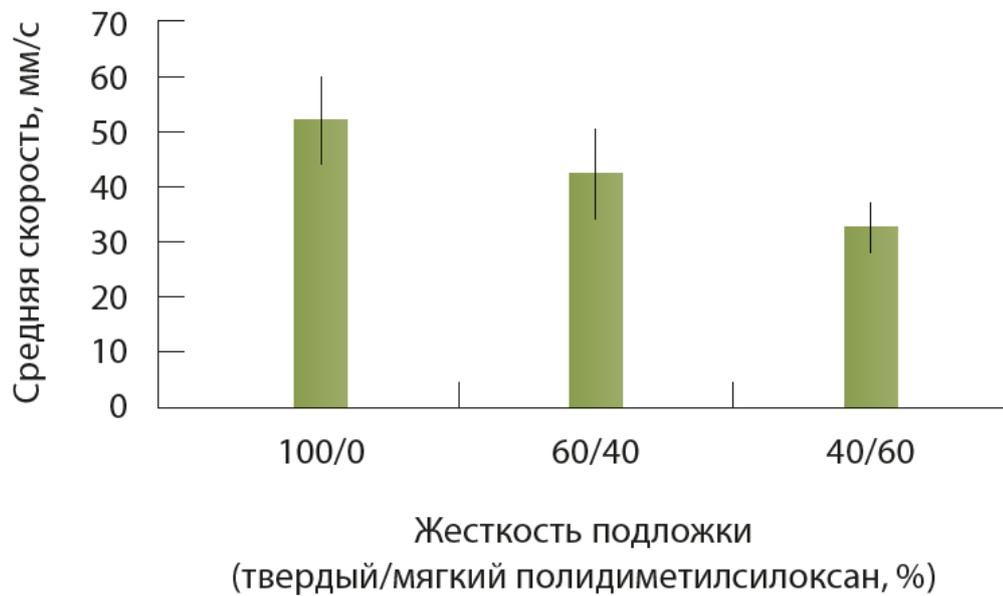


Рисунок 21. Зависимость значений средней скорости проведения волны возбуждения по кардиальным слоям, полученным в процессе дифференцировки ИПСК в кардиомиоциты, от жесткости подложки.

Выводы и обсуждение

В настоящей работе были использованы различные тканево-инженерные подходы для изучения влияния различных особенностей строения сердечной ткани на межклеточном уровне на степень их аритмогенности, то есть стабильное проведение волн возбуждения или вероятность возникновения волн реентри.

В случае образцов с низкой степенью электрической проводимости за счет высокого содержания непроводящих элементов – фибробластов был показан неслучайный характер взаимодействия кардиомиоцитов, мигрирующих для образования сетевидных структур – проводящих путей, обеспечивающих возможность проведения сигнала по длине образца. При этом, за счет высокого процента стока энергии волны возбуждения в фибробласты, скорость проведения волны возбуждения по образцам с высокой степенью «фиброза» падает, что открывает больше возможностей к наложению фронта волны возбуждения на рефрактерную зону от предыдущей волны возбуждения, а также закручивания волн

реентри вокруг «фибротических» зон кластеров фибробластов, выступающих естественным препятствием. На образцах была выявлена морфология клеточного диода, для которого наблюдается высокая вероятность возникновения однонаправленного блока, и как следствие, волны реентри.

В случае образцов с возможностью стимуляции отдельных клеток, полученных при интеграции клеток двух видов: первичной крысиной культуры NRVM и светочувствительной линии HL-1 ChR-2, было показано, что формирование межклеточных контактов как между клетками одного типа, так и между клетками двух культур является главным фактором для возможности проведения волн возбуждения в стабильном режиме. Интеграция единичных клеток HL-1 ChR-2 достаточно аритмогенна, ввиду низких значений критических частот стимуляции сокультуры. Такой метод интеграции показывает, что наличие образованных контактов от единичных клеток и интенсивность потенциала действия клеток HL-1, генерируемого при оптическом стимуле, является недостаточным для стабильного возбуждения всей культуры, при значениях частот возбуждения выше критических наблюдается отсутствие ответа на стимул либо возникновение волн реентри. Кластерная же интеграция клеток линии HL-1 способна к запуску слаженного проведения на физиологических частотах во всем образце, при условии подсадки незадолго после начала ведения культуры NRVM. Это можно объяснить тем, что при ранней подсадке между клетками двух видов происходит лучшее образование межклеточных контактов (что показано на снимках с конфокальной микроскопии), происходит большее распластывание кластеров и их интеграция в монослой. Наличие же контактов между клетками HL-1 в малых кластерах позволяет генерировать достаточную интегральную силу тока в ответ на оптический стимул для возбуждения окружающих клеток и формирования стабильного проведения.

