

На правах рукописи

Цвелая Валерия Александровна

**«Тканевая инженерия сердца как средство для исследования
фундаментальных процессов возникновения реентри»**

Специальность 03.01.02 Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва

2019

Работа прошла апробацию в департаменте молекулярной и биологической физики федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»

Научный руководитель: Константин Игоревич Агладзе, кандидат физико-математических наук, заведующий лабораторией биофизики возбудимых систем Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)».

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

Защита состоится «23» декабря 2019 года в 14.00 на заседании диссертационного совета ФБМФ03.01.02. 004, по адресу: 141701, г. Долгопрудный Московской обл., Институтский переулок, д. 9.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Московского физико-технического института (национальный исследовательский университет)
<https://mipt.ru/education/post-graduate/soiskateli-biologicheskie-nauki.php>.

Работа представлена «27» сентября 2019 г. в Аттестационную комиссию федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)» для рассмотрения советом по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук в соответствии с п .3.1 ст . 4 Федерального закона «О науке и государственной научно - технической политике»

Общая характеристика работы

Актуальность исследования.

Согласно исследованию «Глобальное Бремя Болезней (ГББ или Global Burden of Disease (GBD))»: сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются основной причиной глобальной смертности с 1980 года по сегодняшний день [1]. На долю ССЗ приходилось почти треть всех смертей в мире в 2015 году [1, 2]. На протяжении последних лет смертность от ССЗ только увеличивается. Значительная часть ССЗ приходится на нарушения ритма сердца, в частности, тахиаритмии. Наиболее опасны желудочковые тахиаритмии, часто приводящие к фибрилляции, манифестируемой как внезапная сердечная смерть. В настоящее время известно, что в основе большинства сердечных тахиаритмий лежат циркулирующие волны возбуждения - реентри. За последние 20 лет были созданы системы так называемого оптического картирования возбуждения в сердце, убедительно продемонстрировавшие роль реентри в возникновении тахиаритмий и переходе к режиму фибрилляции [3,4]. Несмотря на успешное применение оптического картирования целого сердца (обычно искусственно перфузируемого в так называемых препаратах Лангендорфа) для доказательства возникновения реентри как основы развивающейся тахиаритмии, конкретные биофизические механизмы возникновения реентри в препаратах целого сердца изучать затруднительно. Эта трудность обусловлена сложным строением сердца, а также его трехмерностью, затрудняющей использование методов оптического картирования для регистрации возбуждения, распространяющегося в толще миокарда.

Тканево-инженерные модели сердечной ткани при использовании оптического картирования позволяют интерактивно наблюдать распространение возбуждения, исследовать образование реентри в результате взаимодействия волн возбуждения с различными анатомическими препятствиями и видеть непосредственный ответ распространяющихся волн и реентри на фармакологические препараты. Открытие клеточного перепрограммирования и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), сделанное S Yamanaka в 2006 г., дало новые возможности для получения тканево-инженерных моделей сердечной ткани на основе дифференцированных из ИПСК человеческих кардиомиоцитов, которые уже демонстрируют свою эффективность [5]. Например, было продемонстрировано сравнение эффективности влияния различных антиаритмических препаратов на динамику реентри в монослое человеческих вентрикулярных кардиомиоцитов [6,7].

Более того, для ряда сердечных патологий, таких, например, как синдром удлиненного интервала QT (long QT syndrome - LQTS), не существует адекватных животных моделей, поэтому использование человеческих тканей становится незаменимым. Видовые и фенотипические различия являются актуальной проблемой, если используются кардиомиоциты лабораторных животных для моделирования особенностей ССЗ человека. Например, мышиные сердца бьются примерно в 6–10 раз быстрее, чем человеческие, также мышиные кардиомиоциты обладают заметно более короткими потенциалами действия, так как формируются другими ионными каналами. У людей мутации гена KCNQ1, кодирующего ионный канал, ответственный за ток I_{Ks} , могут вызывать синдром удлиненного QT интервала первого типа (LQTS1). Данное заболевание, характеризуется длительным интервалом QT в ЭКГ и склонностью к потенциально летальным аритмиям [8]. Однако генетическая абляция KCNQ1 у мышей не всегда приводила к фенотипу сердца как у пациентов с синдромом длительного QT [9, 10]. Наиболее вероятной причиной этих расхождений является факт, что реполяризация потенциала сердечного действия регулируется различными ионными токами у мышей и у человека. Например, основными токами реполяризации являются токи замедленного выпрямления I_{Kr} и I_{Ks} у человека, а у мыши а ток I_{Kr} отсутствует [11, 12]. Эти видовые различия имеют отношение не только к моделированию редкого заболевания, такого как врожденный синдром удлиненного интервала QT, но также ставят под сомнение достоверность моделей грызунов для прогнозирования пролонгированного интервала QT, вызванного лекарственными препаратами. В совокупности существует неудовлетворенная потребность в более совершенных модельных системах сердечных заболеваний человека. Поэтому изучение и устранение проблем данных моделей, в том числе и прогностических компьютерных, и создание на основе полученных данных адекватной тканевоинженерной модели для исследований врожденных и приобретенных патологий является актуальной задачей современной науки и главной целью данной работы.

Индукрованные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) обладают потенциалом для создания подобной модели, предоставляя неограниченный источник пациент-специфичных кардиомиоцитов человека, от условно здоровых доноров и доноров с врожденными патологиями. В частности, есть как минимум три области, в которых кардиомиоциты, полученные из ИПСК, могут использоваться: фармакология безопасности (кардиотоксичность), поиск новых мишеней для лекарственных средств, трансплантология, создание базы данных по лекарственным средствам по генетическим

мутациям и др.. Особенno важно проверять лекарственные препараты-кандидаты на кардиотоксичность, в частности, в отношении их потенциала (но не ограничиваясь ими) пролонгировать интервал QT и вызвать *torsades de pointes* (пируэт), и, в конечном итоге, фибрилляцию желудочков. Представляемая работа посвящена нескольким задачам тканевой инженерии, в том числе и разработке тканевоинженерной экспериментальной модели для исследования риска возникновения аритмий на основе пациент-специфичных ИПСк человека.

За несколько лет работы над проектом удалось исследовать образование волн реентри на тканево-инженерной модели, созданной на основе сердечных клеток, полученных методом клеточного репрограммирования от пациентов с синдромом удлиненного QT интервала второго типа и от пациентов без мутаций в ионных каналах сердечных клеток [13, 7]. Кроме того, было исследовано образование волн реентри под действием препаратов, вызывающих индуцированный LQTS [7,14]. Было проведено пациент-специфичное и видоспецифичное сравнение проведения волн возбуждения [13,7]. Найдены граничные условия и усовершенствована предсказательная модель основанная на монослоях неонатальных кардиомиоцитов крыс [15]. Продемонстрирована возможность проведения кальциевых волн возбуждения [16]. Положено начало для создания неинвазивного оптического способа пейсмейкерной стимуляции сердечной ткани при подсадке кардиомиоцитов с канальным родопсином [17]. Полученные данные позволили предложить тканево-инженерную модель, для тестана аритмогенность, основанную на синцитиальном слое дифференцированных вентрикулярных кардиомиоцитов с созданным в нем стандартным невозбудимым препятствием. На основе экспериментальных данных был предложен механизм возникновения реентри при патологическом удлинении интервала QT, что представляет собой готовую модель для тестирования кардиотоксичности лекарственных средств.

Цели и задачи исследования

Основной целью представленной работы было изучение ключевых механизмов возникновения реентри и создание на основе полученных данных адекватной тканевоинженерной модели для исследований врожденных и приобретенных патологий.

Основной задачей работы, таким образом, являлась разработка тканевоинженерной экспериментальной модели для исследования риска возникновения аритмий на основе

данных о механизмах проведения волны возбуждения в культурах сердечных кардиомицитов разных животных и человека.

В задачи работы также входило:

1. Исследование распространения волны возбуждения вдоль границы возбудимости или невозбудимого препятствия по культуре сердечных клеток
2. Исследование электромеханического взаимодействия клеток различных типов, в том числе клеток, полученных от разных животных.
3. Исследование возможностей создания неинвазивного метода стимуляции сердечной ткани и контроля возбудимости
4. Создание тканево-инженерной модели для исследования патологий сердца человека, как врожденных, так и приобретенных
5. Проверка полученной тканево-инженерной модели при определении аритмогенности различных химических соединений

Научная новизна исследования.

В настоящее время все оценки потенциальной аритмогенности делаются либо на клеточном уровне, на основании наличия нарушений работы потенциал-зависимых ионных каналов, либо при преклинических или клинических испытаниях. С точки зрения механизмов возникновения аритмии, такие данные являются косвенными и не гарантируют понимания того, как аритмия развивается и какими методами можно ее купировать. В данной работе представлено исследование влияния границ возбудимостей, дефектов, неоднородностей на проведение волны возбуждения по культуре сердечных кардиомиоцитов. В работе показана возможность электромеханического контакта между сердечными клетками животных различных видов, а также исследована возможность оптической стимуляции при сращивании кардиомиоцитов разных типов. На базе проведенных исследований был предложен новый метод, позволяющий непосредственное изучение механизма формирования волн реентри на человеческих кардиомиоцитах, полученных из пациент-специфичных линий ИПСк. Была введена мера аритмогенности, базирующаяся на определении вероятности возникновения реентри при воздействии на сердечную ткань. С точки зрения фундаментальной науки предлагаемый метод дает радикально более информативный инструмент исследования нарушения проведения возбуждения, чем предлагаемые ранее модели.

Практическая значимость исследования.

С точки практической точки зрения метод позволяет вводить объективно определяемую меру аритмогенности фармако-химического или иного воздействия. Данная работа представляет принципиально новый метод исследования аритмогенности, связывающий данные фундаментальных исследований (биофизических, генетических, биологических) с непосредственным практическим применением - созданием эффективного метода скрининга кардиотоксичности фармпрепаратов. При этом, предлагаемый тест способен заполнить разрыв между исследованиями на отдельных клетках и на целом организме.

В перспективе, возможно тестирование кардиотоксичности на персонализированных моделях, получаемых из биоматериала конкретного пациента. Таким образом, предлагаемая работа предлагает создание фундамента инновационной технологии в области высокотехнологичного здравоохранения и персонализированной медицины.

Методология исследования

В работе использовались клеточные технологии, такие как: клеточное репрограммирование, культивирование различных клеточных линий (ИПСк, HL-1, неонатальные кардиомиоциты крысы), дифференцировка клеток и другие. В исследовании также участвовали вспомогательные методы для изучения получаемых кардиомиоцитов и разработки модели: оптическое картирование, иммуноцитохимия, конфокальная микроскопия, электроспиннинг и различные методы микроскопии.

Положения, выносимые на защиту

1. Тканевоинженерная экспериментальная модель, полученная в процессе исследования, демонстрирует и дает данные о количественной оценке риска возникновения аритмий. Модель основывается на данных о механизмах проведения волны возбуждения в культурах сердечных кардиомиоцитов разных животных и человека.
2. Существуют временные периоды в формировании межклеточных контактов у кардиомиоцитов в процессе дифференцировки.
3. Ключевую роль в возникновении тахиаритмий играют неоднородности и травматические дефекты.
4. Тип граничных условий дефекта играет определяющую роль в формировании реентри.

5. Существует возможность проведения волны возбуждения при высокой степени гиперкалиемии.
6. Существует возможность межвидовой пересадки сердечных тканей с формированием электро-механического кардиального синцития.
7. Полученная тканево-инженерная модель релевантна для тестирования фармпрепараторов, для исследования риска возникновения аритмий под воздействием как внешних факторов, так и врожденных пациент-специфичных патологий.

Вклад автора

Основные результаты диссертационной работы получены лично автором. Большинство экспериментов, связанных с функциональностью кардиального синцития, были поставлены и совершены автором работы. Автор принимал непосредственное участие в репрограммировании клеток пациентов для получения клеточных линий, разработке компьютерных моделей. Также автор проводил анализ и обобщение полученных результатов, внёс вклад в подготовку и оформление публикаций по теме работы. Автор выражает благодарность соавторам по опубликованным статьям.

