



Оригинальная статья

# Исследование формирования тканево-инженерного конструкта на основе кардиомиоцитов и матрикса различной степени анизотропии и жесткости

Щербина С.А.<sup>1</sup> • Шутько А.В.<sup>1</sup> • Низамиева А.А.<sup>1</sup> • Никитина А.В.<sup>1</sup> • Слотвицкий М.М.<sup>1</sup> • Цвеляя В.А.<sup>1,2</sup> • Агладзе К.И.<sup>1,2</sup>

**Щербина Серафима Артуровна** – студент магистратуры, инженер лаборатории биофизики возбудимых систем<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4223-0133>

**Шутько Ангелина Владимировна** – магистр, инженер лаборатории биофизики возбудимых систем<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1921-571X>

**Низамиева Айгуль Альфредовна** – аспирант, инженер лаборатории биофизики возбудимых систем<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7162-5214>

**Никитина Анна Владимировна** – магистр, инженер лаборатории биофизики возбудимых систем<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6462-7027>

**Слотвицкий Михаил Михайлович** – аспирант, инженер лаборатории биофизики возбудимых систем<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2237-4217>

**Цвеляя Валерия Александровна** – канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории биофизики возбудимых систем<sup>1</sup>; ст. науч. сотр. лаборатории молекулярной и клеточной диагностики<sup>2</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3554-9736>  
✉ 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2–8, Российская Федерация.  
Тел.: +7 (916) 950 23 05.  
E-mail: v.tsvelaya@monikiweb.ru

**Агладзе Константин Игоревич** – д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией биофизики возбудимых систем<sup>1</sup>; заведующий лабораторией молекулярной и клеточной диагностики<sup>2</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9258-436X>

В экспериментах *in vitro* в последнее десятилетие было установлено, что механические свойства подложек сильно влияют на эффективность дифференцировки индуцированных плюрипотентных и эмбриональных стволовых клеток и их развития в зрелый фенотип. Меняя механо-эластические и структурные характеристики подложки, можно повышать процентный выход дифференцировки стволовых клеток в кардиомиоциты. Цель данной работы состояла в изучении влияния изменения физических характеристик подложек на формирование фенотипических особенностей сердечных клеток. В задачи входило сравнение структурных свойств культивируемых слоев сердечной ткани, полученных при варьировании эластичности и структуры полимерных подложек. Результаты показали значительные различия в кальциевой активности и структурных особенностях кардиомиоцитов в зависимости от свойств подложки, а также существенное варьирование проведения возбуждения. В связи с тем что нарушения проведения в сердечной

ткани часто приводят к возникновению опасных сердечных аритмий, полученные данные предполагается использовать для определения группы пациентов с повышенным риском смерти от сердечной недостаточности.

**Ключевые слова:** кардиомиоцит, кардиальная дифференцировка, стволовые клетки, тканево-инженерные конструкции, оптическое картирование

**Для цитирования:** Щербина СА, Шутько АВ, Низамиева АА, Никитина АВ, Слотвицкий ММ, Цвеляя ВА, Агладзе КИ. Исследование формирования тканево-инженерного конструкта на основе кардиомиоцитов и матрикса различной степени анизотропии и жесткости. Альманах клинической медицины. 2021;49(6):365–374. doi: 10.18786/2072-0505-2021-49-036.

Поступила 11.05.2021; доработана 25.06.2021; принята к публикации 28.06.2021; опубликована онлайн 01.10.2021

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»; 140180, г. Долгопрудный, Институтский пер., 9, Российская Федерация

<sup>2</sup> ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»; 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация



**И**ндуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) позволяют с помощью направленной дифференцировки получать пациент-специфические кардиомиоциты, используемые затем для изучения физиологических/патофизиологических процессов в сердечной ткани. Полученные данные могут применяться для раскрытия механизмов возникновения сердечных аритмий и разработки новых методов лечения *in vitro*. Однако в настоящее время не решен вопрос о соответствии фенотипа сердечных клеток, получаемых направленной дифференцировкой из ИПСК, фенотипу зрелых клеток, складывающемуся при развитии сердца в течение жизни пациента. Одним из недостатков использования кардиальных слоев, получаемых из дифференцирующихся кардиомиоцитов, считается незрелый эмбрионоподобный функциональный фенотип, получаемый в стандартных условиях дифференцировки [1–3]. Зачастую электрофизиологическая функция монослоев из кардиомиоцитов, полученных с помощью направленной дифференцировки из ИПСК, используемых в настоящее время, характеризуется медленной скоростью распространения электрического импульса и незрелыми профилями потенциала действия. Ранее авторами были изучены электрофизические характеристики дифференцированных в кардиомиоциты клеток, в частности, профили потенциала действия и возможность формирования функционального синцития между ними. Полученный в работе после 30-го дня от начала дифференцировки фенотип кардиомиоцитов в настоящей статье мы условно называем зрелым [4, 5].

Изучение влияния внешних факторов на формирование *in vitro* сердечной ткани показало, что физическое окружение играет важную роль в дифференцировке стволовых клеток и их нормальном развитии. Недавние исследования продемонстрировали определяющее значение микроокружения для высокоэффективной дифференцировки в кардиомиоциты [1, 6, 7].

Цель данной работы состояла в изучении влияния изменения физических характеристик подложки на форму кардиомиоцитов и проведение ими электрического возбуждения.

В задачи работы входило:

- сравнение кальциевой активности и свойств проведения волн возбуждения по культивируемым слоям кардиомиоцитов, полученных при варьировании эластичности и структуры подложек;

- сравнение структурных особенностей, в том числе формы клеток, структуры цитоскелета отдельных кардиомиоцитов, кластерных форм клеточных образований для монослоев при их дифференцировке и формировании на подложках с различной эластичностью и анизотропной структурой.

