



Точка зрения

Клеточные технологии в регенеративной медицине сердца: основные проблемы и пути развития

Агладзе К.И.¹

Агладзе Константин Игоревич – канд. физ.-мат. наук, профессор, заведующий лабораторией биофизики возбудимых систем¹; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9258-436X>

✉ 141701, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский пер., 9, Российская Федерация.
Тел.: +7 (495) 408 46 45.
E-mail: kagladze@gmail.com

Потенциал сердечной ткани к ауторегенерации невысок и заключается, предположительно, в небольшом количестве нишевых стволовых клеток. Это делает крайне важным развитие регенеративных технологий миокарда, основанных на современных методах, например, клеточном репрограммировании и трехмерной биопечати. Однако нередко бывает трудно отделить регулярно появляющиеся в печати сенсационные сообщения о новых «прорывных» технологиях от таковых, действительно имеющих практические приложения. В статье изложена точка зрения на популярные технологии регенерации сердечной ткани и миокарда в целом, рассмотрены их недостатки. К главным проблемам, стоящим перед активно развиваемым сегодня «биопринтингом», отнесены невысокий уровень дифференцировки при печати стволовыми клетками, не позволяющий создать полноценную сердечную ткань без посторонних вкраплений, а также технологическая невозможность при печати дифференцированными клетками, в процессе доставки клеток в соответствующие места матрикса, задать их связи с другими клетками. Несмотря на оптимистичные сообщения о результативности инъекции стволовых или индуцированно-плюрипотентных

клеток в пораженную зону миокарда, впервые появившиеся около 20 лет назад, в настоящее время эта идея представляется весьма сомнительной, так как в последние годы отмечается практически полное отсутствие положительного эффекта этой процедуры при серьезных рисках осложнений. В отношении выращивания мышечных элементов сердца основной проблемой видится развитие «правильной» васкуляризации выращиваемой мышцы. Вместе с тем подчеркивается практическая осуществимость выращивания относительно небольших элементов миокарда, таких как синусовый узел.

Ключевые слова: миокард, регенерация, стволовые клетки, индуцированно-плюрипотентные стволовые клетки, тканевая инженерия

Для цитирования: Агладзе КИ. Клеточные технологии в регенеративной медицине сердца: основные проблемы и пути развития. Альманах клинической медицины. 2019;47(7):623–9. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-043.

Поступила 25.06.2019; принята к публикации 05.08.2019; опубликована онлайн 23.08.2019

¹ ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»; 141701, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский пер., 9, Российская Федерация

Актуальность регенеративных технологий в кардиологической практике не вызывает сомнений: по оценкам Всемирной организации здравоохранения, в подавляющем большинстве стран мира сердечно-сосудистые заболевания занимают первое место среди причин смертности населения [1]. Значительная доля сердечно-сосудистых заболеваний приходится на нарушения ритма сердца и, в частности, тахикардии. Наиболее опасны

желудочковые тахикардии, часто приводящие к фибрилляции, манифестирующей как внезапная сердечная смерть [2]. В основе большинства сердечных тахикардий, и желудочковых, и наджелудочковых, лежат циркулирующие волны возбуждения – риентри. А они, в свою очередь, возникают, как правило, в поврежденной области миокарда [3]. Типичным примером такого повреждения служит постинфарктный рубец, нарушающий нормальное проведение возбуждения.



Другой пример сердечной патологии – потеря сократительной функции сердца вследствие истончения мышечной стенки или замещения мышечной ткани фиброзной [3].

Потенциал сердечной ткани к ауторегенерации крайне невысок и заключается, предположительно, в небольшом количестве нишевых стволовых клеток [4]. При этом во время инфаркта может быть потеряно около миллиарда кардиомиоцитов [5], замещающихся соединительной тканью. С начала нулевых предпринято достаточно много попыток добиться значительной регенерации сердечной ткани путем инъекции стволовых клеток [6, 7]. И если вначале ожидания были весьма оптимистичными, базируясь на публикациях о якобы имевшем место успешном восстановлении миокарда [7, 8], то по прошествии времени становилось все более ясным, что значимого положительного эффекта инъекции стволовых клеток не приносят, сопровождаясь рядом опасных побочных эффектов [9–11]. Изредка наблюдаемое улучшение сердечной деятельности было обусловлено, вероятнее всего, паракринным эффектом [12–14].

С открытием в 2006 г. Shinya Yamanaka клеточного репрограммирования интерес к регенерации сердечной ткани получил новый импульс, на этот раз в основу положены так называемые индуцированно-плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) [15]. Их использование вместо эмбриональных стволовых клеток представляется тем более заманчивой перспективой, что источником ИПСК выступает сам пациент, вследствие чего полностью снимаются вопросы иммунного отторжения клеточного материала.