Апробация научных результатов

Основные результаты работы опубликованы в 6 печатных работах [7, 13-17]. Также несколько публикаций, которые связаны с представленной работой, не вошли в основные результаты [21, 20, 32, 25-28]. Была опубликована глава в книге «Stem Cells: from hype to hope» под редакцией K. H. Haider, S. M. Aziz [22].

Также результаты работы были доложены на нескольких международных конференциях: 58-я конференция МФТИ Долгопрудный, «ФИЗТЕХ-МЕД» (10-11 сентября 2015г) Долгопрудный, “StemCellBio-2018: Фундаментальная наука как основа трансляционной медицины” Санкт-Петербург (2018 г.), International Conference «Instabilities and Control of Excitable Networks» Долгопрудный, «ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ И КОМПЬЮТЕРНАЯ БИОМЕДИЦИНА» Екатеринбург (2016 г.), «Наука будущего» Казань (2016 г.) и другие.

Структура и объем работы

Работа состоит из введения, 3 глав, обсуждения, выводов, благодарностей и списка цитируемой литературы. Объем диссертации составляет 164 страниц машинописного текста, включая 72 рисунков и 290 библиографических ссылок.

Основное содержание работы

Введение представляет собой обоснование актуальности темы диссертационной работы, где также сформулированы цель и задачи, отражены научная новизна и практическая значимость работы, описана апробация полученных результатов, вклад автора, представлены защищаемые положения.

Глава 2 представляет собой литературный обзор о различных методах исследования проводимости сердца и проблемах современной тканевой инженерии сердца. Раскрыты различные сердечные патологии и современные платформы для их исследования. Также разбираются проблемы использования различных клеточных культур для применения в таких платформах.

Глава 3. Материалы и методы

Клеточное репрограммирование. Линии ИПСк. Дифференцировка ИПСк в кардиомиоциты.

Первым этапом в получении линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) было получение клеточного материала донора. В данной работе использовались линии от человека без врожденных сердечно-сосудистых заболеваний, а также линии с мутацией T613M в гене KCNH2, приводящая к удлинению интервала QT у пациентов. Все клеточные линии были получены в ИЦИГ РАН от пациентов ФГБУ НМИЦ им. академика Е.Н. Мешалкина, г. Новосибирск. Подготовительные процессы клеточного репрограммирования описаны в [7,14]. Репрограммирование осуществлялось из клеток мононуклеаров крови пациентов [7, 13, 14]. Фибробlastы и мононуклеары были репрограммированы к плюрипотентному состоянию по протоколу Epi5 Episomal iPSC Reprogramming Kit (ThermoFisher Scientific, ссылка: <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A15960>). Полученные в результате репрограммирования колонии ИПСк будут выглядеть так, как представлено на рисунке 1.

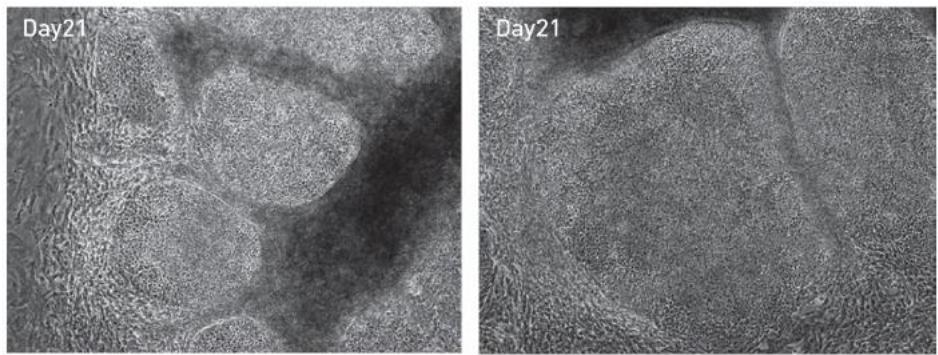


Рисунок 1 - Полученные колонии ИПСк до пересадки на свежий матрикс. Колонии представляют собой так называемые «пузыри». Их вручную переносят на свежую подложку.

Для дифференцировки ИПСк в кардиомиоциты был осуществлен подбор протокола для каждой линии. И линии, и соответствие протоколов описаны в результатах. За основной для модификаций протоколов направленной дифференцировки ИПСК в кардиомиоциты был взят опубликованный ранее протокол [19,17], который варьировался для достижения наибольшего выхода кардиомиоцитов в конце дифференцировки: менялись концентрации CHIR99021 и время инкубации с ним. Другой протокол, основанный на двухдневном инкубировании CHIR99021, и их различия описаны в результатах [23]. Для исследований с иммунофлуоресцентным окрашиванием и определений периодов развития сердечных клеток в процессе дифференцировки дифференцирующиеся клетки на разные дни от начала дифференцировки (от 6 до 80) дезагрегировали. Для сортировки кардиомиоцитов и их отделения, как чистой популяции клеток, выполнялась метаболическая селекция полученных дифференцированных клеток в течение 5-7 дней [24] в среде RPMI 1640 без глюкозы.

Неонатальные кардиомиоциты крысы

Первичные неонатальные клетки - это клетки, полученные в ранний период после рождения организма, когда органы еще формируются, например, у крысы этот период составляет не более пяти дней. Клетки выделяются из мягких тканей (сердечной мышцы) с помощью ферментов, разрушающих внеклеточный матрикс, например, трипсина. Подробно протокол выделения неонатальных кардиомиоцитов крысы описан в соответствующих статьях [15,16,27].

Иммортилизованная клеточная линия кардиомиоцитов HL-1

Клеточная культура HL-1 - иммортилизованная клеточная линия кардиомиоцитов, выведенная Вильямом Клейкомбом (William Claycomb) в 1998 году из клеточной культуры AT-1, представляющей собой предсердные кардиомиоциты из подкожной опухоли трансгенной мыши [35, 36]. Подробно ознакомится с ведением и культурированием линии HL-1 можно в соответствующих статьях [17, 35]. При подготовке образцов для сокультивирования использовались PDMS-маски, более подробно с видом и изготовлением которой, можно ознакомиться в статье [17].

Оптическое картирование

Эксперименты по оптическому картированию проводились на 3–5 день после посадки образцов. С помощью метода оптического картирования регистрировалось распространение волны возбуждения в масштабе всего образца. Для визуализации распространения волн возбуждения использовался кальций-зависимый флуоресцентный краситель Fluo-4 или потенциал-зависимый краситель FluoVolt.

Визуализация сигнала сопутствующего возбуждению клеток и запись видео производилась при помощи системы Olympus MVX-10 Macro-View и камеры с высоким пространственным и временным разрешением Andor EM-CCD Camera 897-U. Обработка пространственно-временных разверток описана в соответствующих статьях [7, 13-17].

Иммунофлюоресцентное окрашивание

Анализ проводился путем иммуноцитохимического окрашивания (immunostaining) образцов на различные белки: специфичный сократительному аппарату кардиомиоцитов белок - α -актинин, тяжелую цепь миозина, кардиальный торопин, цитоскелет (белок f-актин) и ДНК клеток (краситель DAPI), присущие любым типам клеток, и другие. Подробнее о иммунофлюоресцентном окрашивании можно узнать в соответствующих статьях отдельно для каждого раздела [7, 13-17]. Непосредственно для изучения покрашенных образцов использовался конфокальный флуоресцентный микроскоп Zeiss LSM 710 с набором лазеров для возбуждения флуоресценции.

Обработка данных и компьютерное моделирование.

В данной работе применялась модель Корхонена [34], модель Алиева –Панфилова [33] с модификациями согласно данным с пэтч-клампа, а также тока I_{K1} . Более подробно модификации описаны в результатах и соответствующих статьях [15, 16, 32]. Вычисления проводились при помощи графических процессоров (GPU) модели NVIDIA Tesla K20, либо при помощи Wolfram Mathematica 10. Обработка результатов проводилась в программе ImageJ, Zeiss, Wolfram Mathematica 10.

Глава 4. Основные результаты работы

Влияние внешних факторов на проведение волны возбуждения в культуре кардиомиоцитов

Влияние гиперкалиемии

Одним из внешних факторов, влияющих на проведение волны возбуждения или возбудимость ткани, является отклонение концентраций ионов во внешней среде от нормального, которое может быть спровоцировано тромбообразованием, ведущим к локальной ишемии. В процессе ишемии возникает несколько процессов, одним из которых является гиперкалиемия. Данная часть работы посвящена экспериментальному и компьютерному моделированию высокой степени гиперкалиемии на культуре неонатальных кардиомиоцитов крысы. Эксперименты по измерению зависимости скорости проведения волны возбуждения при повышающейся степени гиперкалиемии показали, что скорость с повышением концентрации калия сильно падает (рисунок 2А), но даже при высокой степени гиперкалиемии (концентрации калия в среде $[K^+]_{out}$ более 10 мМ) скорость проведения не падает до нуля, что показывает возможность проведения ПД. Таким образом, данное проведение предполагается возможным благодаря работе кальциевых потенциал-зависимых каналов. Убедиться в данном предположении позволил эксперимент, в котором в среду при разной степени гиперкалиемии добавлялись блокаторы потенциал-зависимых каналов (1 мМ TEA и 0,5 мкМ TTX) (рисунок 2В).

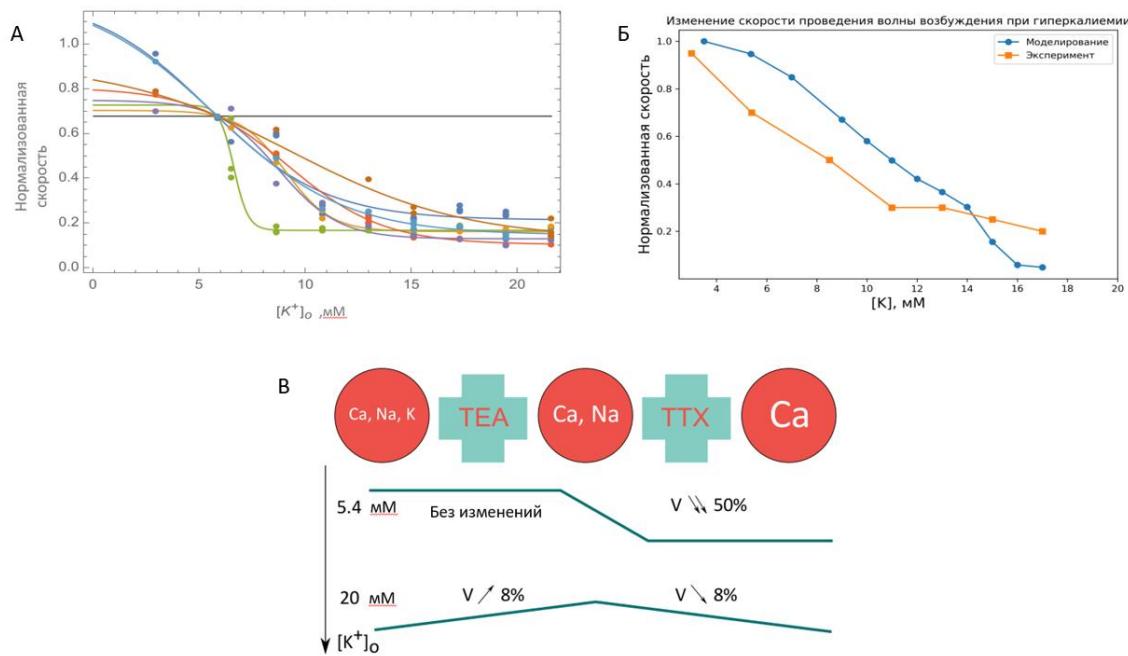


Рисунок 2 – Изменение скорости проведения волны возбуждения при разной степени гиперкалиемии и под влиянием блокаторов.

А) Зависимость нормализованной скорости проведения волны возбуждения от концентрации калия в среде (внеклеточной, $[K^+]_{out}$) для различных образцов, обозначенных различными цветами.

Б) Сравнение скоростей проведения волны возбуждения в эксперименте и моделировании для различных концентраций внеклеточного калия.