Результаты данной работы показывают значительное различие клеточных фенотипов, их структурных и функциональных особенностей, таких как увеличение сократительной активности вследствие понижения анизотропии подложки; повышение равномерности распространения фронта волн возбуждения вследствие повышения анизотропии подложки; выравнивание клеток и клеточных структур вдоль волокон, влияющее на скорость и характер проведения волны возбуждения; увеличение скоростей проведения волн возбуждения с повышением жесткости полимерной подложки. Основным результатом работы следует признать определение зависимости получаемой формы клеток от окружающей степени анизотропии при формировании монослоев, полученных с помощью направленной дифференцировки из ИПСК в различных условиях: наиболее ровный фронт волны при ее распространении по образцу получался на стекле, покрытом белковым матриксом, наибольшая скорость проведения волны возбуждения достигалась на жесткой полимерной подложке.

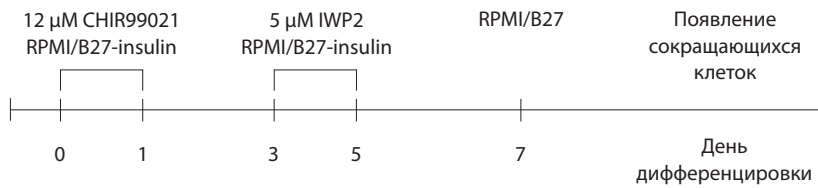
## Материал и методы

В данной работе применяли комплексный подход к изучению формирования монослоев кардиомиоцитов в зависимости от микроокружения. Были использованы следующие основные методы:

- клеточная дифференцировка и культивирование линии ИПСК, полученной от кардиально здорового пациента;
- создание подложек из полимерных волокон с помощью метода электроспиннинга, а также подложек из полидиметилсилоксановых (ПДМС)-мембран;
- белки/матрицы: создание подложек с различными адгезивными поверхностями (раствор фибронектина, Matrigel);
- оптическое картирование с использованием кальцийзависимых красителей.

Получение подложек различной степени жесткости

Подложки для культивирования клеток изготавливали из полимера полидиметилсилоксана



**Рис. 1.** Протокол для дифференцировки линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток iSMA6L в желудочковые кардиомиоциты [9, 10]

(ПДМС) путем смешивания двух жидких компонент: геля Sylgard 184 Base (Dow Corning) и эластомер Sylgard 184 (Dow Corning) в соотношении 10:1 по массе. Для создания подложек с другими механическими свойствами, в частности с меньшей степенью жесткости, смешивали приготовленный ранее и мягкий ПДМС в соотношениях 40/60 и 60/40 при аналогичном смешивании 10 частей данной основы с 1 частью эластомера Sylgard 184. Мягкая составляющая ПДМС готовилась путем смешивания равных масс двух частей – Sylgard 527 Part A и Sylgard 527 Part B (Dow Corning). После тщательного перемешивания в чашке Петри в течение 10 минут получившийся жидкий раствор равномерно распределяли в лунки 24-луночного планшета до полного их покрытия слоем около 3 мм. Затем планшет с нанесенными пленками ПДМС ставили в печь при 70 °C на 12–24 часа до полного отвердевания. Получившиеся подложки обрабатывали в стерильных условиях 70% этиловым спиртом и водой в течение часа, после чего подвергали ультрафиолетовому излучению также в течение часа. Для улучшения адгезивности подложки наносили раствор Matrigel (Corning, кат. № 356234, стоковая концентрация раствора 8 мг/мл) в течение 2 часов при комнатной температуре также в стерильных условиях.

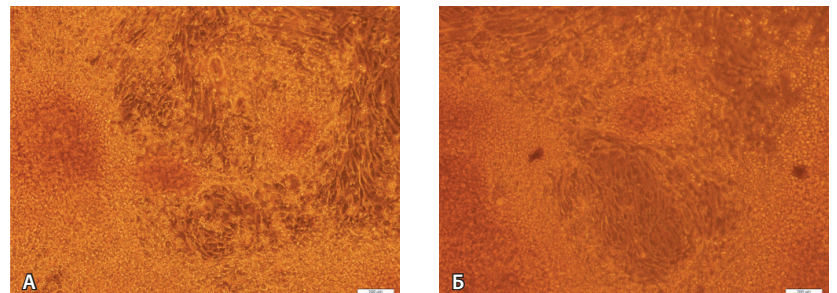
Получение подложек различной степени анизотропии

Раствор поликапролактона (англ. polycaprolactone, PCL) готовили путем растворения порошка PCL (440744, Sigma-Aldrich, США) в гексафторизопропанол в концентрации 10–15%. Приготовленный раствор подвергали электропрядению (электроспиннингу) на установке Nanon-01 (Mecс Co., Ltd) с приложенным напряжением между наконечником шприца и заземленным коллектором в диапазоне от 5 до 10 кВ. Его загружали в шприц на 3 мл и вводили через иглу с тупым концом 20-го калибра со скоростью потока 0,1–1 мл/ч при использовании программируемого шприцевого насоса Fusion 100

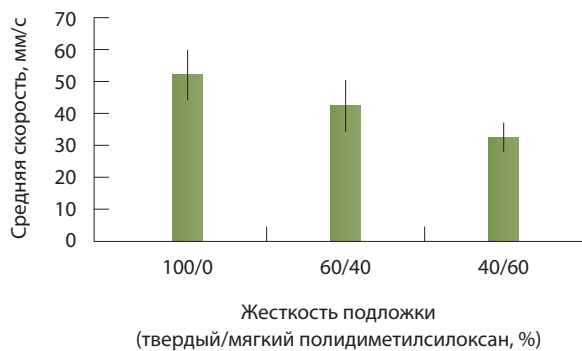
(Chemux Inc., Япония). Нановолокна электропрядили непосредственно на поверхность покровного стекла диаметром 15 мм, нанесенного на заземленный коллектор. Угловая скорость составляла 1000 об/мин. После завершения процесса электроспиннинга неадгезивные нановолоконные субстраты PCL обрабатывали ультрафиолетом и покрывали матриксом Matrigel (Corning, кат. № 356234) или Geltrex (Gibco, кат. № A1413301) для повышения их адгезивности.