Опасность трансплантации стволовых клеток была подтверждена в многочисленных работах [16–18]. В ответ появилась концепция регенерации за счет сформировавшегося из ИПСК аутологичного клеточного материала [17, 19]. В частности, в инфарктную зону вносили дифференцированные из ИПСК кардиомиоциты [20, 21]. Для компенсации слабости синусового узла в миокард вносили дифференцированные из ИПСК пейсмекерные клетки [22–24].

Отсутствие положительных эффектов при подобной клеточной имплантации привело к пониманию, что имплантироваться должны не отдельные клетки в суспензии, а, скорее, выращенные из ИПСК элементы миокардиальной ткани. Прогрессу подобного подхода, обсуждению его *pro* и *contra* и посвящена настоящая статья. Изложенная точка зрения не претендует на исчерпывающую глубину в освещении клеточных

технологий в регенеративной медицине сердца. Это критический взгляд на основные тренды развития данных технологий. Представлено также наше видение путей решения или обхода основных проблем, возникающих в мейнстриме регенерации миокарда.

3D-печать сердца

Если не помогают инъекции клеток в пораженную область, а трехмерная печать породила такой феномен, как биопринтинг, стоит ли мелочиться – не проще ли напечатать новое сердце? Тем более что этот орган, предположительно, может быть напечатан из донорских клеток самого пациента, а значит, как говорилось выше, не должно возникнуть проблем с иммунным отторжением. Первые попытки печати трехмерной сердечной ткани предприняты около 7 лет назад [25] и, по сообщению авторов, были успешными, то есть завершились созданием трехмерных альгинатных блоков, содержащих живые клетки [25]. К сожалению, авторы не выполнили никакого анализа функциональных возможностей полученной «ткани», таких как проведение волны возбуждения и наличие скоординированных сокращений. В последующие годы опубликовано значительное количество работ, посвященных трехмерному биопринтингу миокарда. Однако до нынешнего времени результаты по контрасту с ожиданиями остаются весьма скромными. В некоторых работах [26, 27] в качестве сердцеподобных структур были произведены клеточные сфероиды, имеющие довольно отдаленное отношение к реальным структурам сердца. Другие исследователи [28] сосредоточились на поиске наиболее подходящего материала скаффолда для трехмерной печати, например, децеллюризованной соединительной ткани. Достаточно подробно стратегии трехмерного биопринтинга разобраны в обзорной статье [29]. Так, предлагается печатать «элементарные» единицы органа, например, нефрон у почки. Однако, что могло бы служить подобной элементарной единицей для сердца – неясно. Тем не менее можно считать успешными попытки печати элементов сердечно-сосудистой системы, не обладающих сложной трехмерной структурой и состоящих главным образом из соединительной ткани, например, аортального клапана [30]. С некоторой долей условности к трехмерной печати можно также отнести методы создания сердечного органоида, использующие вторичное заселение стволовыми клетками или дифференцирующимися кардиомиоцитами децеллюризованного матрикса сердца животного [31, 32].

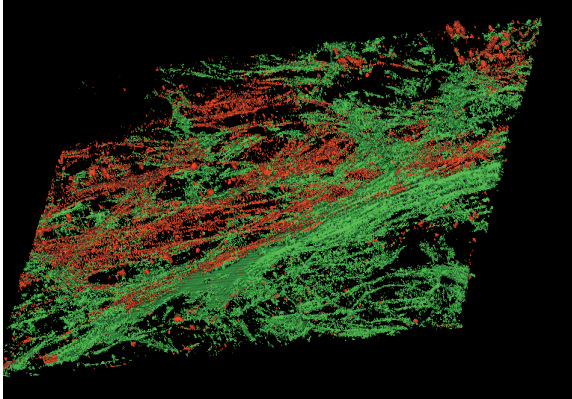


Рис. 1. Самоорганизация сердечной ткани через 15 дней после начала дифференцировки, через 8 дней посева. Оптическое сканирование на конфокальном микроскопе проводилось с шагом 3 мкм; толщина сфотографированного слоя составляет около 57 мкм. Кардиомиоциты были помечены красным альфа-актинином, зеленые антитела – для F-актина. Фотография получена на микроскопе Zeiss LSM-710 в лаборатории биофизики возбудимых систем МФТИ (руководитель К.И. Агладзе)