В) Зависимость скорости волны возбуждения от добавленных блокаторов потенциал-зависимых ионных каналов калия (K) и натрия (Na) при нормальных условиях (5,4 mM) и при сильной степени гиперкалиемии (20 mM). В верхней строке представлена схема добавления блокаторов. Ниже представлены процентные изменения скорости проведения волны после последовательного добавления TEA и TTX.

На основе полученных экспериментальных данных модель Корхонена была модифицирована для дальнейших изучений процессов ишемии и влияния концентраций ионов во внеклеточной среде. В данной модели были модифицированы константы для амплитуд токов INa , Ito , IKr , IKs , $ICaL$. Также был модифицирован ток $IK1$ и введен АТФ зависимый калиевый ток. Полученная модификация модели показала возможность

проведения волны возбуждения при высокой степени гиперкалиемии, которое было показано экспериментально, что не давали предыдущие модели (рисунок 2Б).

Моделирование влияния факторов, появляющихся при локальной ишемии

При локальной ишемии происходят 3 основных процесса: гипоксия, гиперкалиемия и ацидоз. После модификаций и моделирования процесса гиперкалиемии на полученной модели были смоделированы также процессы прогрессии ацидоза, заключавшемся в уменьшении доступности кальциевых каналов, отраженном на длине ПД (рисунок 3А), а также прогрессию гипоксии (рисунок 3Б). При гипоксии из-за недостатка кислорода все биохимические процессы в клетке замедляются, то есть АТФ перестает расходоваться, что повышает его концентрацию внутри клетки. Для описания процесса гипоксии в модель был введен АТФ-зависимый ток, исходя из публикаций [33]. Таким образом, с помощью полученной модели можно соединить все эффекты локальной ишемии и получить графики сравнения потенциалов действия для нормальной сердечной ткани и при прогрессирующей ишемии (Рисунок 3). Полученные результаты по влиянию локальной ишемии, в частности гиперкалиемии, а также данная модифицированная модель Корхонена для неонатальных кардиомиоцитов крысы опубликованы [16].

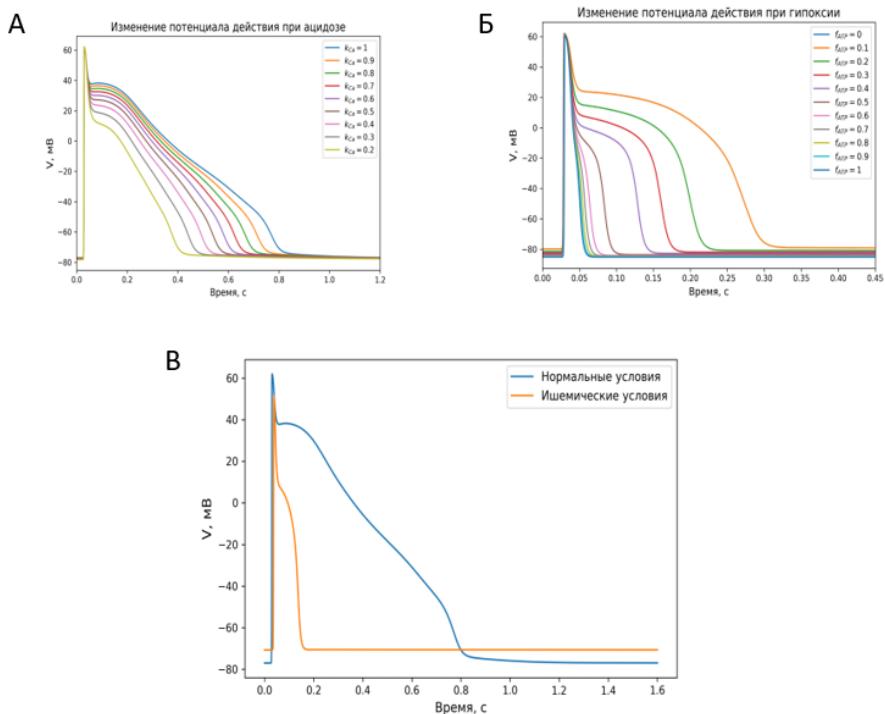


Рисунок 3 – Компьютерное моделирование локальной ишемии.

А) Длина потенциала действия в зависимости от доступности кальциевых каналов.

Б) Зависимость потенциала действия от различной степени гипоксии, отраженной с помощью процента активированных АТФ-зависимых калиевых каналов (f_{ATP}).

В) Сравнение потенциалов действия при нормальных и при условиях локальной ишемии.

Влияние градиента возбудимости на проведение волны возбуждения и поведение спиральных волн (реентри).

Возбудимость сердечной ткани зависит не только от ионного состава среды. Сердечная ткань может снабжаться кровью с различной эффективностью, что может приводить к градиентам ишемического состояния ткани, что в свою очередь приводит к различному проведению волны возбуждения. Для влияния на возбудимость было взято светочувствительное вещество – азоТАБ. Была исследована зависимость скорости проведения волны возбуждения в монослое кадиомиоцитов от интенсивности ультрафиолета в присутствии азоТАБ ($120\mu M$). Полученные результаты показали, что с большей вероятностью смещение спиральной волны наблюдалось в сторону меньшей возбудимости, то есть в сторону меньшей скорости распространения волны возбуждения: в 62% случаев (13 из 21 эксперимента). Смещение в сторону более возбудимой области наблюдалось с меньшей вероятностью в 29% случаев, отсутствие перемещения в 9% (2/21) (Рисунок 4).

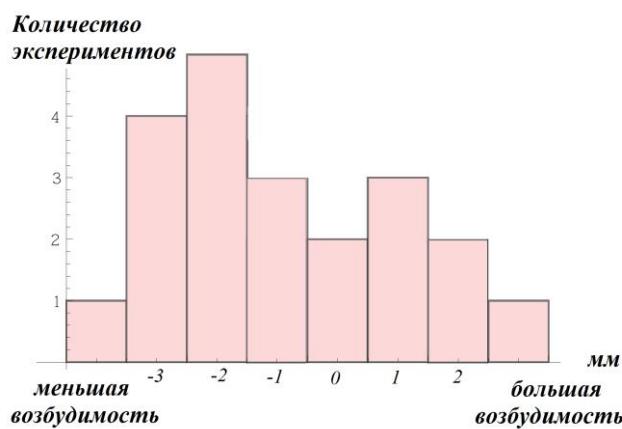


Рисунок 4 - Гистограмма смещения спиральной волны в градиенте возбудимости.

Роль функциональной границы в проведении волны возбуждения в различных культурах кардиомиоцитов

Роль границы, между областью, проводящей возбуждение и невозбудимой. Границные условия.

Дефекты сердечной ткани являются одной из причин появления пространственно-временных структур, нарушающих нормальное проведение волны возбуждения и сердечный ритм. Дефекты приводят к разным типам реентри, чаще всего посредством однонаправленного блока проведения, который будет рассмотрен в следующем разделе, или за счет отрыва фронта волны от границы дефекта [22]. Желудочковая тахикардия вызвана таким отрывом, когда дефект становится центром закрепления спиральной волны [29]. Такой эффект закрепления помогает реентри стабилизироваться, что затрудняет приведение сердечного ритма в норму при помощи протокола низковольтной дефибрилляции.

В моделях, присутствующих в литературе, для описания эффектов на границе проведения культуры принято ставить условия Неймана или бестоковые условия вопрос с токами на границе возбудимости среды не был изучен. Известно, что существуют токи, называемые демаркационными или травматическими токами (англ. demarcation current или injury current), направленные к травмированной, и уже не проводящей ткани [31]. То есть в случае же границы, имеющей ток утечки, например, с условиями Дирихле, около границы будет определенная электротоническая нагрузка, которая будет увеличивать порог возбуждения и, как следствие, снижать скорость проведения волны возбуждения около границы. Для изучения поведения фронта у разного типа границ была использована полоска ткани различной ширины, которая варьировалась с помощью полимера PDMS. PDMS также моделировал границу нетравматического дефекта (рисунок 5А). Граница травматического дефекта формировалась при помощи микроманипуляторной иглы. Таким образом, экспериментально наблюдается фронт волны возбуждения на 2 типах границ (рисунок 5Б), что продемонстрировало отставание линии фронта волны вдоль травматической границы.

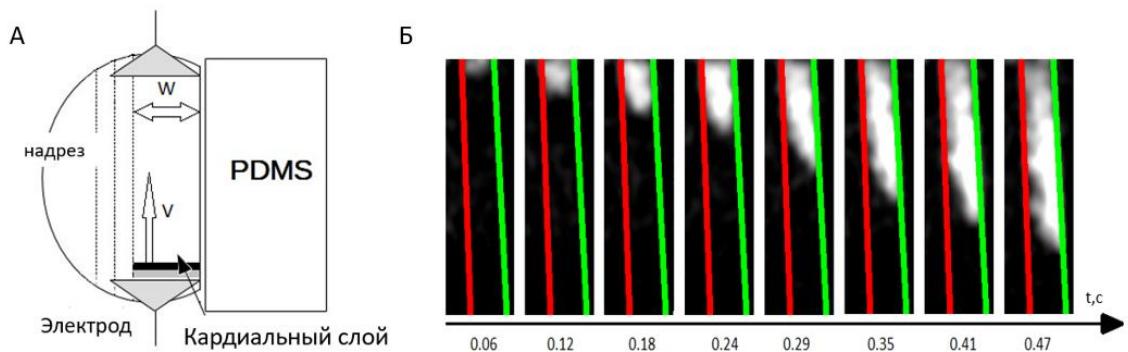


Рисунок 5 – Эксперименты по проведению волны возбуждения вдоль дефективной и естественной границ

А) Принципиальная экспериментальная схема. Монослой кардиомиоцитов высаживается так, что правая граница при росте формируется вдоль блока PDMS, левая граница формируется при помощи иглы на микроманипуляторе. С помощью данной схемы варьируется ширина полоски (w). Искусственные стимулы прилагаются при помощи плоских электродов. Импульсы направлены вдоль смоделированных границ (v).

Б) Проведение возбуждения вдоль 2 типов границ, полученное с помощью оптического картирования. Фронт волны представлен в различные промежутки времени после запуска импульса. Зеленым обозначена граница вдоль PDMS, красным травматическая граница.

На основе проведенных экспериментов по варьированию ширины проводимого образца (рисунок 6А) стало понятным, что условия Неймана неприменимы к моделированию дефективных границ. Результаты компьютерного моделирования показаны на рисунке 6Б: граничные условия без утечки (Неймана) (красный, 1), граничные условия с утечкой (Дирихле) с фиксированным потенциалом -72 мВ (фиолетовый, 4) и -20 мВ (синий, 3), граничные условия с пассивной нагрузкой с общим размером 32 мм (если размер бассейна больше 5 мм, то нет разницы в профиле ширины скорости) (зеленый, 2).

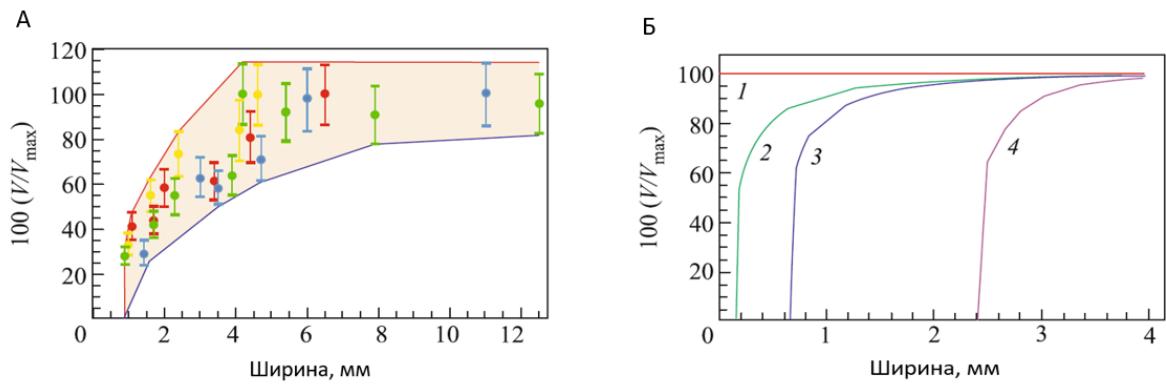


Рисунок 6 – Сравнение граничных условий при компьютерном и экспериментальном моделированиях

А) Зависимость нормированной скорости от ширины для 4 образцов, обозначенных разными цветами, полученная экспериментально.