Дифференцировка и ведение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

Культивирование ИПСК проходило на заранее подготовленных подложках из ПДМС, покрытых матриксом Matrigel в культивируемой среде E8 (Gibco, A1517001) в соответствии с протоколом [5]. Базовым протоколом для дифференцировки был протокол активации сигнального пути WNT/ $\beta$ -катенин с помощью CHIR99021 при его последующем ингибировании [4, 8–10]. Клеточная линия isma6L, используемая в работе, получена в Институте цитологии и генетики СО РАН от пациентов Национального медицинского исследовательского центра им. академика Е.Н. Мешалкина (г. Новосибирск). Апробация данной линии была опубликована ранее [4, 8]. Для дифференцировки ИПСК в кардиомиоциты был осуществлен подбор протокола для линии isma6L (рис. 1). За основу для модификаций протоколов направленной дифференцировки ИПСК в кардиомиоциты взяли опубликованный ранее протокол [9, 10]. Для проверки селективности кардиомиоцитов, полученных из ИПСК данной линии как чистой популяции клеток, выполнялась метаболическая селекция полученных дифференцированных клеток в течение 5–7 дней [10] в среде RPMI 1640 без глюкозы с лактатом.



**Рис. 2.** Микроскопические изображения структуры колоний индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, дифференцирующихся в кардиомиоциты, на подложках различной жесткости: **А** – слой кардиомиоцитов на 25-й день дифференцировки на подложке полидиметилсилоксана 60/40; **Б** – слой кардиомиоцитов на 27-й день дифференцировки на 100% твердом полидиметилсилоксане (100/0);  $\times 10$



**Рис. 3.** Зависимость значений средней скорости проведения волны возбуждения (мм/с) при стимуляции в 1 Гц по слою кардиомиоцитов, полученных в процессе дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в кардиомиоциты на матрице полидиметилсилоксана разного состава, от жесткости подложки

#### Метаболическая селекция

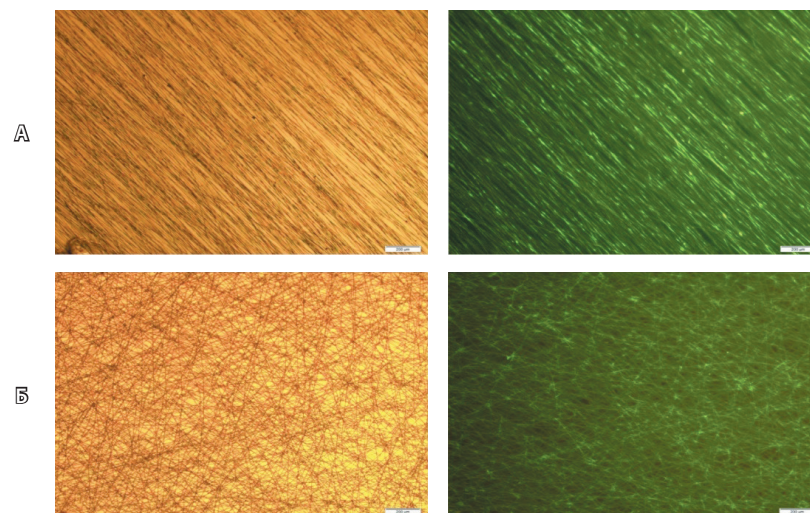
Для снятия электрофизиологических характеристик с дифференцирующихся клеток и экспериментов по формированию монослоев, последние в процессе дифференцировки рассаживают с помощью раствора Версена на подложки, перечисленные выше. Для выделения чистой популяции кардиомиоцитов начиная от 2 дней после пересадки в течение 7–10 дней была протестирована метаболическая селекция, при которой кардиомиоциты в процессе дифференцировки культивируются в лактозной среде RPMI 1640 без D-глюкозы (Thermo Fisher Scientific, США), содержащей 213 мкг/мл L-аскорбиновой кислоты 2-фосфат сесквимагний соль гидрата (Sigma-Aldrich, США), 500 мкг/мл рекомбинантного альбумина человека, экспрессированного в *oryza sativa* (Sigma-Aldrich, США), и 5 мМ DL-лактата натрия (L4263, Sigma-Aldrich, США). Данный метод показал увеличение на 20% эффективности экспериментов для измерения электрофизиологических характеристик (потенциала действия, токов) для одиночных рассаживаемых кардиомиоцитов, а также улучшение формирования синцития после пересадки дифференцирующихся в кардиомиоциты клеток, так как зрелыми кардиомиоцитами можно считать к 40-му дню от начала дифференцировки [5] и перевода на сывороточную среду согласно протоколу [10].

#### Оптическое картирование

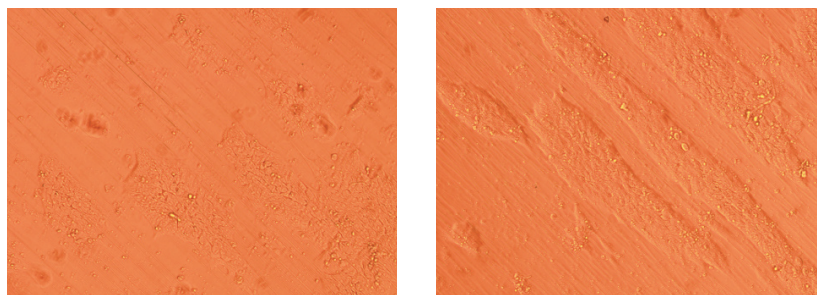
После направленной дифференцировки ИПСК в монослой кардиомиоцитов на различных подложках изучали проведение волны

возбуждения. День эксперимента отсчитывается от начала дифференцировки. Следующий протокол описывает процедуру оптического картирования волны возбуждения:

- образец инкубировали при температуре 37 °C от 30 минут до часа с кальций-зависимым флуоресцентным красителем Fluo-4 (Invitrogen, F14201) в концентрации 4 мкг/мл;
- по истечении времени данный раствор заменяли на солевой раствор Тироде (Sigma-Aldrich Co., США, T2145-10L с pH 7,25) той же температуры. Сам образец помещали на термопластинку для поддержания физиологической температуры;
- визуализация сигнала, сопутствующего возбуждению клеток, и запись видео производились при помощи системы Olympus MVX10 MacroView и камеры с высоким



**Рис. 4.** Различные типы волокон, полученных с помощью электроспиннинга: **А** – направленно ориентированные волокна, полученные с помощью щелевого коллектора (анизотропная нановолоконная подложка); **Б** – хаотически расположенные волокна, полученные без щелевого коллектора (изотропная нановолоконная подложка). Волокна покрашены флуоресцентным красителем;  $\times 10$