Остановимся на основных проблемах метода трехмерной печати сердца. Неслучайно среди более чем 100 публикаций на данную тему фактически отсутствует оценка функциональности произведенных органоидов. В лучшем случае авторы ограничиваются констатацией «наличия сокращений» и изменения спонтанной активности клеток под действием фармпрепаратов [25, 32]. Трехмерная печать представляет собой метод доставки материала в необходимую точку трехмерного пространства. Процесс биопринтинга основан на том, что в соответствующую область доставляются как живые клетки, так и материал скаффолда, позволяющий зафиксировать клетку в пространстве. Предполагается, что клетки, помещенные в соответствующие структурные элементы печатаемого сердца, образуют сердечную ткань. Однако эта гипотеза базируется на нескольких допущениях. Считается, что при печати стволовыми клетками или ИПСК клетки благополучно дифференцируются в кардиомиоциты. Но, как известно, даже в очень хорошем случае выход кардиомиоцитов составляет не более 50%, что было подтверждено в наших работах [33, 34]. Более того, дифференцирующиеся клетки имеют тенденцию к образованию кластеров, а организация этих кластеров в структурах более сложных, чем клеточный монослой, совершенно не изучена [33]. Пример изображения самоорганизующегося из ИПСК слоя кардиомиоцитов, полученного с помощью конфокального микроскопа, приведен на рис. 1. Кроме того, печатаемое сердце должно обладать развитой сосудистой системой. А при печати стволовыми клетками совершенно непонятно, каким способом можно дифференцировать рядом расположенные клетки в клетки различных типов. В случае биопечати зрелыми клетками указанные выше проблемы можно, в принципе, преодолеть. Однако остаются нерешенными вопросы: как расположить печатаемые

клетки в необходимой ориентации и как задать необходимые связи между соседними клетками. Полагаться на самоорганизацию тут не придется, а значит, трехмерная биопечать сердца пока не представляется возможной.

Какие направления работы могут быть предложены в этой области? Одно из них – образование сердечного синцития, способного к генерации и проведению возбуждения, – в настоящее время наиболее эффективно проверяется с помощью так называемого оптического картирования, при котором возбуждение, генерируемое в сердечных клетках, регистрируется с помощью флюоресцентных маркеров [35, 36]. Оптическое картирование позволяет визуализировать распространяющуюся волну возбуждения и измерить ее параметры, такие как скорость, рефрактерность и др. Рис. 2 демонстрирует пример регистрируемой волны возбуждения в слое кардиомиоцитов, полученных из человеческих ИПСК. Наличие проведения волны возбуждения в массиве клеток говорит о том, что они связаны в синцитий. Особенно эффективно оптическое картирование в случае тонких квазидвумерных слоев. Интересно было бы напечатать с помощью биопринтера двумерный слой клеток и с помощью оптического картирования исследовать его на формирование синцития, а также определить факторы, приводящие к такому формированию. При получении успешного результата можно было бы провести послойную сборку трехмерной конструкции.

Культивирование элементов клеточной стенки

Как было показано ранее, монослои сердечных клеток, в том числе с заданной полимерными волокнами архитектурой, успешно культивируются [37]. Однако, несмотря на верифицируемую функциональность, то есть способность к проведению возбуждения и к согласованному сокращению, такие монослои развивают механическое усилие, явно недостаточное для того, чтобы успешно заменить часть сократительного миокарда. Предпринимались попытки создать сборку из монослоев кардиомиоцитов [38–41], но они не привели к успеху. Не удалось культивировать конструкцию более чем четырехслойную. Основным ограничением выступили физические факторы, а именно диффузия. Обмен веществ между клеткой и окружающей средой базируется на диффузии. В отсутствие кровеносного русла это – диффузный обмен клетки метаболитами с инкубирующей средой, происходящий через

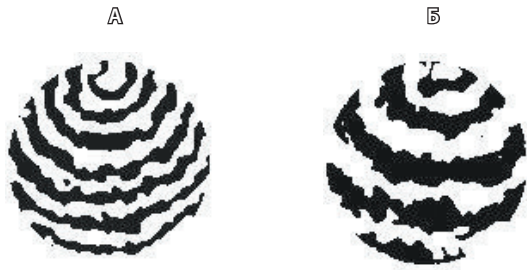


Рис. 2. Оптическое картирование клеточного монослоя кардиомиоцитов, полученных из человеческих индуцированно-плюрипотентных стволовых клеток с помощью Fluo-4. Изохрональная карта распространения волн: стимуляция 1 Гц (А) и 0,5 Гц (Б). Флюоресцентные флюорографии получены с помощью камеры Andor-897-U в лаборатории К.И. Агладзе в Университете Киото (Laboratory at the Institute for Integrated Cell-Material Sciences, Kyoto University, Japan) (публикуются впервые)

клеточные слои. Увеличение пути диффузионно-го транспорта до 70–80 микрон, что как раз примерно соответствует четырем клеточным слоям, включая межклеточный полимерный матрикс, приводит к сильной ишемии и повреждению удаленных от поверхности клеток. Васкуляризация растущей сердечной структуры базируется на добавлении в инкубирующую среду факторов сосудистого роста, и в отдельных случаях получали успешное сокультурирование кардиомиоцитов и сосудистых клеток [42–45]. Несмотря на некоторые успехи в выращивании кровеносного русла и, соответственно, относительно успешную культивацию 2–3 мм слоев сердечных клеток, для трансплантации подобные мышечные лоскуты оказываются малопригодны, так как сосудистое русло имплантата развивается спонтанно и без всякого соответствия с сосудистым руслом реципиента [46–48].