Б) Смоделированная зависимость скорости проведения волны возбуждения от ширины образцов с различными граничными условиями.

Из моделирования был получен важный результат, что применение граничных условий Неймана не всегда является корректным, а учёт токов утечки необходим в случае наличия травматических дефектов, таких как: ишемические зоны, инфарктные рубцы или фибробласти имеющие щелевые контакты (англ. gap junctions) с кардиомиоцитами. Результаты данного раздела подробнее опубликованы в работе [15].

Роль границы в культуре с различной проводимостью. Модель одностороннего блока проведения.

Одним из условий для появления спиральной волны является наличие одностороннего блока проведения, то есть участка, проводимость которого различна для двух направлений. В случае гомогенной культуры волна возбуждения распространяется симметрично. В случае неоднородности сердечной ткани распространение возбуждения приобретает асимметричный характер, что является причиной отрыва волны и формирования нового направления распространения возбуждения, то есть формирование реентри. Моделирование границ возбудимости было осуществлено в данной работе с помощью методов сокультурирования.

Для отработки методов сокультурирования были взяты крысицы с разницей в один, два и три дня. Культура, состоящая из более молодых клеток, высаживалась первой (1). На

следующий день к ним подсаживалась культура кардиомиоцитов (2), выделенных из крысят на более поздний день их жизни, которая предварительно маркировалась с помощью специального красителя, флуоресцирующего в красном диапазоне. Впоследствии можно было определить, где находятся клетки культуры (2) относительно клеток культуры (1) при сокультивировании, что показано на рисунке 20А. В процессе сокультивирования клетки не выходили из зоны их посадки, и в течение нескольких дней культуры образовывали механо-электрический функциональный синцитий (Рисунок 20 Б, В и Г). Проведение возбуждения наблюдалось через границу между культурами в противоположный конец сокультуры кардиомиоцитов (Рисунок 20 Г).

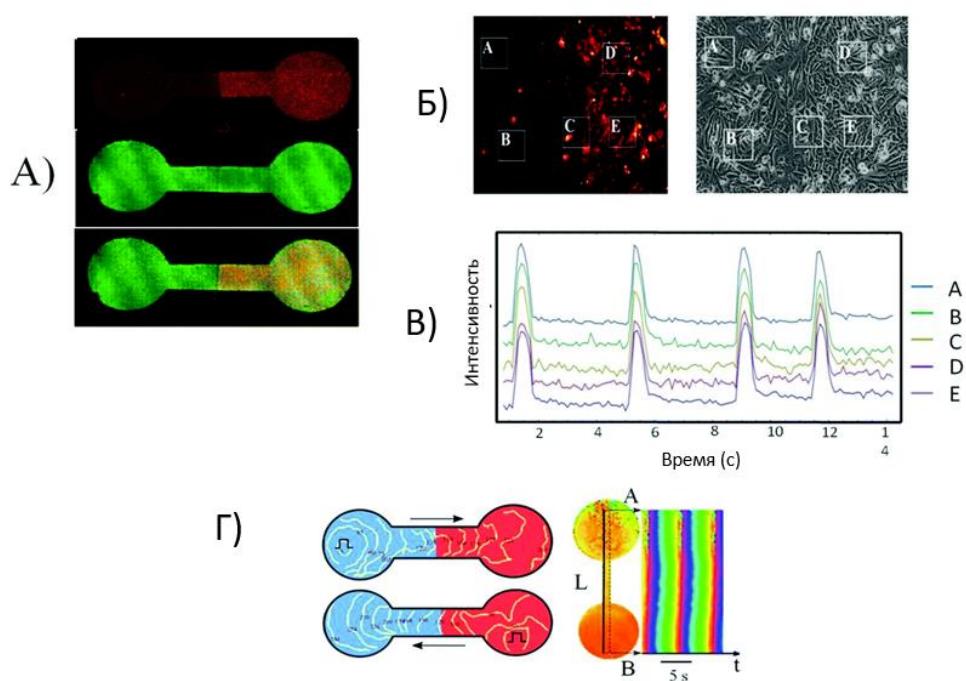


Рисунок 7 – Сокультивирование разновозрастных кардиомиоцитов. А) Иммуностэнинг клеточных культур (1) и (2). Справа находятся клетки культуры (2). Б), В) Временной контроль сокращений в различных областях вблизи границы разделения двух культур. Пики интенсивности указывают на сокращения кардиомиоцитов в указанной области сокультуры. Г) Электрическая проводимость со-культуры, в которой справа находится покрашенная культура кардиомиоцитов. Сигнал подавался с частотой 0,5 Гц и амплитудой 7 В. Белыми линиями обозначен фронт волн, распространяющиеся в направлениях, указанных черными стрелками. Цифры у белых линий показывают время (мс) активации, отсчитывая от момента стимуляции. Прямоугольным импульсом отмечено место, в котором был установлен точечный

электрод. Также справа представлена пространственно-временная развертка видеоряда в фазовом пространстве.

Отработанная методика сокультурирования была применена к иммортализованной культуре предсердных кардиомиоцитов мыши HL-1 и неонатальным желудочковым кардиомиоцитам крысы. Аналогично разновозрастной сокультуре на 2-3 день совместного культивирования сокультура окончательно формировала граничный межклеточный контакт, то есть синцитий. Данные культуры обладают существенными функциональными различиями, обусловленными их видами. Различия наглядно отражаются в возбудимости и проведении волны возбуждения по отдельным культурам: скорости распространения волнового фронта в культуре HL-1 на порядок меньше, а порог возбудимости выше (рисунок 8Б). Так скорость распространения в культуре HL-1 составляет всего 4,6 мм/с, а для культуры неонатальных кардиомиоцитов 7,5 мм/с.

Далее представленная сокультура была модифицирована: аналогично использовались неонатальные кардиомиоциты крысы, но совместно с культурой HL-1 с трансфектированным канальным родопсином ChR2, что сделало одну из частей сокультуры светочувствительной. Таким образом, при помощи светового диода (480 нм) культура неинвазивно возбуждалась серией световых импульсов (длина импульса 20 мс). Благодаря сформированному контакту между частями сокультуры, волна возбуждения проходила через границу, возбуждая первичную культуру неонатальных куардиомиоцитов крысы (рисунок 8А). При повышении частоты стимуляции сокультуры электрическими импульсами наблюдался односторонний блок проведения волн возбуждения в направлении от первичной культуры к культуре HL-1. В диапазоне частот 0.7-1.0 Гц наблюдалась блокировка каждой второй волны возбуждения (Рисунок 8В). В диапазоне частот 1,6–2,6 Гц иногда происходила блокировка проведения волн при распространении от HL-1 к первичной культуре. В результате проделанной работы была создана экспериментальная техника сокультурирования по заданному двумерному трафарету для проверки способности двух различных типов возбудимых клеточных культур формировать единую функциональную систему. На основе сокультур был продемонстрирован и исследован неинвазивный способ стимуляции сердечной ткани. Результаты данного раздела опубликованы [17].

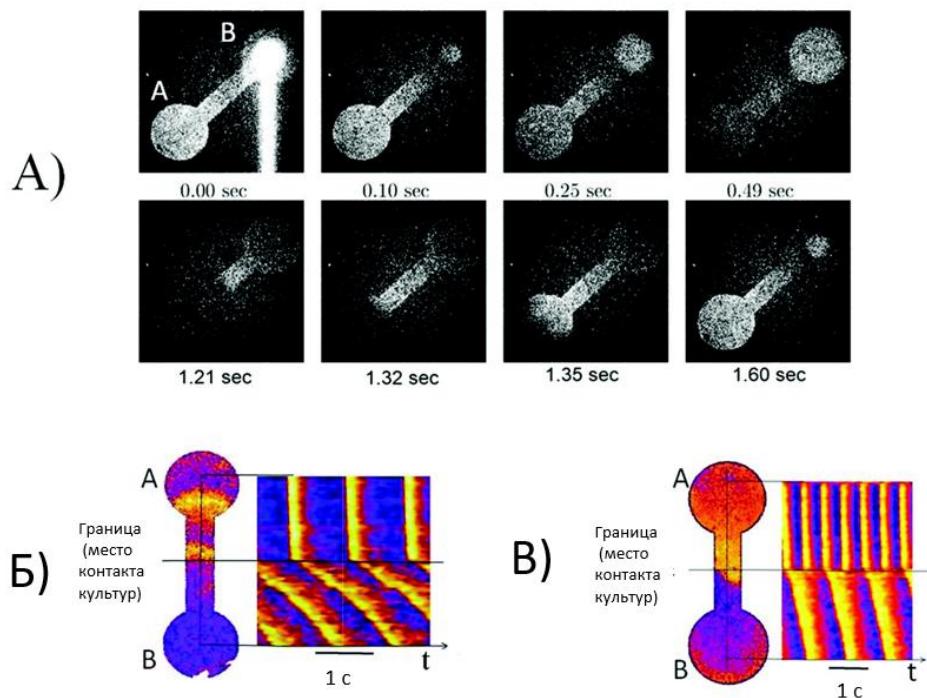


Рисунок 8 - Проведение возбуждения по сокультуре неонатальных кардиомиоцитов крысы (А) и культурой клеток HL-1 (В). А) Стимуляция со-культуры неонатальных кардиомиоцитов крысы и светочувствительных кардиомиоцитов линии HL-1 серией световых импульсов Б) Пространственно-временная развертка распространения волны возбуждения в сокультуре клеток NRVCM и клеток HL-1. Электростимуляция применялась со стороны неонатальных кардиомиоцитов крысы (А) с амплитудой импульса 5 В и частотой 2 Гц. В) Пример блока проводимости в сокультуре: блок проведения второй волны возбуждения

Роль функционального препятствия в проведении волны возбуждения в культуре человеческих кардиомиоцитов.

Процесс дифференцировки. Формирование функционального синцития в процессе дифференцировки.

Всего в ходе репрограммирования было получено 27 линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСк), полученных от пациентов с мутацией T613M в гене KCNH2, указывающей на синдром удлиненного интервала QT у пациента, 4 из которых (if31-5, if31-8, if31-13, if31-36) были отобраны для дальнейшего культивирования и характеристики. Аналогично из клеток донора без мутаций, оказывающих влияние на сердце, были получены ИПСК: isma6Li m34sk3. Более подробно характеристика

получаемых линий ИПСк и дифференцировке кардиомиоцитов из них описана в соответствующих публикациях [7,13,14].

В ходе работы был обнаружен эффект самоорганизации индуцированных сердечных клеток на нескольких этапах клеточного формирования. Начиная с девятого дня проводящие клетки организовывались в кластеры. С 12-го дня в монослое начинал экспрессироваться коннексин 43, и эксперименты по оптическому картированию показывали проведение волны возбуждения. При формировании кластеров (начиная с девятого дня) клетки самоорганизовались так, чтобы проводящие клетки (около 80%, красный- альфа-актинин) находились поверх многослойной структуры (Рисунок 9). Клетки вели себя похожим образом при дезагрегации до 27 дня. Процесс самоорганизации клеток завершался примерно через 30 дней после начала дифференциации.