**Рис. 5.** Колонии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток на 2-й день после рассадки (1:5), посаженные на направленно ориентированные (выровненные) волокна;  $\times 10$



пространственным и временным разрешением Andor EMCCD Camera 897-U (512 × 512, 130 кадров в секунду);

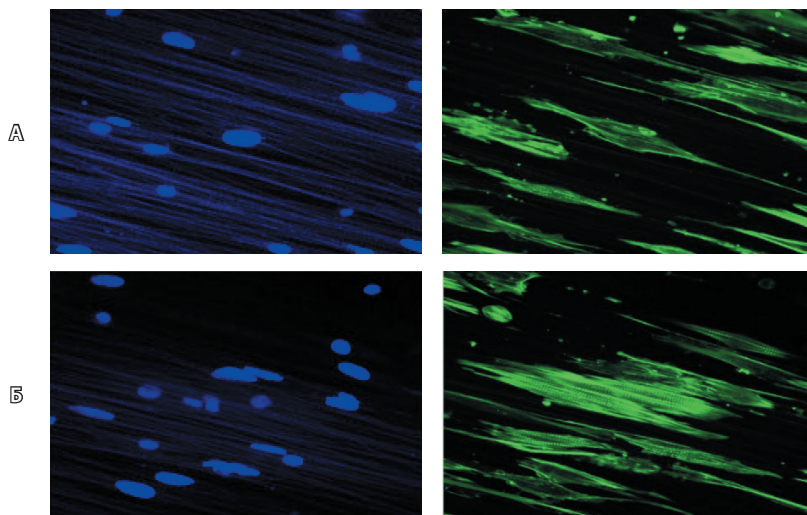
- стимуляция кардиослоев проводилась точечным электродом с разными частотами возбуждения от 1 до 5 Гц;
- для последующей обработки видео использовали программу ImageJ и ее плагины (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Отметим: эксперимент не должен длиться более 30 минут, так как при превышении этой

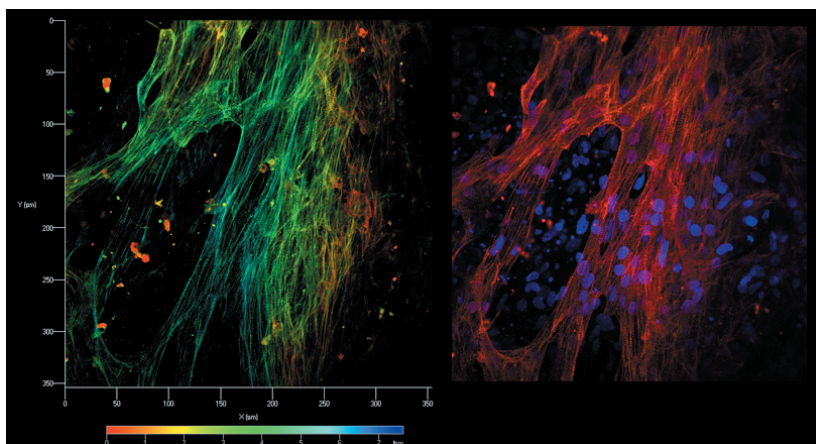
временной нормы возможно повреждение клеток или нарушение их дальнейшего развития. После картирования и промывки образец снова заливали средой RPMI 1640 + B-27 Supplement (Gibco, 17504044) и помещали обратно в инкубатор до следующих экспериментов.

#### Иммуноцитохимический анализ

Для исследования морфологии культуры получаемых в процессе дифференцировки кардиомиоцитов образцы после картирования фиксировались с помощью 4% параформальдегида и окрашивались на специфичный сократительному аппарату кардиомиоцитов белок  $\alpha$ -актинин, актиновые филаменты и ДНК клеток. Для этого использовали антитела – первичное на  $\alpha$ -актинин (monoclonal anti- $\alpha$ -actinin (sarcomeric) antibody produced in mouse, Sigma (1:1000) и вторичное (anti-mouse Alexa Fluor 594 (ab') 2 fragment of Goat anti-mouse IgG (H+L), Sigma 1:2000), а также неспецифичные красители Alexa Fluor 488 Phalloidin Conjugate (Invitrogen, A12379) и DAPI (Thermo Scientific, 62248). Исследование проводили на сканирующем конфокальном микроскопе LSM 710 (Zeiss, Германия) с помощью встроенных режимов на лицензионном программном обеспечении Zeiss. Сигналы от каждой флуоресцентной метки регистрировались в соответствующем диапазоне длин волн. Затем каналы были условно обозначены цветами и объединены.



**Рис. 6.** Кардиомиоциты, посаженные на направленные волокна, вытянутые вдоль волокна: **А** – посадка 100 000 клеток на лунку ( $d = 15$  мм); **Б** – посадка 50 000 клеток. На рисунке представлены полипролактоновые волокна (синим цветом обозначены ядра клеток и волокна, зеленым – F-актин в клетках);  $\times 10$



**Рис. 7.** Конфокальное изображение иммуноцитохимической окраски кардиальных тяжей, полученных в процессе дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в кардиомиоциты на направленных волокнах. Красным указан маркер кардиомиоцитов  $\alpha$ -актинин, зеленым – F-актин, синим – ядра клеток. С помощью цвета также обозначено пространственное расположение тяжей: от красного (ближе) к синему (дальше);  $\times 40$

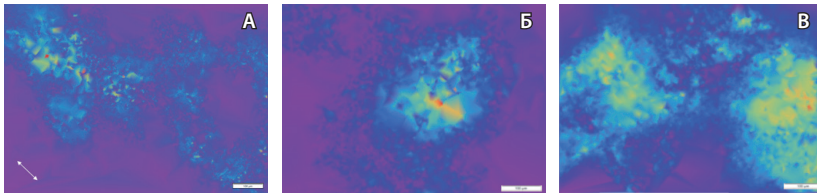
## Результаты

Результаты работы можно условно разделить на 2 части:

- исследование влияния жесткости подложки и матрикса Matrigel на формирование кардиального синцития при направленной дифференцировке ИПСК в кардиомиоциты;
- исследование влияния анизотропии на формирование кардиального синцития при направленной дифференцировке ИПСК в кардиомиоциты.