Ранее мы предложили способ преодоления этой проблемы [37]. Сначала выращиваются отдельные слои клеток на подвешенных полимерных волокнах, дающих ажурную сократительную конструкцию (рис. 3). Далее проводится сборка подобных ажурных слоев в многослойную конструкцию по схеме, изображенной на рис. 4. Таким образом предполагалось получить губчатую пористую мышечную структуру, которая вследствие периодических сокращений

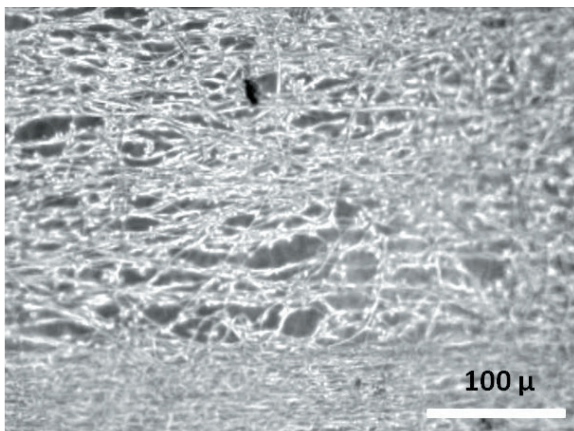


Рис. 3. Слой крысиных неонатальных кардиомиоцитов на субстрате из подвешенных полимерных волокон (полиметилглутаримидные волокна, покрытые слоем фибронектина). Фотография получена в лаборатории биофизики возбудимых систем МФТИ (руководитель К.И. Агладзе) (публикуется впервые)

обеспечивала бы прокачку инкубирующей жидкости (или крови при имплантации), поддерживающую жизнеспособность имплантата во время развития сосудистой системы, прорастающей из тканей реципиента. Следует отметить, что простое помещение клеток в губчатую структуру из альгинатов не обеспечивает межклеточные взаимодействия, ответственные за проведение возбуждения, а слои клеток на подвешенных волокнах, как было показано нами, – обеспечивают [37].

Восстановление проводящей системы сердца

Понимая, что главная сложность в выращивании сердечных имплантатов заключается в их физическом объеме, разумно найти такие элементы сердечно-сосудистой системы, которые не подвержены влиянию факторов объема и могут выживать какое-то время в отсутствие васкуляризации. Проще говоря, представляют собой достаточно небольшие клеточные образования, и их культивирование не проблематично с точки зрения обмена метаболитами со средой. К подобным клеточным образованиям, относится синусовый узел, основной водитель ритма в сердце. При развитии брадикардий вследствие слабости синусового узла используется электрокардиостимуляция. Несмотря на достижения в этой области, превосходная паллиативная стимуляция сопряжена с определенными ограничениями, а именно: плохой ответ на реакцию автономной нервной системы, потребность в мониторинге и технической поддержке системы стимуляции (в том числе необходимость замены батареи устройства/электродов), инфицирование системы стимуляции, а также большая проблема адаптации системы стимуляции к росту и развитию организма у педиатрических пациентов [49].

В получении пейсмекерных клеток в настоящее время существуют две стратегии. Первая – трансфекция обычных желудочковых или предсердных кардиомиоцитов генным материалом, ответственным за синтез канальных белков и сборку мембранных каналов, например, HCN212 [50]. Вторая – получение пейсмекерных клеток из ИПСК пациента [51]. Однако одного наличия пейсмекерных клеток недостаточно для успешного создания биопейсмекера. Попытки имплантировать пейсмекерные клетки путем инъекции в миокард реципиента оказались малоэффективными [22, 23, 50]. Выходом может стать выращивание пейсмекерных клеток на полимерных подложках до состояния тканево-инженерных лоскутов, пригодных для