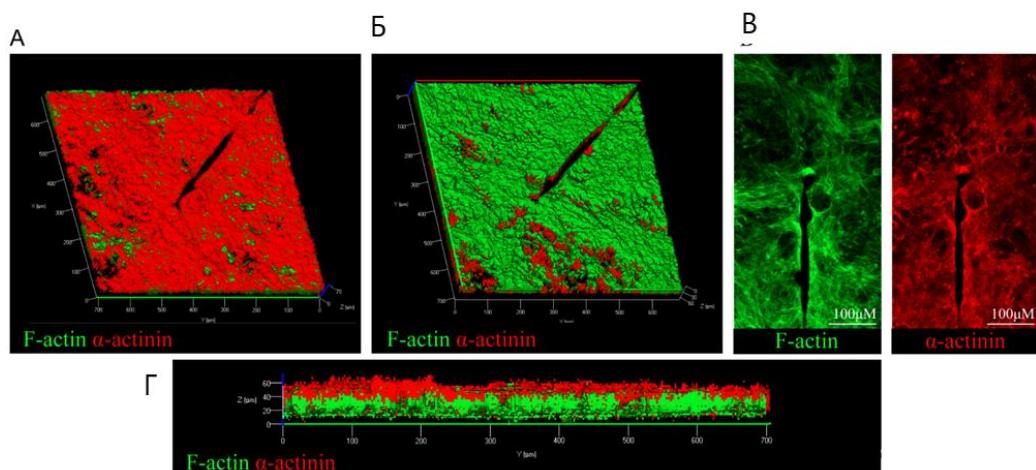


Рисунок 9 - Самоорганизованный монослой кардиомиоцитов (линия iSMA6L). Красным обозначены клетки экспрессирующие альфа-актинин (специфичный маркер кардиомиоцитов), зеленым – f-актин а) вид на образец в окрестности стандартного препятствия под углом сверху; б) вид снизу той же культуры снизу; в) боковая проекция; г) конец стандартного препятствия на снимке конфокальной микроскопии образца

Начиная с 30 дня, скорость проведения и максимальная усваиваемая частота клеточного слоя медленно возрастали и приближались к постоянным значениям. На 54 день достигалась максимальная зарегистрированная скорость распространения волны для сердечного слоя – 0,3 м/с, которая в дальнейшем оставалась стабильной в своем значении (Рисунок 10А). После дня 56 распространение возбуждения поддерживало стабильную скорость от 0,2 до 0,3 м/с, а критическая частоты была более 2 Гц. Таким образом,

функциональный синцитий сердечной культуры из дифференцированных в кардиомиоциты клеток формируется лишь к 50-56 дню в зависимости от линии.

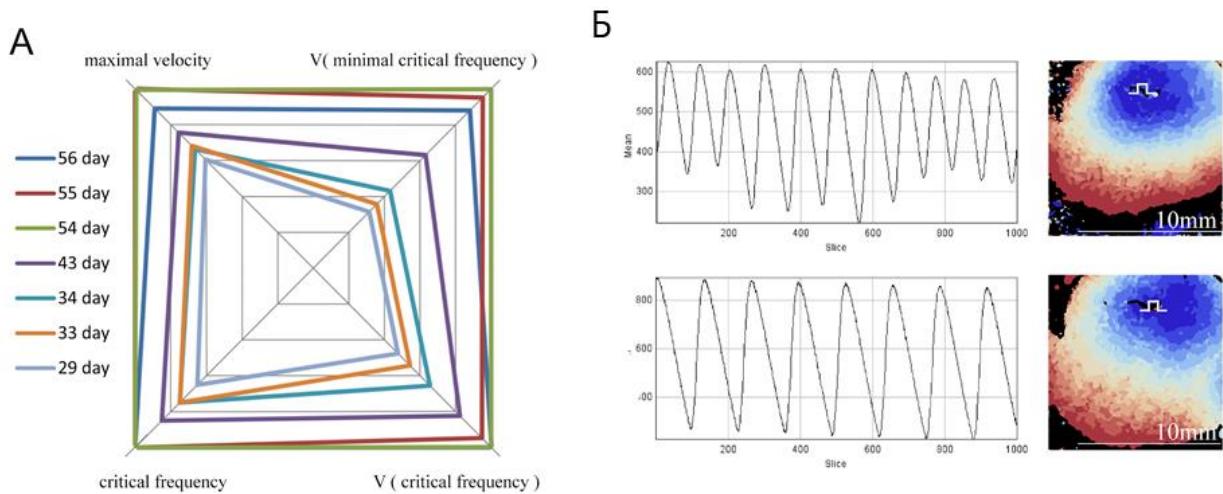


Рисунок 10 - Характеризация созревания функционального кардиального синцития:
 а) лепестковая диаграмма скорости распространения волны в зависимости от дня дифференцировки; б) фазовые карты распространения волны возбуждения. Прохождение волны возбуждения показано градиентом от синего к красному. Место стимуляции обозначено ступенькой импульса. Также представлена развертка возбуждения образца от времени (от 0 до 8 с)

Вследствие процессов самоорганизации ткани (Рисунок 10), кардиомиоциты в экспериментальной тканево-инженерной модели образуют практически однородный и изоторпный проводящий синцитий на поверхности образца, что приводит к отсутствию значимых случайных неоднородностей даже при невысоком выходе направленной дифференцировки в кардиомиоциты. Были проведены эксперименты по дезагрегации синцития на различные дни направленной дифференцировки (линия от донора без врожденных сердечно сосудистых заболеваний m34sk3). Образование нового проводящего синцития с восстановлением клеточных контактов происходило постепенно и занимало порядка 7 дней. Если образец был рассажен до 15-го или 20-го дня в зависимости от культуры, его полное функциональное созревание происходило аналогично нерассаженным образцам и занимало порядка 50 дней. Пересадка от 15 до 20 дня (в зависимости от линии) позволяет получить однородный монослой, пригодный для исследования образования аритмий на стандартном препятствии (Рисунок 11), в то время как при более поздней рассадке после 20-го дня однородный монослой из дезагрегированных клеток уже не образуется.

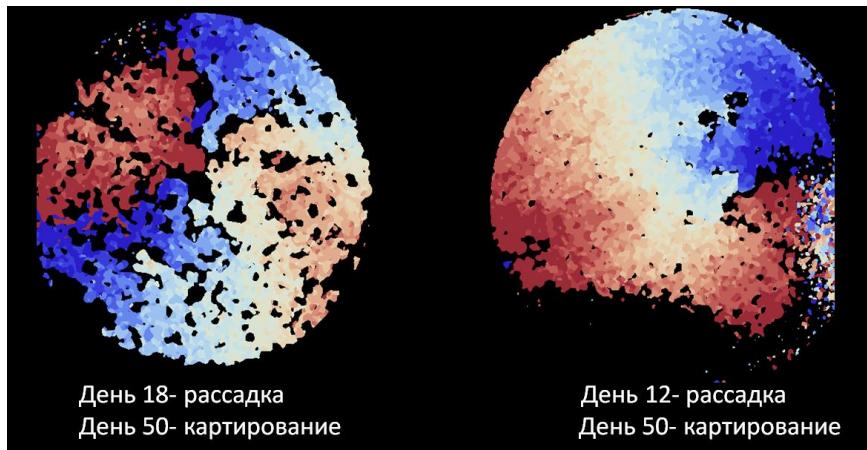


Рисунок 11- Оптическое картирование образцов, рассаженных на различные дни дифференцировки. Отражено проведение волны возбуждения (градиент от синего к красному).

Способность кардиомиоцитов к самоорганизации в проводящий синцитий сохраняется вплоть до 25 дня дифференцировки (Рисунок 12). Данный факт использовался как тканево-инженерное решение в процессе создания однородных изотропных монослоев для исследовательской модели.

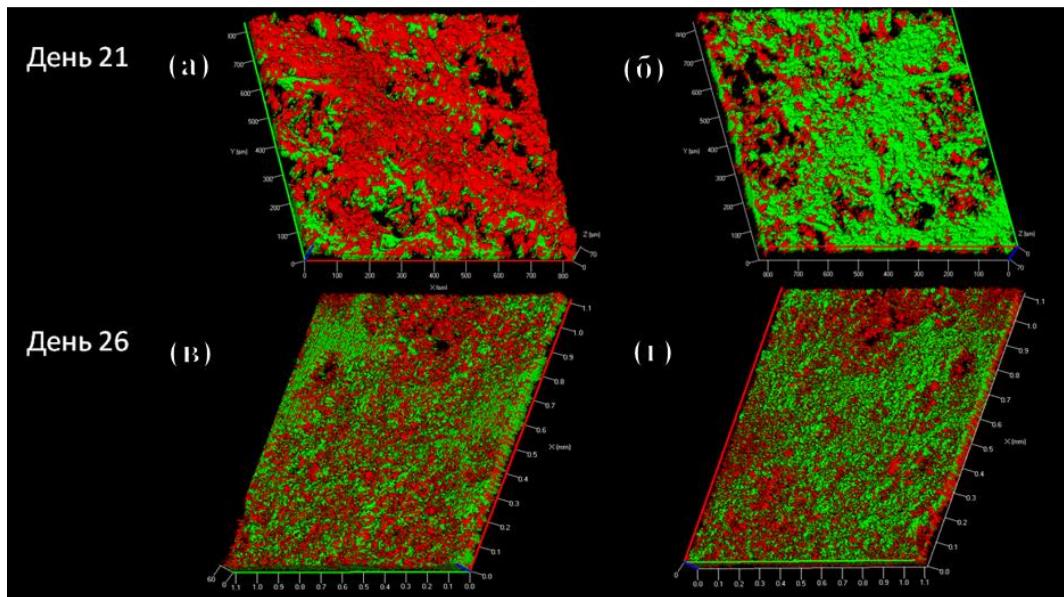


Рисунок 12 - Слои кардиомиоцитов, пересаженных на различные дни: а) и б) слои дифференцированных клеток, рассаженных на 21 день после начала дифференцировки (а – верхняя часть образца; б – нижняя). Показана самоорганизация кардиомиоцитов в верхний слой культуры после 21-го дня дезагрегации; в) и г) слои клеточной культуры, рассаженной на 26-ой день. Самоорганизации в верхний монослой нет. Зеленый цвет - ф-актин, красный – α -актинин (маркер кардиомиоцитов)

Сравнительный анализ проведения волны возбуждения в культуре человеческих кардиомиоцитов на разных этапах дифференцировки, полученных от пациента с синдромом удлиненного интервала QT, тип 2 (LQT2), и пациента без мутаций. Влияние анизотропии.

В предыдущих разделах было показано проведение волн возбуждения на однородных изотропных образцах, дифференцированных от линий без патологий, при стимуляции точечным электродом и без нее. Распространение волн возбуждения по дифференцированной сердечной культуре для линий iSMA6L приведен на рисунке 13, где показано проведение при небольших частотах спонтанного возбуждения. Волна распространяется от места стимула изотропно и без разрывов, происходит последовательное возбуждение и релаксация монослоя. Частота спонтанной активности составляет порядка 40 уд/мин, что соответствует низким частотам сердечного сокращения у здорового человека в покое. Не обнаружено нарушений в проведении волны возбуждения даже при частоте от 3 до 5 Гц.

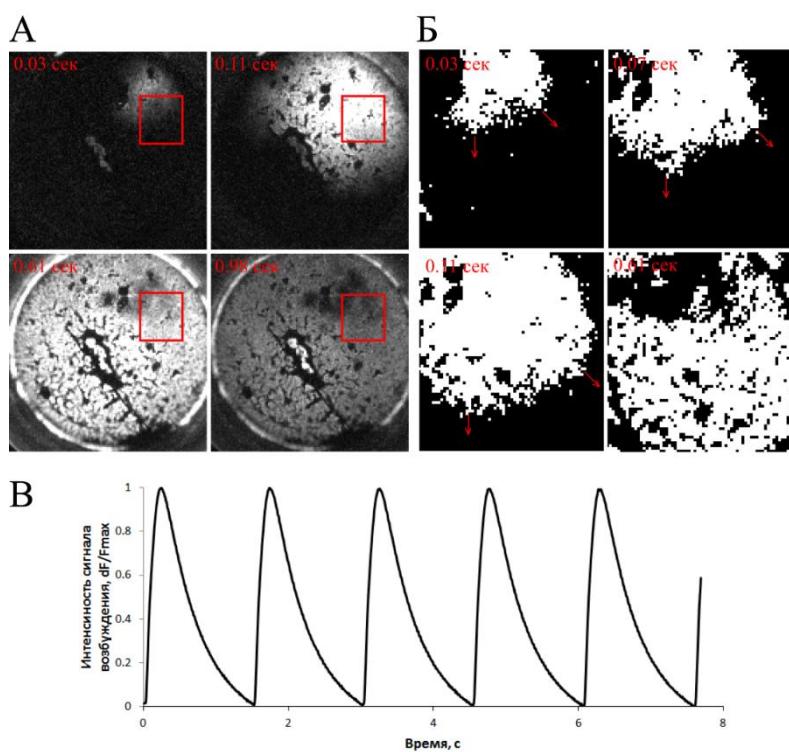


Рисунок 13 – Волна возбуждения в монослое человеческих кардиомиоцитов линии iSMA6L; а) распространение спонтанного возбуждения по монослою кардиомиоцитов, диаметр образца – 15 мм. В левой верхней части - время. В прямоугольнике - область, на которой фиксировалась зависимость сигнала от времени; б) последовательное

возбуждение клеток и их релаксация в выбранной области. Красными стрелочками показано направление передачи возбуждения соседним клеткам; в) графическая развертка интенсивности сигнала возбуждения кардиомиоцитов линии iSMA6L с выбранного фрагмента ткани по времени. Пики интенсивности соответствуют максимальному возбуждению выбранного фрагмента

В случае дифференцировки в кардиомиоциты линии if31-5 (и других линий с маркировкой «if»), имеющей врожденную мутацию, вызывающую синдром LQT2, усваиваемые культурой частоты стимуляции существенно отличаются от монослоя линии iSMA6L. Спонтанная активность и собственная спонтанная частота у полученных сердечных клеток от этой линии гораздо ниже, так как клеткам требуется гораздо больше времени для релаксации или реполяризации, чем клеткам от линии iSMA6L. Повышение частоты стимуляции таких образцов ведет к тому, что следующий возбуждающий импульс достигает клетки до того, как она полностью реполяризуется, нарушая правильную проводимость возбуждения. Такого рода нереполяризованные клетки создают случайные неоднородности, которые приводят к циркуляции волн возбуждения вокруг них- реентри. Если частота циркуляции волн превышает частоту собственно частоты возбуждения, то происходит подавление последней (Рисунок 14). Исследование и сравнение линий привело к созданию тканево-инженерной модели для исследования механизма образования реентри и для регистрации безопасного диапазона частот для линий с различными врожденными патологиями или при воздействии различных факторов.