Исследование влияния жесткости подложки и матрикса на формирование кардиального синцития

В первую очередь было проведено исследование влияния жесткости подложки и матрикса на формирование кардиального синцития при направленной дифференцировке ИПСК в кардиомиоциты. Показано значительное различие при формировании монослоев кардиомиоцитов на подложках с различными свойствами. Для

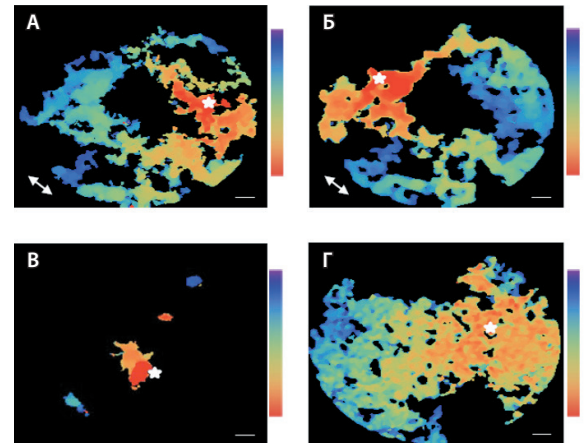


**Рис. 8.** Карты сжатия для кардиомиоцитов, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток на анизотропном (А) и изотропном (Б) нановолоконных каркасах, а также стекле (В) (все подложки обработаны Matrigel). Цветовая функция отображает локальные скорости смещения во время сокращения (мкм/с). Стрелка показывает ориентацию анизотропных волокон

повышения адгезивности с поверхностью дифференцирующихся колоний ИПСК тестировали различные матриксы и белки – человеческий фибронектин, Matrigel и Geltrex. Результаты показали, что при дифференцировке или последующей рассадке на культуральном пластике, покрытом матриксом Matrigel, формирование кардиослоев происходило эффективнее в 90% образцов, общая электрофизиологическая зрелость кардиомиоцитов наблюдалась на 50–54-й день после начала дифференцировки [5]. При сравнении матриксов Matrigel и Geltrex первый показывал лучшие результаты с точки зрения получаемых кардиальных синцитиев и проведения волн возбуждения.

Исследование выполняли также в зависимости от разной степени жесткости подложки. Для этого был использован полимер ПДМС в разных пропорциях базового полимера. Условно ПДМС обозначали по процентному содержанию компонент базового полимера (твердый к мягкому). Например, ПДМС 60/40 означало 60% более твердой базы с 40% мягкой компоненты. На заранее подготовленных таким образом планшетах с разной жесткостью ПДМС, покрытого Matrigel, проводили культивирование ИПСК и последующую направленную дифференцировку ИПСК в кардиомиоциты. На рис. 2 показаны слои кардиомиоцитов, полученных на ПДМС различной жесткости на 25–27-й день от начала дифференцировки, что говорит о различии получаемых структур, образуемых клетками на таких подложках. Для каждого планшета существовал контроль на культуральном пластике. Первые сокращения наблюдались не в контроле на культуральном пластике, а на самом твердом ПДМС (100/0) на 8-й день, через 6–9 часов после добавления последнего компонента среды по протоколу.

Оптическое картирование для самого жесткого ПДМС (100/0) проводили на 23-й день, для ПДМС 60/40 – на 22-й день, для ПДМС



**Рис. 9.** Активационные карты оптического картирования, полученные при стимуляции 1 Гц монослоев кардиомиоцитов, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, на 50-й день от начала дифференцировки на различных подложках: А и Б – на анизотропных подложках, В – на изотропной подложке, Г – на стекле, покрытом матриксом Geltrex. Звездочкой обозначены места стимуляции образцов точечным электродом, стрелками указано направление волокон в случае их направленности. Образцы визуально сократимы, но функционально клетки разобщены в зависимости от степени анизотропии в сравнении 9А и 9В. Электротоническое возбуждение составляло менее 0,2 мм;  $\times 1,6$

40/60 – также на 22-й день. Скорость проведения волны возбуждения составляла для ПДМС 100/0 около 52,33 мм/с, для ПДМС 60/40 около 42,6 мм/с, для ПДМС 40/60 примерно 32,67 мм/с. Погрешности и скорости указаны на рис. 3. Согласно статье [5], на 22–24-й день скорость составляет 40% от максимальной у созревшего слоя кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК, что близко по значениям к скоростям на реальной сердечной ткани. Полученные данные по скоростям на данных подложках позволяют констатировать, что при дифференцировке ИПСК в кардиомиоциты на подложке из самого жесткого ПДМС (100/0) имеется преимущество в скорости проведения волны возбуждения по такому слою по сравнению с контролем на культуральном пластике.

Исследование влияния структуры подложек (анизотропии) на характеристики сердечных слоев

С целью поиска оптимальной подложки для дифференцировки ИПСК в кардиомиоциты изучали модели анизотропных и изотропных образцов культивированных кардиальных слоев, полученных с помощью нановолоконных полимерных (PCL) подложек с различной степенью анизотропии (рис. 4). Данный поиск был



необходим для создания условий лучшего формирования функционального синцития кардиомиоцитов в процессе дифференцировки, а также для исследования влияния анизотропии на проведение возбуждения. Таким образом, определено 4 типа подложек, представляющие собой: 1) направленно ориентированные или выровненные волокна (рис. 4А); 2) хаотически расположенные волокна (рис. 4Б); 3) стекло; 4) культуральный пластик. Все четыре вида подложек покрывали матриксом Matrigel для улучшения роста клеток.

После посадки ИПСК на 2-й тип подложки колонии ИПСК располагались примерно таким же образом, как и на культуральном пластике, не образуя упорядоченных структур, при этом формируя конфлюэнтный слой. Однако при посадке ИПСК на направленные волокна (1-й тип подложки) колонии имели вытянутую форму и формировались вдоль волокон, как показано на рис. 5. На полученных волокнах конфлюэнтный монослой формировался в 2 раза медленнее, чем на подложках из культурального пластика и стекла.