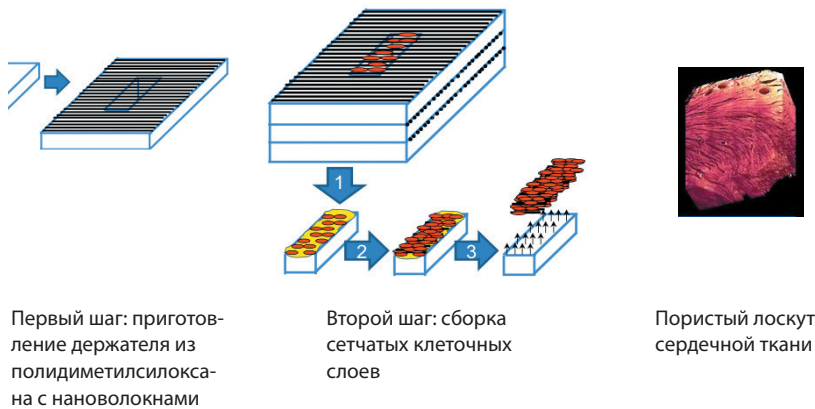


Рис. 4. Проектирование многослойных лоскутов сердечной ткани с контролируемой архитектурой из первичных клеток и индуцированно-плюрипотентных стволовых клеток. Метод предложен и опробован в лаборатории биофизики возбудимых систем МФТИ (руководитель К.И. Агладзе) (схема публикуется впервые)

имплантации, таких, как описано в работах [52, 53]. Альтернативно лоскутам пейсмекерные клетки могут выращиваться на микроносителях,

поскольку известно, что даже единичное полимерное волокно способно обеспечить субстрат для прикрепления и развития сердечной клетки [37]. Таким образом, считаем перспективной разработку микроносителей для клеточного материала на основе фрагментов полимерных волокон, и эти работы в настоящее время ведутся в лаборатории биофизики возбудимых систем МФТИ.

Заключение

Основной преградой на пути развития технологий регенерации сердечной ткани лежит «фактор объема» – невозможность в настоящее время культивировать достаточно объемные («толстые») фрагменты сердечной ткани. В перспективе это препятствие может быть преодолено с помощью методов выращивания васкуляризированной сердечной ткани с заданной архитектурой сосудистого русла. До появления подобных методов, по-видимому, возможно выращивание отдельных относительно небольших элементов миокарда типа синусового узла. ©

Дополнительная информация

Конфликт интересов

Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Благодарности

Часть иллюстративных материалов, использованных в статье, была получена в результате исследований, проводимых по гранту Российского научного фонда № 16-14-10091.

Литература / References

- Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, Bravata DM, Dai S, Ford ES, Fox CS, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Makuc DM, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, Moy CS, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Soliman EZ, Sorlie PD, Sotoodehnia N, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics – 2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2012;125(1):e2–220. doi: 10.1161/CIR.0b013e31823ac046.
- Zipes DP, Wellens HJ. Sudden cardiac death. *Circulation*. 1998;98(21):2334–51. doi: 10.1161/01.cir.98.21.2334.
- Centurión OA, Alderete JF, Torales JM, García LB, Scavenius KE, Miño LM. Myocardial fibrosis as a pathway of prediction of ventricular arrhythmias and sudden cardiac death in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *Crit Pathw Cardiol*. 2019;18(2):89–97. doi: 10.1097/HPC.000000000000171.
- Bearzi C, Rota M, Hosoda T, Tillmanns J, Nascimbene A, De Angelis A, Yasuzawa-Amano S, Trofimova I, Siggins RW, Lecapitaine N, Cascapera S, Beltrami AP, D'Alessandro DA, Zias E, Quaini F, Urbanek K, Michler RE, Bolli R, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Human cardiac stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(35):14068–73. doi: 10.1073/pnas.0706760104.
- Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, Schmidt U, Semigran MJ, Dec GW, Khaw BA. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med*. 1996;335(16):1182–9. doi: 10.1056/NEJM199610173351603.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001;410(6829):701–5. doi: 10.1038/35070587.
- Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest*. 2001;107(11):1395–402. doi: 10.1172/JCI12150.
- Assmus B, Schächinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Döbert N, Grünwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*. 2002;106(24):3009–17. doi: 10.1161/01.cir.0000043246.74879.cd.
- Bolli R, Chugh AR, D'Amaro D, Loughran JH, Stoddard MF, Ikram S, Beache GM, Wagner SG, Leri A, Hosoda T, Sanada F, Elmore JB, Goichberg P, Cappetta D, Solankhi NK, Fahsah I, Rokosh DG, Slaughter MS, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells in patients with ischemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet*. 2011;378(9806):1847–57. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61590-0. Retracted article (*Lancet*. 2019;393(10176):1084. doi: 10.1016/S0140-6736(19)30542-2).
- Packer M. The alchemist's nightmare: might mesenchymal stem cells that are recruited to repair the injured heart be transformed into fibroblasts rather than cardiomyocytes? *Cir-*