В случае образцов с градиентом возбудимости, которые были получены за счет добавления к культуре светочувствительного вещества АзоТАБ, способного к разной степени влияния на снижение возбудимости ткани в присутствии УФ, при

градиентном паттерне возбудимости был показан общий тренд дрейфа свободных волн реентри в сторону меньшей возбудимости. Учтен эффект меандринга, из-за которого траектория ядра волны реентри совершает «зигзагообразные» повороты, и в связи с которым объясняется возможность краткосрочного дрейфа свободной волны реентри в сторону большей возбудимости или ее стационарного положения при краткосрочной рамке считывания. С использованием компьютерного моделирования на модели типа реакция-диффузия было показано, что такая динамика волны реентри возможна только в случае, когда изменяются не только токи ионных каналов, но и коэффициент диффузии, что в реальном эксперименте является изменением свойств межклеточных контактов. Таким образом показано, что на динамику дрейфа свободной спиральной волны, созданного в присутствии АзоТАБ, влияет не только изменение свойств мембраны клетки, но и изменение свойств межклеточных взаимодействий.

В образцах с монослоями, формируемыми кардиомиоцитами, полученными из ИПСК человека, было исследовано влияние характеристик подложки на характер проведения волн возбуждения. Наибольшая скорость проведения волн возбуждения на жестких подложках по сравнению с мягкими может быть объяснена влиянием фактора адгезии кардиомиоцита к подложке на силу сжатия его сократительного аппарата. На жесткой подложке наблюдается максимальная степень сжатия кардиомиоцита, что в свою очередь способствует большей скорости распространения волны возбуждения. Было показано, что наличие ориентации в монослое сердечной ткани также является фактором, влияющим на проведение волн возбуждения. В изотропных образцах с хаотично направленными волокнами кардиомиоциты вытягивались вдоль направления волокна, к которому прикреплялись, и, по всей видимости, в основном формировали больше контактов с поперечного края. Прикрепленность к волокнам видимо также снижала степень миграции кардиомиоцитов и не способствовала формированию большего количества щелевых контактов между клетками, чем можно объяснить проведение волн возбуждения лишь по малым кластерам. Особенности формирования

межклеточных контактов также объясняется наибольшая скорость проведения волн возбуждения в анизотропных образцах с однонаправленными волокнами, что в целом повторяет структуру миокарда в сердце человека.

Таким образом, с использованием биоинженерных подходов, были получены экспериментальные модели, позволившие контролируемо создавать монослои кардиомиоцитов с различными свойствами и на межклеточном уровне исследовать роль функциональных взаимодействий клеток на проведение волн возбуждения и определить зависящие от них факторы аритмогенности, способствующие возникновению волн реентри и влияющие на динамику их распространения.

Заключение

В рамках настоящего исследования были достигнуты следующие результаты:

- показан неслучайный характер процесса самоорганизации сердечной ткани. Выявлены специфические вытянутые структуры из кластеров кардиомиоцитов между окружающими фибробластами – проводящие пути. Найдено пороговое значение, необходимое для возможности проведения волн возбуждения вдоль всего образца. Экспериментально измерена зависимость скорости проведения волны возбуждения от процентного содержания кардиомиоцитов, а также посредством иммуноцитохимии изучена структура образцов, которая показала наличие проводящих путей во всех проводящих образцах. Выявлены примеры морфологии сердечной ткани при низком содержании кардиомиоцитов, способствующих возникновению однонаправленного блока и волн реентри;

- создана оптическая экспериментальная модель биопейсмейкера, фоточувствительность которой обусловлена встраиванием канального родопсина-2 в мембраны пейсмейкерных клеток, выявлены аспекты формирования функциональных межклеточных связей между интегрируемой и реципиентной культурой клеток, подобран оптимальный способ подсадки клеток для

возможности регулярного проведения волн возбуждения на физиологически значимых частотах при оптической стимуляции;

- создана экспериментальная модель, в которой возможно методом фотоконтроля обратимо изменять возбудимость, для изучения дрейфа волн возбуждения в сердечной ткани; экспериментально показан механизм дрейфа волн реентри в градиенте возбудимости и приведены гипотезы для объяснения такой динамики процесса.

Выполнение вышеперечисленных задач позволило достичь цель настоящей работы – исследовать роль функциональных межклеточных взаимодействий в распространении волн возбуждения по монослою сердечной ткани в различных условиях. Было показано, что такие характеристики как количество, морфология, влияние химических агентов на межклеточные контакты между клетками одного типа или различными типами клеток в ткани сердца непосредственно влияют на степень аритмогенности таких структур и вероятность возникновения волн реентри.

Благодарности

Автор выражает благодарность своему научному руководителю – Агладзе К.И. за общую координацию научной работы.

Автор благодарит своих коллег Цвелую В.А., Кудряшову Н.Н., Балашова В.А., Слотвицкого М.М., Бережного А.К., Щербину С.А., Калиту И.Ю. за совместную работу и содействие в получении научных результатов.

Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:

1. Балашов, В. А., Низамиева, А. А., Цвеляя, В. А., Агладзе, К. И. Интеграция светочувствительных кардиомиоцитов в сердечные культуры как модель оптического биопейсмейкера// Гены и клетки, 2018. – 13(4), 43-50.
2. Kudryashova, N., Nizamieva, A., Tsvelaya, V., Panfilov, A. V., Agladze, K. I. Self-organization of conducting pathways explains electrical wave propagation in cardiac tissues with high fraction of non-conducting cells// PLoS computational biology, 2019, 15(3), e1006597.
3. Щербина С. А., Шутько А. В., Низамиева А. А., Никитина А. В., Слотвицкий М. М., Цвеляя В. А., Агладзе К.И. Исследование формирования тканево-инженерного конструкта на основе кардиомиоцитов и матрикса различной степени анизотропии и жесткости// Альманах клинической медицины, 2021, 49(6), 365-374.

Список использованной литературы

1. Электронный ресурс: информационный бюллетень «Сердечно-сосудистые заболевания» Всемирной организации здравоохранения, дата обращения: 22.04.2022
[https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
2. Wang et al., (2016). Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet*, том 388, 10053, с. 1459-1544
3. Hoffman, B. F., & Rosen, M. R. (1981). Cellular mechanisms for cardiac arrhythmias. *Circulation research*, 49(1), 1-15.
4. Moe, G. K. (1975). Evidence for reentry as a mechanism of cardiac arrhythmias. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Volume 72, 55-81.
5. Wit, A. L. (1990). Cellular electrophysiologic mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cardiology Clinics*, 8(3), 393-410.
6. Agladze, K., Kay, M. W., Krinsky, V., & Sarvazyan, N. (2007). Interaction between spiral and paced waves in cardiac tissue. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 293(1), H503-H513.
7. Kadota, S., Minami, I., Morone, N., Heuser, J. E., Agladze, K., & Nakatsuji, N. (2013). Development of a reentrant arrhythmia model in human pluripotent stem cell-derived cardiac cell sheets. *European heart journal*, 34(15), 1147-1156.
8. Krinsky, V. I., & Agladze, K. I. (1983). Interaction of rotating waves in an active chemical medium. *Physica D: Nonlinear Phenomena*, 8(1-2), 50-56.
9. Fenton, F. H., Cherry, E. M., & Glass, L. (2008). Cardiac arrhythmia. *Scholarpedia*, 3(7), 1665.
10. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *cell*, 131(5), 861-872.

11. Ten Tusscher, K. H., & Panfilov, A. V. (2007). Influence of diffuse fibrosis on wave propagation in human ventricular tissue. *Europace*, 9(suppl_6), vi38-vi45.
12. Frolova S. R. et al. Photocontrol of Voltage-Gated Ion Channel Activity by Azobenzene Trimethylammonium Bromide in Neonatal Rat Cardiomyocytes // *PLoS One*. – 2016. – T. 11. – №. 3. – C. e0152018
13. Kudryashova, N., Nizamieva, A., Tsvelaya, V., Panfilov, A. V., & Agladze, K. I. (2019). Self-organization of conducting pathways explains electrical wave propagation in cardiac tissues with high fraction of non-conducting cells. *PLoS computational biology*, 15(3), e1006597.
14. Majumder, R., Engels, M. C., de Vries, A. A., Panfilov, A. V., & Pijnappels, D. A. (2016). Islands of spatially discordant APD alternans underlie arrhythmogenesis by promoting electrotonic dyssynchrony in models of fibrotic rat ventricular myocardium. *Scientific reports*, 6(1), 1-12.