Если проводить рассадку кардиомиоцитов на выровненные волокна, можно также увидеть вытягивание их цитоскелета вдоль волокон (рис. 6). Некоторые кардиомиоциты образуют кластеры, их кальциевая активность и сокращения распространяются по направлению волокон быстрее, чем поперек волокнистой структуры.

В процессе дифференцировки на направленных волокнах кардиомиоциты начинают формировать тяжи. Их расположение также направлено вдоль волокон, как показано на рис. 7.

Последними при дифференцировке стали проявлять сокращения клетки на изотропных образцах, то есть хаотичных волокнах. Там же наблюдались наиболее несинхронные сокращения и неоднородность распределения сокращающихся тяжей и кластеров кардиомиоцитов, полученных при направленной дифференцировке. Самые активные сокращения регистрировали на культуральном пластике, что можно наблюдать на картах сокращений (рис. 8).

Формирование функционального проводящего синцития протекало на всех подложках по-разному, что соотносится с работой [11]. На изотропной подложке (хаотичных волокнах) данный процесс почти не наблюдался. Клетки группировались в кластеры и сокращались в них, не соединяясь друг с другом. Было проведено оптическое картирование образцов на разных подложках после 50-го дня от

начала дифференцировки (рис. 9). Как показано на рис. 9В, при точечной стимуляции образца на изотропной подложке происходило возбуждение лишь соседних с электродом клеток, волна возбуждения не распространялась. На рис. 9А и 9Б показаны активационные карты образцов на анизотропной подложке, то есть на направленных волокнах. Как видно из рисунков, в данном случае возбуждение распространялось крайне неравномерно. Быстрее волна возбуждения распространялась вдоль направления волокон, наиболее равномерно – на образцах с подложкой из стекла и культурального пластика. При сравнении активационных карт обнаружили, что наиболее однородный монослой из дифференцированных в кардиомиоциты клеток формируется на культуральном пластике с Matrigel.

#### Метаболическая селекция

Для выделения чистой популяции кардиомиоцитов через несколько дней (от 2 дней) после пересадки в течение 7–10 дней была протестирована метаболическая селекция, при которой кардиомиоциты в процессе дифференцировки культивируются в лактозной среде RPMI 1640 без D-глюкозы (Thermo Fisher Scientific, США), содержащей 213 мкг/мл L-аскорбиновой кислоты 2-фосфат сесквиамгний соль гидрата (Sigma-Aldrich, США), 500 мкг/мл рекомбинантного альбумина человека, экспрессированного в *oryza sativa* (Sigma-Aldrich, США), и 5 мМ DL-лактата натрия (L4263, Sigma-Aldrich, США). Данный метод показал увеличение результативности экспериментов на 20% для одиночных кардиомиоцитов, а также улучшение формирования синцития после пересадки дифференцирующихся клеток и перевода на сывороточную среду.

#### Обсуждение

Свойства окружения, безусловно, играют важную роль при формировании клеточных структур. В частности, подложки для культивируемых кардиослоев при их формировании *in vitro* выполняют функцию, аналогичную внеклеточному матриксу *in vivo*. В представленной работе было показано, что варьирование жесткости подложки изменяет скорость проведения волны возбуждения. При этом скорость увеличивается с повышением жесткости подложки. Дальнейшие исследования могут определить оптимальную жесткость для создания зрелого фенотипа кардиомиоцита *in vitro*, наиболее соответствующего



фенотипу клеток сердца пациента, что, в свою очередь, позволит осуществить разработку эффективной экспериментальной платформы для исследования пациентспецифичного действия фармацевтических препаратов и кардиотоксичности. Под зрелым фенотипом кардиомиоцитов в представленной статье подразумевается фенотип желудочкового кардиомиоцита, имеющего сформированный потенциал действия, характерный для взрослого кардиомиоцита, сформированные токи и уже прошедший период развития межклеточных связей для образования электрического синцития на 50–54-й день от начала дифференцировки [4, 5, 12].

Отметим: в работе был исследован класс менее жестких подложек, на которых ряд авторов наблюдали мощные синхронные сокращения слоя клеток. Нами такого эффекта обнаружено не было, что вступает в противоречие с работой [13].

Мы также отметили эффект организации дифференцирующихся клеток в тягеподобные волоконные структуры. Точный биологический механизм такого выравнивания неизвестен. На наш взгляд, это может быть связано с известным свойством усиления актинового цитоскелета в ответ на внешнюю силу, то есть при анизотропии актиновые нити ремоделируются под действием приложенного напряжения, полученного в результате натяжения подложки-волокна, стабилизируя весь клеточный комплекс [14]. Натяжение является максимальным, если актиновые филаменты выровнены друг с другом, что обуславливает предпочтение межклеточного выравнивания цитоскелетов. Такое выравнивание лучше всего описывается гамильтоновой механикой и, например, в клеточной модели Поттса выглядит следующим образом [15]:

$$H = H_{adhesive} + H_{elastic} + H_{protr} + H_{nuclei} + H_{junctions}$$

где  $H_{adhesive}$  – гамильтониан взаимодействия клеток с подложкой (адгезия);  $H_{elastic}$  – гамильтониан, описывающий эластичные свойства мембраны и постоянство объема клетки;  $H_{protr}$  – гамильтониан, описывающий динамику выпячивания сердечных клеток, которая создает характерные многоугольные формы этих клеток;  $H_{nuclei}$  – гамильтониан, описывающий более высокую с математической точки зрения жесткость ядер по сравнению с телом клетки;  $H_{junctions}$  – гамильтониан, описывающий стабильность адгезионных соединений и выравнивание цитоскелетов соседних клеток.

В рамках последнего гамильтониана описывается сила, под действием которой происходит образование тягеподобных структур и их стабилизация. Несмотря на то что данный эффект не продемонстрировал лучших электрофизиологических характеристик по сравнению с обычными изотропными условиями дифференцировки, результат может быть полезен для регенеративной медицины с точки зрения места волоконной архитектуры в тканевой инженерии сердца.