- ulation. 2018;137(19):2068–73. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.032190.
11. Lee SH, Hong JH, Cho KH, Noh JW, Cho HJ. Discrepancy between short-term and long-term effects of bone marrow-derived cell therapy in acute myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis. *Stem Cell Res Ther.* 2016;7(1):153. doi: 10.1186/s13287-016-0415-z.
 12. Gneccchi M, He H, Noiseux N, Liang OD, Zhang L, Morello F, Mu H, Melo LG, Pratt RE, Ingwall JS, Dzau VJ. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J.* 2006;20(6):661–9. doi: 10.1096/fj.05-5211.com.
 13. Gneccchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res.* 2008;103(11):1204–19. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.176826.
 14. Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *Int J Mol Sci.* 2017;18(9). pii: E1852. doi: 10.3390/ijms18091852.
 15. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126(4):663–76. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
 16. Julian K, Yuhasz N, Hollingsworth E, Imitola J. The "Growing" Reality of the Neurological Complications of Global "Stem Cell Tourism". *Semin Neurol.* 2018;38(2):176–81. doi: 10.1055/s-0038-1649338.
 17. Gapska P, Kurpisz M. Perspective in optimization of stem cell therapies for heart regeneration. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2017;71(0):975–87. doi: 10.5604/01.3001.0010.6665.
 18. Mohammadi D. The dangers of unregulated stem-cell marketing. *Lancet.* 2017;390(10105):1823–4. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32358-9.
 19. Wu SM, Hochedlinger K. Harnessing the potential of induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Nat Cell Biol.* 2011;13(5):497–505. doi: 10.1038/ncb0511-497.
 20. Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, Yamada S, Perez-Terzic C, Ikeda Y, Terzic A. Repair of acute myocardial infarction by human stemness factors induced pluripotent stem cells. *Circulation.* 2009;120(5):408–16. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.865154.
 21. Kawamura M, Miyagawa S, Miki K, Saito A, Fukushima S, Higuchi T, Kawamura T, Kuratani T, Daimon T, Shimizu T, Okano T, Sawa Y. Feasibility, safety, and therapeutic efficacy of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte sheets in a porcine ischemic cardiomyopathy model. *Circulation.* 2012;126(11 Suppl 1):S29–37. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.084343.
 22. Morris GM, Boyett MR. Perspectives – biological pacing, a clinical reality? *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2009;3(6):479–83. doi: 10.1177/1753944709345792.
 23. Xiao YF, Sigg DC. Biological approaches to generating cardiac biopacemaker for bradycardia. *Sheng Li Xue Bao.* 2007;59(5):562–70.
 24. Ambesh P, Kapoor A. Biological pacemakers: Concepts and techniques. *Natl Med J India.* 2017;30(6):324–6. doi: 10.4103/0970-258X.239072.
 25. Gaetani R, Doevendans PA, Metz CH, Alblas J, Messina E, Giacomello A, Sluijter JP. Cardiac tissue engineering using tissue printing technology and human cardiac progenitor cells. *Biomaterials.* 2012;33(6):1782–90. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.11.003.
 26. Chimenti I, Massai D, Morbiducci U, Beltrami AP, Pesce M, Messina E. Stem cell spheroids and ex vivo niche modeling: rationalization and scaling-up. *J Cardiovasc Transl Res.* 2017;10(2):150–66. doi: 10.1007/s12265-017-9741-5.
 27. Salvi M, Morbiducci U, Amadeo F, Santoro R, Angelini F, Chimenti I, Massai D, Messina E, Giacomello A, Pesce M, Molinari F. Automated segmentation of fluorescence microscopy images for 3D cell detection in human-derived cardiospheres. *Sci Rep.* 2019;9(1):6644. doi: 10.1038/s41598-019-43137-2.
 28. Pati F, Jang J, Ha DH, Won Kim S, Rhee JW, Shim JH, Kim DH, Cho DW. Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink. *Nat Commun.* 2014;5:3935. doi: 10.1038/ncomms4935.
 29. Murphy SV, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol.* 2014;32(8):773–85. doi: 10.1038/nbt.2958.
 30. Hockaday LA, Kang KH, Colangelo NW, Cheung PY, Duan B, Malone E, Wu J, Girardi LN, Bonassar LJ, Lipson H, Chu CC, Butcher JT. Rapid 3D printing of anatomically accurate and mechanically heterogeneous aortic valve hydrogel scaffolds. *Biofabrication.* 2012;4(3):035005. doi: 10.1088/1758-5082/4/3/035005.
 31. Rajabi S, Pahlavan S, Ashtiani MK, Ansari H, Abbasaladeh S, Sayahpour FA, Varzideh F, Kostin S, Aghdami N, Braun T, Baharvand H. Human embryonic stem cell-derived cardiovascular progenitor cells efficiently colonize in bFGF-tethered natural matrix to construct contracting humanized rat hearts. *Biomaterials.* 2018;154:99–112. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.10.054.
 32. Duan B. State-of-the-art review of 3D bioprinting for cardiovascular tissue engineering. *Ann Biomed Eng.* 2017;45(1):195–209. doi: 10.1007/s10439-016-1607-5.
 33. Слотвицкий ММ, Цвелая ВА, Фролова ШР, Дементьева ЕВ, Агладзе КИ. Исследование функциональности получаемых из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток кардиомиоцитов для моделирования сердечных аритмий при синдроме удлиненного интервала QT. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2018;22(2):187–95. doi: 10.18699/VJ18.346. [Slotvitsky MM, Tsvelaya VA, Frolova SR, Dement'eva EV, Agladze KI. The study of the functionality of cardiomyocytes obtained from induced pluripotent stem cells for the modeling of cardiac arrhythmias based on long QT syndrome. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2018;22(2):187–95. Russian. doi: 10.18699/VJ18.346.
 34. Slotvitsky M, Tsvelaya V, Frolova S, Dementyeva E, Agladze K. Arrhythmogenicity Test Based on a Human-Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)-Derived Cardiomyocyte Layer. *Toxicol Sci.* 2019;168(1):70–7. doi: 10.1093/toxsci/kfy274.
 35. Kadota S, Minami I, Morone N, Heuser JE, Agladze K, Nakatsuji N. Development of a reentrant arrhythmia model in human pluripotent stem cell-derived cardiac cell sheets. *Eur Heart J.* 2013;34(15):1147–56. doi: 10.1093/eurheartj/ehs418.
 36. Agladze K, Kay MW, Krinsky V, Sarvazyan N. Interaction between spiral and paced waves in cardiac tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293(1):H503–13. doi: 10.1152/ajpheart.01060.2006.
 37. Orlova Y, Magome N, Liu L, Chen Y, Agladze K. Electrospun nanofibers as a tool for architecture control in engineered cardiac tissue. *Biomaterials.* 2011;32(24):5615–24. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.04.042.
 38. Yang J, Yamato M, Shimizu T, Sekine H, Ohashi K, Kanzaki M, Ohki T, Nishida K, Okano T. Reconstruction of functional tissues with cell sheet engineering. *Biomaterials.* 2007;28(34):5033–43. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.07.052.
 39. Williams C, Xie AW, Yamato M, Okano T, Wong JY. Stacking of aligned cell sheets for layer-by-layer control of complex tissue structure. *Biomaterials.* 2011;32(24):5625–32. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.04.050.
 40. Williams C, Tsuda Y, Iseberg BC, Yamato M, Shimizu T, Okano T, Wong JY. Aligned cell sheets grown on thermo-responsive substrates with microcontact printed protein patterns. *Advanced Materials.* 2009;21:2161–4. doi: 10.18699/vj18.346.
 41. Takahashi H, Okano T. Thermally-triggered fabrication of cell sheets for tissue engineering and regenerative medicine. *Adv Drug Deliv Rev.* 2019;138:276–92. doi: 10.1016/j.addr.2019.01.004.
 42. Stoehr A, Hirt MN, Hansen A, Seiffert M, Conradi L, Uebeler J, Limbourg FP, Eschenhagen T. Spontaneous formation of extensive vessel-like structures in murine engineered heart tissue. *Tissue Eng Part A.* 2016;22(3–4):326–35. doi: 10.1089/ten.TEA.2015.0242.
 43. Kaully T, Kaufman-Francis K, Lesman A, Levenberg S. Vascularization – the conduit to viable engineered tissues. *Tissue Eng Part B Rev.* 2009;15(2):159–69. doi: 10.1089/ten.teb.2008.0193.
 44. Sekine H, Shimizu T, Hobo K, Sekiya S, Yang J, Yamato M, Kurosawa H, Kobayashi E, Okano T. Endothelial cell coculture within tissue-engineered cardiomyocyte sheets enhances neovascularization and improves cardiac function of ischemic hearts. *Circulation.* 2008;118(14 Suppl):S145–52. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.757286.
 45. Sukmana I. Microvascular guidance: a challenge to support the development of vascularised tissue engineering construct. *ScientificWorldJournal.* 2012;2012:201352. doi: 10.1100/2012/201352.