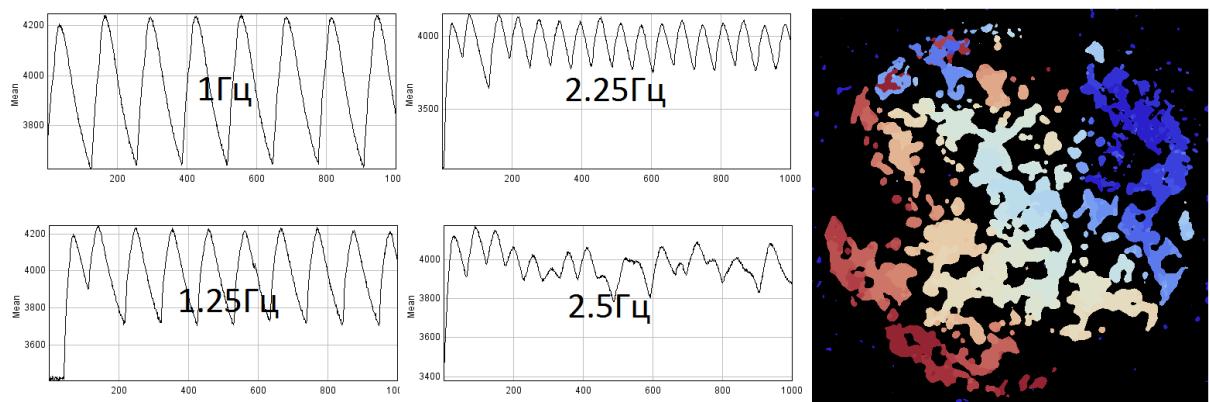


Рисунок 14 – Активационная карта распространения волны возбуждения по образцу с врожденным LQT2. На графиках указана динамика флуоресценции кальций-зависимого красителя при указанной частоте электродной стимуляции. Длительность записи кальциевой на всех представленных графиках 8 с. Прохождение волны возбуждения показано градиентом от синего к красному

Для создания экспериментальной модели влияния внешних факторов на сердечную ткань и подбора лекарственных средств были изучены модели анизотропных и изотропных образцов, смоделированных с помощью нановолокон для поиска оптимальной подложки в процессе дифференцировки ИПСК в кардиомиоциты. Было определено 3 типа подложек: 1) представляющие собой направленно ориентированные или выровненные волокна; 2) хаотически расположенные волокна; 3) стекло; 4) адгезивный пластик. Было проведено оптическое картирование образцов на разных подложках после 50ого дня от начала дифференцировки. Сравнив активационные карты, было обнаружено, что самый однородный монослой из дифференцированных в кардиомиоциты клеток формируется на пластике (рисунок 15). Выше мы рассматривали только 4 вид подложки, на котором и было продемонстрировано наиболее однородное формирование сердечного монослоя. А скорости после 50-го дня соответствовали скоростям, полученным на срезах человеческого сердца. Представленные эксперименты были проделаны для линии *isma6L*. Результаты данного раздела частично опубликованы [13].

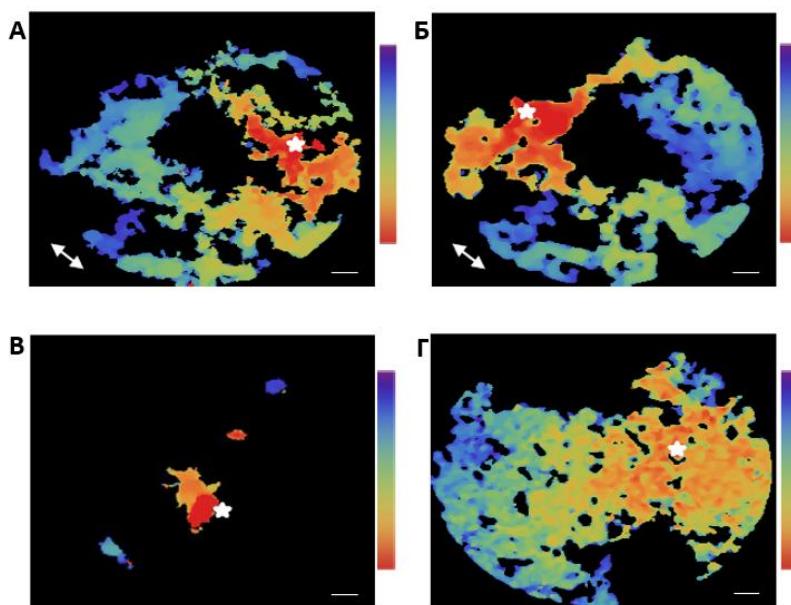


Рисунок 15 – Активационные карты оптического картирования дифференцированного из ипск монослоя кардиомиоцитов на различных подложках; а) и б) активационные карты образцов на анизотропных подложках; в) на изотропной подложке; г) на стекле, покрытой матриксом *geltrex*. звездочкой обозначены места стимуляции образцов точечным электродом. стрелочками указано направление волокон в случае их направленности.

Функциональное препятствие как средство для сравнительного исследования культур человеческих кардиомиоцитов с различными патологиями. Тест на аритмогенность.

В подавляющем большинстве современных экспериментальных моделей, позволяющих изучать и анализировать случаи возникновения реентри на ткани из желудочковых кардиомиоцитов, разрывы волн могут возникать на случайных неоднородностях, хаотически расположенных по всему образцу. Такой случайный разброс неоднородностей был изучен в предыдущем разделе, на примере клеток, полученных от линий с врожденным синдромом удлиненного интервала QT. Абсолютная хаотичность разрывов волн не дает возможности анализировать данные о случаях нарушения проведения в образце, необходимые для определения механизма возникновения реентри, так как данные в подобных экспериментах являются случайными и бессистемными, а сам эксперимент невоспроизводимым.

Для решения этой проблемы была создана экспериментальная тканево-инженерная модель со стандартной неоднородностью, представляющей собой острый разрез на ткани со стандартной толщиной порядка 30 мкм (Рисунок 9). Данные из модели основываются на едином системном параметре, на мере аритмогенности. Мера аритмогенности, введенная для нашего теста, представляет собой вероятностное выражение (количество случаев) любого нарушения проведения на данном стандартном препятствии для различных частот на культуре клеток, полученных от различных пациентов. Одно такое значение высчитывается для каждой частоты стимуляции на нескольких образцах от одного пациента. Удобно представлять меры аритмогенности в виде столбиковой диаграммы, в которой для разных частот электродной стимуляции фиксируется 3 случая проведения волны возбуждения на модели: 1) случаи нормального проведения (без разрывов волн) (рисунок 16А); 2) собственно меры аритмогенности, как случаи возникновения реентри в окрестности стандартного препятствия (рисунок 16Б); 3) случаи неусвоения электрического стимула тканью (ткань не отвечает на подаваемые импульсы с частотой их подачи) (рисунок 16В). На рисунке 16 показаны фазовые карты части описанных режимов проведения на ткани и пограничных случаев между ними на модели с полностью заблокированным IKr (моделирование LQT2 с помощью блокатора E4031).

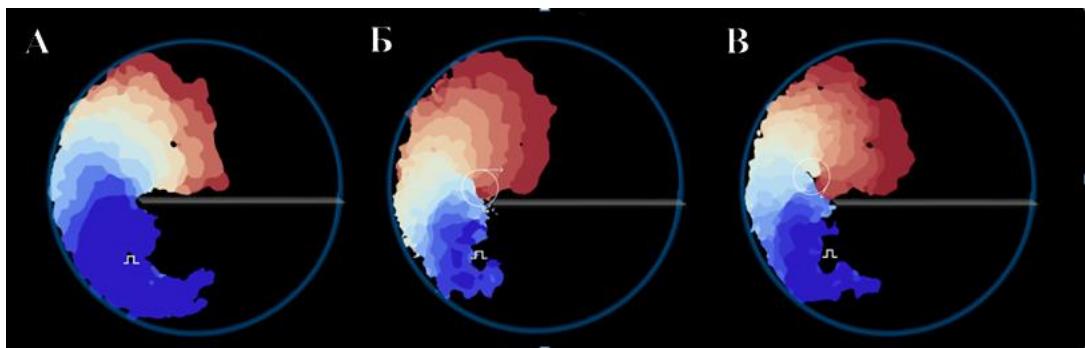


Рисунок 16 – Фазовые карты распространения волны возбуждения по образцу с вызванным LQT2. Место стимуляции указано белой ступенькой: а) нормальное проведение; б) незначительный отрыв волны возбуждения от препятствия; в) образование реентри на препятствии. Прохождение волны возбуждения показано градиентом от синего к красному. Ступень импульса обозначает место точечной стимуляции образца

На рисунке 17 в виде столбиковой диаграммы приведены меры аритмогенности для контрольного образца (линия iSMA6L, рисунок 17а), и для культуры человеческих кардиомиоцитов с индуцированным LQT2, который был вызван путем добавления 1600 нМ специфического блокатора IKr – E4031 (рисунок 17б). Столбцы представляют собой меры аритмогенности: синими столбцами обозначены случаи возникновения реентри, серым – неусвоение ритма, на столбиках дробью отображена доля таких случаев во всех проведенных экспериментах. Мера аритмогенности и стандартное препятствие были впервые введены нами впервые, и являются основой данной исследовательской тканево-инженерной модели.

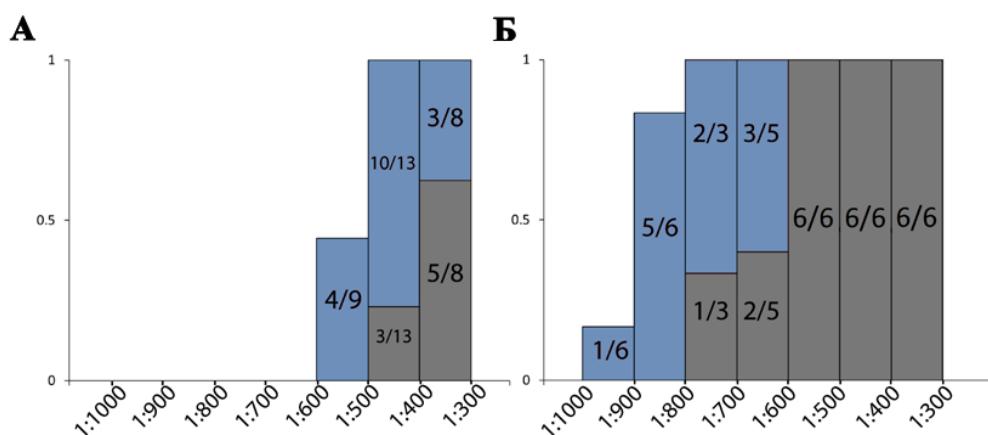


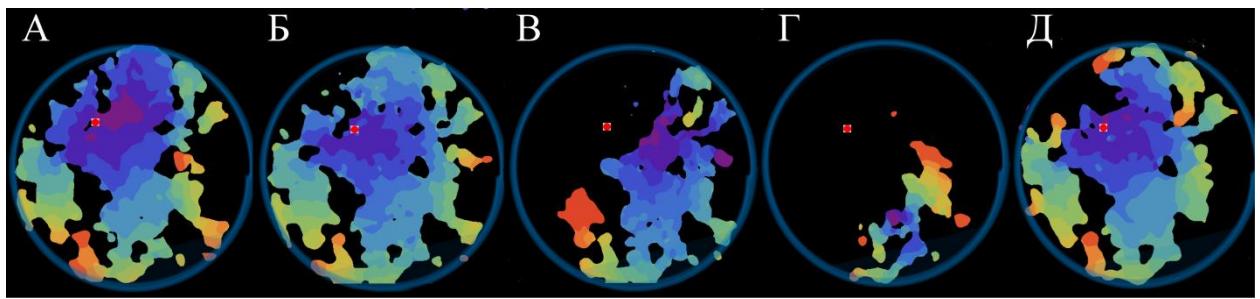
Рисунок 17 – Мера аритмогенности для линии iSMA6L. Соответствующие частоты стимуляции указаны по горизонтальной оси в единицах импульс/м: а) контрольный случай (без добавления блокаторов); б) индуцированный LQT2 (1600 нМ E4031)

Для исследований и в перспективе подобной терапии наиболее важна возможность определения критической частоты возникновения реентри – минимальная частота электродной стимуляции, при которой возможны разрывы волн на стандартном препятствии. Данные диаграммы позволяют количественно и качественно оценить различие риска возникновения реентри при увеличении частоты стимуляции, что говорит о ключевой роли неоднородностей в образовании реентри у пациентов с LQT2. Так, частоты от 1 Гц до 1,7 Гц являются безопасными для контрольной ткани. Результаты данного раздела опубликованы в статье [7].

Полученная на базе этих экспериментальных исследований тканево-инженерная модель со стандартизованными параметрами и неоднородностью подходит для исследования базовых механизмов возникновения реентри, и значит для сравнительного анализа аритмогенного действия различных препаратов, также, как и для сравнения вероятности образования реентри в слоях здоровых клеток и сердечных клеток с каналопатией. С помощью данного теста были протестированы такие вещества как: ботулотоксин, эритромицин, эндоксан и другие. Исследование будет рассмотрено на примере ботулотоксина.

Согласно рисунку 18, возбудимость полученной культуры ткани под действием ботулотоксина типа А падает, однако, некоторое время скорость проведения волны возбуждения остается примерно одинаковой для разных концентраций. Касательно критических частот, как и в контроле, при добавлении 0,001 и 0,01 ед. ботокса культура ткани усваивала все частоты от 1 до 3,33 Гц. При добавлении 0,1 разведения вещества культура переставала усваивать частоту 3,33 Гц, но усваивала частоты от 1 до 2,86 Гц. При задаваемой частоте 3,33 Гц культура проводила с частотой 1,67 Гц, реентри при этом не возникало, что говорит об антиаритмических свойствах данного препарата.

После добавления ботулотоксина постепенно падала скорость и постепенно терялась проводимость зон на культуре ткани человеческих кардиомиоцитов. Из рисунков 18 А и Б (контроль и с добавлением 0,01 ед.) видно уменьшение скорости проведения волны возбуждения, так как расстояние между фронтами волн уменьшилось. На рисунке 47 В уже заметно уменьшилась площадь проведения волны возбуждения. Также видно, что культура ткани почти восстанавливала свою проводимость через несколько суток. Более подробные данные приведены в основном тексте диссертации.



Риунок 18 – Активационные карта проведения волны возбуждения в контроле, при добавлении ботулотоксина и после отмывок: а) активационная карта контроля; б) активационная карта при добавлении 0,01 ед. ботулотоксина; в) активационная карта при добавлении 0,1 ед. ботулотоксина; г) активационная карта после 20 минут отмывки; д) активационная карта через сутки после начала отмывки. Все карты - с шагом в 4 кадра (2 мс). Распространение волны возбуждения: от фиолетового к красному. Красная точка - место стимула (8 мВ)

Полученных экспериментальных данных по исследованию различных типов веществ и их аритмогенности на базе представленной тканево-инженерной модели в будущем хватает для описания эффекта действия и проверки механизма, а также для подбора лекарственных средств и создания базы данных индивидуальных особенностей.

Обсуждение

Представленная работа состоит из трех основных частей, заключающихся в исследовании: влияния внешних факторов на сердечную ткань, роли неоднородностей в сердечной ткани, врожденных или приобретенных патологий. На основе полученных данных была осуществлена основная цель работы по созданию тканевоинженерной исследовательской модели сердечных заболеваний человека. Обобщенно, можно сказать, что работа включала в себя исследование главных факторов развития сердечных аритмий на разрабатываемых в процессе работы компьютерных и экспериментальных моделях.

Аритмией сердца называется любое отклонение частоты сердцебиения от нормального синусового ритма. Основной причиной возникновения аритмий в сердечной мышце является появление одностороннего блока с последующим образованием спиральной волны или реентри, которая представляет собой волну, вращающуюся по кругу с частотой, не зависящей от главного водителя ритма. Данная работа рассматривает

одну за другой причины возникновения реентри для последующего моделирования данных процессов. Особый акцент в работе сделан на неоднородностях и их роли в возникновении реентри. Решающая роль неоднородностей отмечена после моделирования так называемых свободных реентри и регулирования возбудимости в получаемых моделях.

В исследованиях было обнаружено, что наиболее вероятным механизмом возникновения реентри в сердечной ткани является взаимодействие распространяющихся волн возбуждения с неоднородностью, при превышении критической частоты следования волн. Было известно, что резкое увеличение частоты сокращений сердца может приводить к эпизодам тахиаритмии, нередко переходящим в фибрилляцию. Высказывались гипотезы, что образование реентри в такой системе может происходить из-за неоднородностей рефрактерности сердечной ткани или из-за стимуляции в так называемое "уязвимое окно" [21]. Моделирование процесса смены ритма на слоях культивированных кардиомиоцитах показало несостоятельность гипотезы "уязвимого окна", т.к. без внешней стимуляции этого эффекта достичь не удается. Была подтверждена роль неоднородностей в образовании реентри и переходе к хаотическому режиму распространения возбуждения. Таким образом, для сравнительного анализа аритмогенного действия различных препаратов, также, как и сравнения вероятности образования реентри в слоях здоровых клеток и сердечных клеток с каналопатией, было предложено использовать взаимодействие волн возбуждения со стандартизированной неоднородностью. Данная в последнем разделе итоговая модель и была предложена, как тканевоинженерное решение для исследования аритмий. Модель представляет собой слой кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК и самоорганизующихся в подобие сердечной ткани (сердечный синцитий), со стандартизованными параметрами.

В подавляющем большинстве современных экспериментальных моделей, позволяющих изучать и анализировать случаи возникновения реентри на ткани из желудочковых кардиомиоцитов, разрывы волн могут возникать на случайных неоднородностях, хаотически расположенных по всему образцу. Это усложняет интерпретацию данных о случаях нарушения проведения в образце, необходимую для четкого определения механизма разрыва волн в случае с удлиненным QT интервалом. Для решения этой проблемы, созданная экспериментальная тканево-инженерная модель была дополнена стандартной неоднородностью, представляющей собой острый разрез на ткани со стандартной толщиной порядка 30 мкм. Важная роль стандартной неоднородности заключается в том, что именно в ее окрестности фиксировались и учитывались случаи

возникновения реентри как у здоровой ткани, так и у ткани с индуцированным LQT2. Это позволило обобщать результаты экспериментов посредством вероятностной меры аритмогенности. Мера аритмогенности, введенная для нашего теста, представляет собой количество случаев любого нарушения проведения на данном стандартном препятствии для различных частот на культуре клеток, полученных от различных пациентов. Эффективность теста проверена как для сердечной ткани, содержащей наследуемые мутации, приводящие к синдрому LQT, так и для ряда фармпрепаратов(Е-4031, лидокаин, ботулотоксин), в качестве побочного действия вызывающих синдром LQT. Таким образом, созданная стандартная тканево-инженерная модель дает возможность тестирования различных лекарственных соединений на пациент-специфичном сердечном синцитии.

В заключении подведем общий итог по задачам работы:

1. Было проведено исследование и компьютерное моделирование факторов, участвующих в процессе ишемии. Найдены условия и параметры для проведения кальциевых волн возбуждения и возможности деполяризации кардиомиоцитов при различных концентрациях ионов во внешней среде. Полученные результаты по влиянию локальной ишемии, в частности гиперкалиемии, а также модифицированная модель Корхонена для неонатальных кардиомиоцитов крысы опубликованы [16].
2. Проведено исследование свободных реентри в анизотропной среде, при градиенте возбудимости. Создана модель одностороннего блока проведения.
3. Исследовано распространение волны возбуждения вдоль границы возбудимости или невозбудимого препятствия по культуре сердечных клеток. Найдены граничные условия для травматических дефектов. Проведено моделирование данных условий. Полученные результаты опубликованы [15].
4. Исследовано электромеханическое взаимодействие клеток различных типов, в том числе клеток, полученных от разных животных. Полученные результаты опубликованы [17].
5. Исследованы условия создания неинвазивного метода стимуляции сердечной ткани и контроля возбудимости (метод оптической стимуляции)
6. Исследована роль неоднородностей при формировании реентри на культуре сердечной ткани.

На основе полученных данных была реализована основная цель данной работы:

Была создана тканево-инженерная модель для исследования различных патологических сердечных заболеваний человека, как врожденных, так и приобретенных. Проверка полученной тканево-инженерной модели на нескольких блокаторах и лекарственных соединениях показала релевантность предлагаемой модели. Результаты опубликованы в ряде работ [13, 14, 7]. В процессе работы также были опубликованы статьи, не вошедшие в основные результаты [21, 20, 32, 25-28].

Выводы

Основным итогом работы является тканево-инженерная экспериментальная модель для исследования риска возникновения аритмий под воздействием как внешних факторов, так и врожденных пациент-специфичных патологий. Данная модель является на данный момент наиболее приближенной к человеческой сердечной ткани, так как исследована на предмет формирования функционального синцития, имеет биофизическое обоснование в качестве стандартной неоднородности и основана на человеческих пациент-специфичных кардиомиоцитах, полученных путем дифференцировки из ИПСк. Из исследований, проведенных в представленной работе можно сделать ряд выводов:

1. Существуют временные границы формирования межклеточных контактов у кардиомиоцитов в процессе дифференцировки. Этот факт позволяет получить применение выявленной в работе самоорганизации слоя сердечных клеток как метода сортировки/изоляции hiPSC-CMs с определенными временными границами: от 8 до 20 дня от начала дифференцировки. Эти данные могут быть использованы для клеточной терапии.
2. На тканево-инженерной модели подтверждена ключевая роль неоднородностей и травматических дефектов в возникновении тахиаритмий.
3. Существует возможность межвидовой пересадки сердечных тканей с формированием электро-механического кардиального синцития.
4. Проведение тестирования фармпрепараторов на полученной модели показало перспективность индивидуального подбора лекарственных препаратов.

Результаты и выводы представлены автором в ряде публикаций [7, 13-17], часть из них не вошли в основные результаты работы [21, 20, 32, 25-28].

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю Константину Игоревичу Агладзе за постановку задачи и обсуждение результатов. Также автор бесконечно признателен своему руководителю по экспериментальной работе с

культурами клеток ИПСк Дементьевой Елене и руководителю по компьютерному моделированию Кудряшовой Нине за неоценимую помощь во всех аспектах подготовки данной работы. Также автор благодарит Панфилова А.В. и Ефимова И.Р. за предоставленные возможности и бесценную поддержку.