## Заключение

Кардиомиоциты, получаемые из ИПСК, позволяют реализовать идею постоянного пациентспецифичного источника кардиальных клеток. Доступность ИПСК даст возможность разработать улучшенные платформы для тестирования фармацевтических препаратов и моделирования патологий, а также внедрить методы клеточной терапии и трансплантации выращенных тканей. В данной работе была успешно проведена попытка повышения качества получаемых клеточных структур путем изучения проведения волн возбуждения по ним. Формирование кардиальных слоев из дифференцируемых ИПСК варьировалось различным микроокружением клеток. Результаты предполагают улучшение структурных и электрофизиологических свойств кардиомиоцитов в условиях разных свойств клеточной микросреды, которые были измерены с помощью визуализированной волны возбуждения широко используемого [5, 16] кальцийзависимого красителя.

Итоги данной работы показывают значительные различия при формировании функционального электромеханического синцития в процессе дифференцировки ИПСК в кардиомиоциты. Среди особенностей можно выделить следующие:

- увеличение сократительной активности вследствие понижения анизотропии подложки;
- повышение равномерности распространения фронта волн вследствие повышения анизотропии подложки возбуждения;
- выравнивание клеток и клеточных структур вдоль волокон, влияющее на скорость и характер проведения волны возбуждения;
- увеличение скоростей проведения волн возбуждения с повышением жесткости полимерной подложки.

Основным результатом работы следует признать определение зависимости получаемых электрофизиологических свойств проведения





волн возбуждения от микроокружения клеток при формировании монослоев во время направленной дифференцировки из ИПСК. Полученные данные могут быть использованы для ранней

диагностики и моделирования патологий в процессе эмбриогенеза сердца и в регенеративной медицине, в частности клеточной терапии постинфарктных рубцов. ©

## Дополнительная информация

### Финансирование

Финансирование осуществлялось ГБУЗ МО МОНКИ им. М.Ф. Владимирского и МФТИ за счет бюджетных средств.

### Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

### Участие авторов

С.А. Щербина – подготовка подложек из полидиметилсилоксана для клеточных линий, ведение и дифференцировка индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, проведение экспериментов по оптическому картированию, написание текста; А.В. Шутько – разработка дизайна исследования, подготовка подложек с разной степенью анизотропии, анализ и интерпретация результатов исследования, написание текста; А.А. Низамиева – проведение экспериментов по оптическому картированию, анализ и интерпретация результатов исследования, написание и редактирование текста; А.В. Никитина – подготовка подложек с разной степенью анизотропии, проведение иммуноцитохимического анализа, анализ результатов,

редактирование рукописи; М.М. Слотвицкий – разработка дизайна проекта, ведение и дифференцировка индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, проведение экспериментов по оптическому картированию, анализ и интерпретация результатов исследования, написание текста; В.А. Цвеляя – концепция исследования, дизайн экспериментальной части исследования, проведение иммуноцитохимического анализа, анализ результатов, написание и редактирование текста; К.И. Агладзе – концепция исследования, концепция и дизайн статьи, редактирование текста, утверждение итогового варианта текста рукописи. Все авторы прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией, согласны нести ответственность за все аспекты работы и гарантируют, что ими надлежащим образом были рассмотрены и решены вопросы, связанные с точностью и добросовестностью всех частей работы.

### Благодарности

Выражаем благодарность за помощь в работе всему коллективу лаборатории биофизики возбудимых систем МФТИ, а также ГБУЗ МО МОНКИ за финансовую поддержку.

## Литература / References

- Besser RR, Ishahak M, Mayo V, Carbonero D, Claire I, Agarwal A. Engineered Microenvironments for Maturation of Stem Cell Derived Cardiac Myocytes. *Theranostics*. 2018;8(1): 124–140. doi: 10.7150/thno.19441.
- Mummery CL, Zhang J, Ng ES, Elliott DA, Elfantay AG, Kamp TJ. Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes: a methods overview. *Circ Res*. 2012;111(3):344–358. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.227512.
- Lundy SD, Zhu WZ, Regnier M, Laflamme MA. Structural and functional maturation of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev*. 2013;22(14):1991–2002. doi: 10.1089/scd.2012.0490.
- Slotvitsky M, Tselaya 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):70–77. doi: 10.1093/toxsci/kfy274.
- Slotvitsky MM, Tselaya VA, Podgurskaya AD, Agladze KI. Formation of an electrical coupling between differentiating cardiomyocytes. *Sci Rep*. 2020;10(1):7774. doi: 10.1038/s41598-020-64581-5.
- Herron TJ, Rocha AM, Campbell KF, Ponce-Balbuena D, Willis BC, Guerrero-Serna G, Liu Q, Klos M, Musa H, Zarzoso M, Bizy A, Furness J, Anumonwo J, Mironov S, Jalife J. Extracellular Matrix-Mediated Maturation of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Monolayer Structure and Electrophysiological Function. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2016;9(4):e003638. doi: 10.1161/CIRCEP.113.003638.
- LaBarge W, Mattappally S, Kannappan R, Fast VG, Pretorius D, Berry JL, Zhang J. Maturation of three-dimensional, hiPSC-derived cardiomyocyte spheroids utilizing cyclic, uniaxial stretch and electrical stimulation. *PLoS One*. 2019;14(7):e0219442. doi: 10.1371/journal.pone.0219442.
- Слотвицкий ММ, Цвеляя ВА, Фролова ШР, Деметьева 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):187–195. doi: 10.18699/VJ18.346. [Slotvitsky MM, Tselaya 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):187–195. Russian. doi: 10.18699/VJ18.346.]
- Lian X, Zhang J, Azarin SM, Zhu K, Hazeltine LB, Bao X, Hsiao C, Kamp TJ, Palecek SP. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling under fully defined conditions. *Nat Protoc*. 2013;8(1):162–175. doi: 10.1038/nprot.2012.150.
- Burridge PW, Matsa E, Shukla P, Lin ZC, Churko JM, Ebert AD, Lan F, Diecke S, Huber B, Mordwinkin NM, Plews JR, Abilez OJ, Cui B, Gold JD, Wu JC. Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat Methods*. 2014;11(8):855–860. doi: 10.1038/nmeth.2999.
- Цвеляя ВА. Тканевая инженерия сердца как средство для исследования фундаментальных процессов возникновения реентри [диссертация]. Долгопрудный; 2019. 164 с. [Tselaya VA. [Heart tissue engineering as a tool to study fundamental process of the re-entry generation: PhD dissertation]. Dolgoprudny; 2019. 164 p. Russian.]
- Tselaya VA, Gams A, Aziz J, Efimov IR. Induced pluripotent stem-cell-derived cardiomyocytes (iPSC-CMs): novel diagnostic platform. In: Haider KH, Aziz SM. *Stem Cells – from Hype to Real Hope*. Berlin: De Gruyter; 2018.
- Zhang F, Qu K, Li X, Liu C, Ortiz LS, Wu K, Wang X, Huang N. Gelatin-based hydrogels combined with electrical stimulation to modulate neonatal rat cardiomyocyte beating and



promote maturation. *Bio-Design and Manufacturing*. 2021;4(1):100–110. doi: 10.1007/s42242-020-00100-9.