46. Paez-Mayorga J, Hernández-Vargas G, Ruiz-Esparza GU, Iqbal HMN, Wang X, Zhang YS, Parra-Saldivar R, Khademhosseini A. Bioreactors for cardiac tissue engineering. *Adv Healthc Mater.* 2019;8(7):e1701504. doi: 10.1002/adhm.201701504.
47. Christalla P, Hudson JE, Zimmermann WH. The cardiogenic niche as a fundamental building block of engineered myocardium. *Cells Tissues Organs.* 2012;195(1–2):82–93. doi: 10.1159/000331407.
48. Hogan M, Chen YT, Kolhatkar AG, Candelari CJ, Madala S, Lee TR, Birla R. Conditioning of cardiovascular tissue using a noncontact magnetic stretch bioreactor with embedded magnetic nanoparticles. *CS Biomater Sci Eng.* 2016;2(9):1619–29. doi: 10.1021/acsbomaterials.6b00375.
49. Chauveau S, Brink PR, Cohen IS. Stem cell-based biological pacemakers from proof of principle to therapy: a review. *Cytotherapy.* 2014;16(7): 873–80. doi: 10.1016/j.jcyt.2014.02.014.
50. Morris GM, Kingston PA, Lei M, Dobrzynski H, Robinson RB, Boyett MR. A cardiac biopacemaker created by acceleration of a subsidiary pacemaker via adenovirus mediated expression of a chimaeric pacemaker channel, HCN212. *European Heart Journal.* 2010;31 Suppl 1:77.
51. Chauveau S, Anyukhovskiy EP, Ben-Ari M, Naor S, Jiang YP, Danilo P Jr, Rahim T, Burke S, Qiu X, Potapova IA, Doronin SV, Brink PR, Binah O, Cohen IS, Rosen MR. Induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes provide in vivo biological pacemaker function. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2017;10(5):e004508. doi: 10.1161/CIRCEP.116.004508.
52. Balashov VA, Agladze KI. Model implantation of photosensitive cells reveals necessary cluster size needed for pacing of the heart culture. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes.* 2018;50(6):524–5. doi: 10.1007/s10863-018-9775-7.
53. Balashov V, Chepeleva E, Tselaya V, Slotvitsky M, Pavlova S, Ponomarenko A, Dokuchaeva A, Vasilieva M, Krasilnikova A, Strelnikov A, Agladze K, Pokushalov E, Sergeevichev D. Use of Poly(lactic) nanofibrous scaffolds as a substrate for cardiomyocytes cultivation. *AIP Conference Proceedings.* 2018;2051(1):020024. doi: 10.1063/1.5083267.

Cell technologies in the regenerative medicine of the heart: main problems and ways of development

K.I. Agladze¹

The potential of heart tissues for self-regeneration is not high and supposedly limited to a small number of the niche stem cells. This makes it extremely important to develop regenerative technologies for the myocardium based on modern techniques, for instance, cell re-programming and 3D bioprinting. However, it is often difficult to differentiate the sensational reports regularly appearing in mass media on “breakthrough” technologies from those that really have practical applications. The article sets out a point of view on the popular technologies for the regeneration of cardiac tissues and myocardium as a whole and reviews their drawbacks. The main problems of the bioprinting approach being actively developed include a low differentiation level with printing by stem cells that does not allow for a full-fledged cardiac tissue without foreign inclusions, as well as technological impossibility, when printing with stem cells, to set up their links with other cells during cell delivery in their corresponding matrix locations. Despite some optimistic reports on the good performance on stem or induced pluripotent cells injections

into the myocardial injury zone that were first made public about 20 years ago, nowadays this idea seems rather doubtful, because in the recent years there has been virtually no positive effect of this procedure with a serious risk of complications. As far as growing of heart muscle elements is concerned, the main challenge is the development of the “proper” vascularization of the muscle being grown. At the same time, one has to emphasize practical feasibility of growing relatively small myocardial elements, such as sinus node.

Key words: myocardium, regeneration, stem cells, induced pluripotent stem cells, tissue engineering

For citation: Agladze KI. Cell technologies in the regenerative medicine of the heart: main problems and ways of development. *Almanac of Clinical Medicine.* 2019;47(7):623–9. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-043.

Received 25 June 2019; accepted 5 August 2019; published online 23 August 2019

Konstantin I. Agladze – PhD (in Physics and Mathematics), Professor, Head of the Laboratory of Biophysics of Excitable Systems¹; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9258-436X> ✉ 9 Institutskiy pereulok, Dolgoprudny, Moskovskaya oblast', 141701, Russian Federation. Tel.: +7 (495) 408 46 45. E-mail: kagladze@gmail.com

Conflict of interests

The author declares that he has no conflict of interest.

Acknowledgments

A proportion of the illustrations used in the article has been created as the results of the studies performed under the Russian Research Foundation grant No. 16-14-10091.

¹ Moscow Institute of Physics and Technology; 9 Institutskiy pereulok, Dolgoprudny, Moskovskaya oblast', 141701, Russian Federation