Автор благодарит своих соавторов за огромный вклад в представленную работу:

- Слотвицкого Михаила за помощь в получении и оформлении экспериментальных данных,
- Валетдинову Камиллу за получение и ведение части линий ИПСк,
- Качалова Вячеслава за участие в компьютерном моделировании,
- Калиту Ирину за помощь в составлении компьютерного моделирования,
- Доронина Романа за помощь в компьютерном моделировании,
- Агладзе Надежду Николаевну за обучение конфокальной микроскопии,
- Галайдыча Олега за начальное руководство над проектом,
- Подгурскую Алису за помощь в обработке данных,
- Фролову Шейду за предоставление экспериментальных данных patch-clamp,
- Низамиеву Айгуль, Павлову Софью и Балашова Виктора за содействие в выполнении экспериментов.

Отдельную благодарность автор выражает клинике им. Мешалкина (Новосибирск), институту хирургии им. Петровского (Москва), а также группе профессора Закияна из ИЦИГ РАН (Новосибирск).

Основные результаты диссертационной работы изложены в следующих публикациях:

1. Kudryashova N., Tsvelaya V. et al. Virtual cardiac monolayers for electrical wave propagation //Scientific reports. – 2017. – Т. 7. – №. 1. – С. 7887.
2. Balashov, V., Chepeleva, E., Tsvelaya, V., Slotvitsky, M., Pavlova, S., Ponomarenko, A., ... & Agladze, K. (2018, December). Use of polylactic nanofibrous scaffolds as a substrate for cardiomyocytes cultivation. In AIP Conference Proceedings (Vol. 2051, No. 1, p. 020024). AIP Publishing.
3. 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.
4. Slotvitsky M., Tsvelaya V. et al. Arrhythmogenicity Test Based on a Human Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)-Derived Cardiomyocyte Layer //Toxicological Sciences. – 2018.)
5. Tsvelaya, V. A., Slotvitsky, M. M., Frolova, S. R., & Agladze, K. I. Comparative analysis of electrophysiological characteristics and excitation conduction in ventricular cardiomyocytes obtained from a healthy individual and a patient with the syndrome of long QT interval// Clinical and Experimental Surgery. – 2018. – 6(3), 6-15.

6. Slotvitsky M. M., Tsvetaya V. A. et al. The study of the functionality of cardiomyocytes obtained from induced pluripotent stem cells for the modeling of cardiac arrhythmias based on long QT syndrome //Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii. – 2018. – T. 22. – №. 2. – C. 187-195.
7. Kachalov V. N., Tsvetaya V. A. et al. Success of spiral wave unpinning from heterogeneity in a cardiac tissue depends on its boundary conditions //JETP Letters. – 2017. – T. 106. – №. 9. – C. 608-612.
8. Tsvetaya V. A. et al. Cardiac excitation waves under strong hyperkalemia condition //JETP Letters. – 2018. – T. 108. – №. 8. – C. 548-552.
9. Agladze N. N., Halaidych, O. V., Tsvetaya, V. A. et al. Synchronization of excitable cardiac cultures of different origin //Biomaterials science. – 2017. – T. 5. – №. 9. – C. 1777-1785.
10. Podgurskaya A. D., Tsvetaya V. A. et al. Effect of heptanol and ethanol on excitation wave propagation in a neonatal rat ventricular myocyte monolayer //Toxicology in Vitro. – 2018. – T. 51. – C. 136-144.
11. Frolova, S. R., Gaiko, O., Tsvetaya, V. A., Pimenov, O. Y., & Agladze, K. I. (2016). Photocontrol of Voltage-Gated Ion Channel Activity by Azobenzene Trimethylammonium Bromide in Neonatal Rat Cardiomyocytes. *PloS one*, 11(3), e0152018.
12. Balashov, V. A., Nizamieva, A. A., Tsvetaya, V. A., & Agladze, K. I. (2018). Model of optical biopacemaker based on integration of photosensitive cardiomyocytes into cardiac culture. *Genes and Cells*, 13(4), 43-50. doi:10.23868/201812046
13. Tsvetaya VA, Gams A., Aziz J. and Efimov IR. "Induced pluripotent stem-cell-derived cardiomyocytes (iPSC-CMs): novel diagnostic platform." *Stem Cells - from Hype to Real Hope*. K. H. Haider, S. M. Aziz. De Gruyter, 2018.

Список литературы автореферата

1. Wang H. et al. 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. – 2016. – T. 388. – №. 10053. – C. 1459-1544
2. Roth, Gregory A., et al. "Global and regional patterns in cardiovascular mortality from 1990 to 2013." *Circulation* 132.17 (2015): 1667-1678
3. Cabo C. et al. Wave-front curvature as a cause of slow conduction and block in isolated cardiac muscle //Circulation research. – 1994. – T. 75. – №. 6. – C. 1014-1028.
4. Gray R. A., Pertsov A. M., Jalife J. Spatial and temporal organization during cardiac fibrillation //Nature. – 1998. – T. 392. – №. 6671. – C. 75.
5. Lahti A. L. et al. Model for long QT syndrome type 2 using human iPS cells demonstrates arrhythmogenic characteristics in cell culture //Disease models & mechanisms. – 2012. – T. 5. – №. 2. – C. 220-230.
6. Kadota S. et al. Development of a reentrant arrhythmia model in human pluripotent stem cell-derived cardiac cell sheets //European heart journal. – 2012. – T. 34. – №. 15. – C. 1147-1156.
7. Slotvitsky M., Tsvetaya V. et al. Arrhythmogenicity Test Based on a Human Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)-Derived Cardiomyocyte Layer //Toxicological Sciences. – 2018.)
8. Lehnart S. E. et al. Inherited arrhythmias: a National Heart, Lung, and Blood Institute and Office of Rare Diseases workshop consensus report about the diagnosis, phenotyping, molecular mechanisms, and therapeutic approaches for primary

- cardiomyopathies of gene mutations affecting ion channel function //Circulation. – 2007. – Т. 116. – №. 20. – С. 2325-2345.
9. Lee M. P. et al. Targeted disruption of the *Kvlqt1* gene causes deafness and gastric hyperplasia in mice //The Journal of clinical investigation. – 2000. – Т. 106. – №. 12. – С. 1447-1455.
 10. Casimiro M. C. et al. Targeted disruption of the *Kcnq1* gene produces a mouse model of Jervell and Lange–Nielsen Syndrome //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2001. – Т. 98. – №. 5. – С. 2526-2531.
 11. Kaese S., Verheule S. Cardiac electrophysiology in mice: a matter of size //Frontiers in physiology. – 2012. – Т. 3. – С. 345.
 12. Nerbonne J. M. et al. Genetic manipulation of cardiac K⁺ channel function in mice: what have we learned, and where do we go from here? //Circulation research. – 2001. – Т. 89. – №. 11. – С. 944-956.
 13. Tsvetaya, V. A., Slotvitsky, M. M., Frolova, S. R., & Agladze, K. I. Comparative analysis of electrophysiological characteristics and excitation conduction in ventricular cardiomyocytes obtained from a healthy individual and a patient with the syndrome of long QT interval// Clinical and Experimental Surgery. – 2018. – 6(3), 6-15.
 14. Slotvitsky M. M., Tsvetaya V.A. et al. The study of the functionality of cardiomyocytes obtained from induced pluripotent stem cells for the modeling of cardiac arrhythmias based on long QT syndrome //Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii. – 2018. – Т. 22. – №. 2. – С. 187-195.
 15. Kachalov V. N., Tsvetaya V. A. et al. Success of spiral wave unpinning from heterogeneity in a cardiac tissue depends on its boundary conditions //JETP Letters. – 2017. – Т. 106. – №. 9. – С. 608-612.
 16. Tsvetaya V. A. et al. Cardiac excitation waves under strong hyperkalemia condition //JETP Letters. – 2018. – Т. 108. – №. 8. – С. 548-552.
 17. Agladze N. N., Halaidych, O. V., Tsvetaya, V. A. et al. Synchronization of excitable cardiac cultures of different origin //Biomaterials science. – 2017. – Т. 5. – №. 9. – С. 1777-1785.
 18. A. T. Winfree «When time breaks down: The three-dimensional dynamics of electrochemical waves and cardiac arrhythmias». //Princeton University Press. – 1987
 19. Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G and Deisseroth K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. //Nat Neurosci. – 2005. – 8: 1263-1268.
 20. Frolova, S. R., Gaiko, O., Tsvetaya, V. A., Pimenov, O. Y., & Agladze, K. I. (2016). Photocontrol of Voltage-Gated Ion Channel Activity by Azobenzene Trimethylammonium Bromide in Neonatal Rat Cardiomyocytes. PloS one, 11(3), e0152018.
 21. Kadota S. Curvature-dependent excitation propagation in cultured cardiac tissue / Kadota S., Kay M., Magome N., Agladze K. // J Exp Theor Physics – 2011. – Т. 94 – № 11 – С.824–830.
 22. Tsvetaya VA, Gams A., Aziz J. and Efimov IR. "Induced pluripotent stem-cell-derived cardiomyocytes (iPSC-CMs): novel diagnostic platform." *Stem Cells - from Hype to Real Hope*. K. H. Haider, S. M. Aziz. De Gruyter, 2018.
 23. Lian X, Zhang J, Azarin SM, et al. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/β-catenin signaling under fully defined conditions. Nat Protoc [Internet] 2012 [cited 2018 Feb 14];8(1):162–75. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nprot.2012.150>

24. Burridge, P. W., Matsa, E., Shukla, P., Lin, Z. C., Churko, J. M., Ebert, A. D., ... & Plews, J. R. (2014). Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nature methods*, 11(8), 855
25. Kudryashova N., Tsvelaya V. et al. Virtual cardiac monolayers for electrical wave propagation //*Scientific reports*. – 2017. – Т. 7. – №. 1. – С. 7887.
26. Balashov, V., Chepeleva, E., Tsvelaya, V., Slotvitsky, M., Pavlova, S., Ponomarenko, A., ... & Agladze, K. (2018, December). Use of polylactic nanofibrous scaffolds as a substrate for cardiomyocytes cultivation. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 2051, No. 1, p. 020024). AIP Publishing.
27. 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.
28. Podgurskaya A. et al. The Use of iPSC-Derived Cardiomyocytes and Optical Mapping for Erythromycin Arrhythmogenicity Testing //*bioRxiv*. – 2019. – С. 574012.
29. Gray, R. A. et al. Nonstationary Vortexlike Reentrant Activity as a Mechanism of Polymorphic Ventricular Tachycardia in the Isolated Rabbit Heart. *Circulation* 91, 2454–2469 (1995)
30. Clayton, R. H. et al. Models of cardiac tissue electrophysiology: Progress, challenges and open questions. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 104, 22–48 (2011)
31. T. Sladek et al. The border zone of the early myocardial infarction in dogs; its characteristic and viability. *Basic Res. Cardiol.* 79, 344–349 (1984)
32. Podgurskaya A. D., Tsvelaya V.A. et al. Effect of heptanol and ethanol on excitation wave propagation in a neonatal rat ventricular myocyte monolayer //*Toxicology in Vitro*. – 2018. – Т. 51. – С. 136-144.
33. Kazbanov I. V. et al. Effect of global cardiac ischemia on human ventricular fibrillation: insights from a multi-scale mechanistic model of the human heart //*PLoS computational biology*. – 2014. – Т. 10. – №. 11. – С. e1003891.
34. Korhonen T., Hänninen S. L., Tavi P. Model of excitation-contraction coupling of rat neonatal ventricular myocytes //*Biophysical journal*. – 2009. – Т. 96. – №. 3. – С. 1189-1209.
35. W. C. Claycomb, N. A. Lanson, B. S. Stallworth [и др.] «HL-1 cells: A cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte» // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 1998 Mar.. – Т. 95, № 6 – С. 2979–2984
36. White S. M., Constantin P. E., Claycomb W. C. Cardiac physiology at the cellular level: use of cultured HL-1 cardiomyocytes for studies of cardiac muscle cell structure and function //*American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. – 2004. – Т. 286. – №. 3. – С. H823-H829.