14. Schoen I, Pruitt BL, Vogel V. The Yin-Yang of Rigidity Sensing: How Forces and Mechanical Properties Regulate the Cellular Response to Materials. *Annual Review of Materials Re-*

*search*. 2013;43(1):589–618. doi: 10.1146/anurev-matsci-062910-100407.

15. Kudryashova N, Nizamieva A, Tselaya V, Panfilov AV, Agladze KI. Self-organization of conducting pathways explains electrical wave propagation in cardiac tissues with high fraction of non-conducting cells. *PLoS Comput*

*Biol*. 2019;15(3):e1006597. doi: 10.1371/journal.pcbi.1006597.

16. 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):1147–1156. doi: 10.1093/eurheartj/ehs418.

## Investigation of the formation of cardiac tissue on substrates of varying degrees of anisotropy and rigidity

S.A. Shcherbina<sup>1</sup> • A.V. Shutko<sup>1</sup> • A.A. Nizamieva<sup>1</sup> • A.V. Nikitina<sup>1</sup> • M.M. Slotvitsky<sup>1</sup> • V.A. Tselaya<sup>1,2</sup> • K.I. Agladze<sup>1,2</sup>

In the last decade, *in vitro* experiments have shown that mechanical properties of the bases could markedly influence the efficacy of differentiation of the induced pluripotent and embryonic stem cells and their development into the mature phenotype. By changing of mechanical, elastic and structural characteristics of the base, it is possible to increase the percentage of stem cells that differentiate to cardiomyocytes.

The study was aimed at evaluation of the effects induced by changing physical characteristics of the base on the formation of phenotypic characteristics of cardiac cells. This included the comparison of structural properties of the cultured layer of heart tissue obtained by changing of elasticity and structure of polymeric bases. The results showed significant differences in calcium activity and structural characteristics of cardiomyocytes depending on the base properties, as well as

significant variation in the excitation conduction. As long as conduction abnormalities in the heart tissues can often lead to occurrence of life-threatening cardiac arrhythmias, the results can be used to determine patient groups at increased risk of death from heart failure.

**Key words:** cardiomyocyte, cardiac differentiation, stem cells, tissue engineered constructions, optic mapping

**For citation:** Shcherbina SA, Shutko AV, Nizamieva AA, Nikitina AV, Slotvitsky MM, Tselaya VA, Agladze KI. Investigation of the formation of cardiac tissue on substrates of varying degrees of anisotropy and rigidity. *Almanac of Clinical Medicine*. 2021;49(6):365–374. doi: 10.18786/2072-0505-2021-49-036.

Received 11 May 2021; revised 25 June 2021; accepted 28 June 2021; published online 1 October 2021

**Serafima A. Shcherbina** – Master's Student, Engineer, Laboratory of Biophysics of Excitable Systems<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4223-0133>

**Angelina V. Shutko** – Master, Engineer, Laboratory of Biophysics of Excitable Systems<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1921-571X>

**Aygul A. Nizamieva** – Postgraduate Student, Engineer, Laboratory of Biophysics of Excitable Systems<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7162-5214>

**Anna V. Nikitina** – Master, Engineer, Laboratory of Biophysics of Excitable Systems<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6462-7027>

**Mikhail M. Slotvitsky** – Postgraduate Student, Engineer, Laboratory of Biophysics of Excitable Systems<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2237-4217>

**Valeria A. Tselaya** – PhD (in Biol.), Research Fellow, Laboratory of Biophysics of Excitable Systems<sup>1</sup>; Senior Research Fellow, Laboratory of Molecular and Cell Diagnostics<sup>2</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3554-9736>

✉ 61/2–8 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation. Tel.: +7 (916) 950 23 05. E-mail: v.tselaya@monikiweb.ru

**Konstantin I. Agladze** – Doctor of Biol. Sci., Professor, Head of Laboratory of Biophysics of Excitable Systems<sup>1</sup>; Head of Laboratory of Molecular and Cell Diagnostics<sup>2</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9258-436X>

### Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this article.

### Authors' contributions

S.A. Shcherbina, preparation of the polydimethylsiloxane base for cell lines, management and differentiation of the induced pluripotent stem cells, optic mapping experiments, text writing; A.V. Shutko, design of the study, preparation of the substrates with various degrees of anisotropy, analysis and interpretation of the study results, text writing; A.A. Nizamieva, optic mapping experiments, analysis and interpretation of the study results, text writing and editing; A.V. Nikitina, preparation of the substrates with various degrees of anisotropy, immunocytochemical analysis, analysis of the results, text editing; M.M. Slotvitsky, design of the project, management and differentiation of the induced pluripotent stem cells, optic mapping experiments, analysis and interpretation of the study results, text writing; V.A. Tselaya, concept of the study, design of experimental part of the study, immunocytochemical analysis, analysis of the results, text writing and editing; K.I. Agladze, the study concept, the paper concept and design, text editing, approval of the final version of the manuscript. All the authors have read and approved the final version of the manuscript before submission, agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work have been appropriately investigated and resolved.

### Acknowledgements

The authors would like to acknowledge all staff of the Laboratory of Biophysics of Excitable Systems (MIPT) for its assistance for the study and MONIKI for its financial support.

<sup>1</sup> Moscow Institute of Physics and Technology; 9 Institutskiy per., Dolgoprudny, 140180, Russian Federation

<sup>2</sup> Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI); 61/2 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation