

На правах рукописи

Балашов Виктор Андреевич

**РАЗРАБОТКА БИОМИМЕТИЧЕСКИХ МОДЕЛЕЙ
СЕРДЕЧНОЙ ТКАНИ *IN VITRO***

Специальность 03.01.02 —
«Биофизика»

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Пушино — 2020

Работа выполнена в Лаборатории биофизики возбудимых систем ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)».

Научный руководитель: кандидат физико-математических наук
Агладзе Константин Игоревич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, доцент,
Гришин Сергей Николаевич,
проф. кафедры медицинской и биологической физики с информатикой и медицинской аппаратурой ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет Минздрава России»,

кандидат биологических наук,
Сафонова Любовь Александровна,
н.с. лаборатории бионанотехнологий ФГБУ «НМИЦ трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова»

Ведущая организация: ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н. В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы»

Защита состоится 22 декабря 2020 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 002.093.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук» по адресу: 142290, г.Пушино Московской обл., ул. Институтская, 3 .

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной библиотеке ПНЦ РАН по адресу: 142290, г.Пушино Московской обл., ул. Институтская, 3, и на сайте ИТЭБ РАН: <http://iteb.ru>.

Автореферат разослан «____» _____ 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
Д 002.093.01,
кандидат физ.-мат. наук

Ланина Надежда Фёдоровна

Общая характеристика работы

Актуальность темы.

Тканевая инженерия направлена на создание принципиально новых методов терапии ряда патологических состояний, вызванных нарушением структуры мягких тканей (Langer R. et al., 1993, Goyena R. et al., 2019). К таким патологиям относится инфаркт миокарда, в результате возникновения которого некротизируется и поражается фиброзом участок сердечной мышцы (Leon V. et al., 2015). Подходы тканевой инженерии сердца включают в себя создание искусственной сердечной ткани *in vitro* с возможностью имплантации пациенту или создание эффективных систем доставки клеток в нужный участок органа с формированием требуемой ткани в месте инъекции. Другой важной задачей тканевой инженерии является создание моделей органов для исследования их физиологии и патологии *in vitro*.

Типичная ткане-инженерная конструкция состоит из клеток, биосовместимого материала и сигнальных молекул (Qasim M. et al., 2019). Открытие технологии эпигенетического перепрограммирования (Takahashi K. et al., 2006) и индуцированных стволовых клеток (ИПСК) сделало доступными аутологичные стволовые клетки взрослых организмов для использования в тканевой инженерии. Не менее важны полимерные подложки, которые задают фенотип и направляют развитие растущих на них клеток, влияя на их морфологию, миграцию, пролиферацию и дифференцировку (Maleiner V. et al., 2018). Но получение тканей с нужной структурой не всегда возможно, в том числе из-за сложности взаимодействий клеток с матриксом. Поэтому проектирование скаффолдов с оптимальной структурой остаётся вызовом тканевой инженерии.

Одной из эффективных стратегий создания подложек для роста клеток является имитация структуры натурального внеклеточного матрикса - создание биомиметика. Для таких целей можно использовать нановолоконные субстраты, получаемые с помощью электроформования (Tong H. et al., 2011), и повторяющие фибриллярную структуру естественного окружения клеток (Buehler J., 2006, Jun I. et al. 2018). Такие подложки состоят из отдельных полимерных волокон, по отдельности обладающих значительно меньшей жёсткостью по сравнению со всей системой. Поэтому нановолоконные матриксы могут подвергаться ремоделированию за счёт взаимодействия с клетками, что может влиять на конечную структуру выращиваемой на таком матриксе ткани. В первой главе настоящей диссертации представлено исследование взаимодействия клеток и нановолоконных субстратов, а также метод создания тканеподобных клеточных структур на основе волоконно-клеточных взаимодействий.

Важной задачей применения полимерных подложек является создание эффективных систем доставки клеток к поражённым тканям. Такие

системы нужны, например, для инъекции пейсмекерных клеток в миокард при нарушении работы проводящей системы сердца (Meuys J. et al., 2016). Для эффективной имплантации клеток необходимо повысить их выживаемость, закрепление в месте инъекции, образование электрической связи с окружающими клетками (Kanda P., et al., 2017). Во второй главе диссертации исследуется влияние полимерных подложек на повышение эффективности доставки клеток.

Скаффолды на основе полимеров могут быть использованы для создания методов исследования биологических объектов. В биофизике сердца важное место занимает изучение закономерностей распространения волн возбуждения. Патологии распространения могут вызвать нарушения ритма сердца, фибрилляцию и внезапную сердечную смерть (Cherry E. et al., 2008, Winfree A. et al., 1988). В настоящее время для визуализации распространения возбуждения в сердечной ткани чаще всего используются два типа методов: многоэлектродные матрицы (МЭМ) (Bingen B. et al., 2014, Wang L. et al., 2013) и флуоресцентное оптическое картирование (Herroon T. et al., 2012, Kadota S. et al., 2013). Методы оптического картирования могут быть более гибко настроены для различных экспериментальных условий и обеспечивают лучшее пространственное разрешение по сравнению с МЭМ. В то же время их главный недостаток - токсичность для тканей (Hardy M. et al., 2006, Schaffer P. et al., 1994). В третьей главе диссертации представлены результаты разработки нового метода, позволяющего исследовать распространение возбуждения в культуре сердечной ткани без использования красителей.

Цель работы: Разработка биомиметических моделей сердечной ткани *in vitro* на основе нановолокон и полимерных мембран.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи:**

1. Исследовать взаимодействия отдельного кардиомиоцита и фибробласта с отдельным нановолокном.
2. Изучить формирование тканеподобных клеточных структур на основе ремоделирования сетки нановолокон культурой кардиомиоцитов и фибробластов.
3. Разработать субмикронные носители в виде фрагментов волокон, повышающие выживаемость опорнозависимых клеток после имплантации.
4. Разработать модель имплантации пейсмекерных клеток на основе культур кардиомиоцитов и с её помощью определить оптимальные условия электрической интеграции таких клеток.
5. Разработать оптический метод изучения волн возбуждения в модели сердечной ткани без использования красителей.

Научная новизна: Выявлены специфические особенности взаимодействия кардиомиоцитов и фибробластов с нановолоконными структурами и показано, как волоконно-клеточные взаимодействия могут быть использованы для создания биомиметических моделей сердечной ткани. На модели миокарда показано, что прикрепление клеток к подложке повышает эффективность электрической интеграции имплантируемых модельных пейсмекерных клеток. Разработан новый вид наноносителей для культивации отдельных клеток. Разработан новый оптический метод картирования волн возбуждения в сердечной ткани без использования красителей.

Методология и методы исследования. В ходе выполнения диссертационной работы использован комплекс физико-химических, микроскопических, гистологических, молекулярно-биологических, иммунохимических методов исследования.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Для кардиомиоцитов характерно более выраженное обёртывание волокон по сравнению с фибробластами. Частичное обвивание нановолокон фибробластами происходит только в местах расположения фокальных контактов.
2. Волоконно-клеточные взаимодействия вызывают ремоделирование ориентированных сеток нановолокон, что приводит к трансформации всей системы в функционально активные микроткани, демонстрирующие распространение волны возбуждения и сокращение в ответ на стимуляцию.
3. При внесении светочувствительных клеток ChR2-HL-1 в монослой неонатальных кардиомиоцитов вероятность образования электрической связи между этими клетками повышается созданием плотного контакта цитоплазматических мембран при совместной культивации двух типов клеток на одном субстрате.
4. Разработан новый вид наноносителей на основе фрагментов волокон для имплантации отдельных пейсмекерных и других клеток.
5. Разработан оптический способ картирования волн возбуждения в монослоях кардиомиоцитов без использования красителей, который позволяет изучать скорость и форму волн возбуждения в культурах сердечных клеток и выполнять долгосрочные наблюдения на культуре ткани.

Достоверность результатов, представленных в диссертационной работе определяется репрезентативным объемом проведенных экспериментальных исследований, комплексным применением современных методов исследования и подтверждается статистической обработкой полученных

данных. Результаты находятся в соответствии с результатами, полученными другими авторами.

Апробация работы. Результаты диссертации докладывались скайпером на 2 всероссийских и 7 международных конференциях и представлены в тезисных сообщениях этих конференций.

Личный вклад. Все новые результаты, приведённые в данной диссертационной работе, получены лично автором.

Публикации. Основные результаты по теме диссертации изложены в 4 печатных изданиях, 2 из которых изданы в периодических научных журналах, индексируемых Web of Science и Scopus, 2 статьи опубликованы в журналах, рекомендованных ВАК и индексируемых базами Scopus и РИНЦ.

Объём и структура работы. Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения и приложения. Полный объём диссертации составляет 174 страницы, включая 63 рисунка и 3 таблицы. Список литературы содержит 180 наименований.

Содержание работы

ВВЕДЕНИЕ.

Во введении обосновывается актуальность исследований, проводимых в рамках данной диссертационной работы, формулируется цель, ставятся задачи работы, излагается научная новизна и показывается практическая значимость представляемой работы, перечисляются положения, выносимые на защиту.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

В обзоре литературы собрана информация о последних достижениях тканевой инженерии и проблемах, стоящих на пути более широкого внедрения подходов данной области на практике. Так же освещается роль подложек в формировании тканей с нужными характеристиками и описываются существующие подходы к их получению. Отдельный подраздел содержит информацию о нановолоконных подложках и существующих данных о взаимодействии клеток с такими субстратами. Один из подразделов сосредоточен на описании важности трёхмерных тканей и методах их получения. В последней части обзора литературы содержится информация о существующих методах визуализации распространения волн возбуждения в сердечной ткани.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

Электроспиннинг. Нановолокна изготавливались электроформованием из раствора поли-L-молочной кислоты (ПЛА, средневесовая молекулярная масса $\sim 700\ 000$) в гексафторизопропанол в концентрации 25 мг/мл при напряжении от 4 до 8 кВ. Постобработка полимерных филаментов проводилась осаждением адгезионного белка фибронектина человека.

Для получения выровненных волокон использовался катод в виде параллельных электродов. Дискретные подложки получались напылением ориентированных волокон на стекло, покрытое агарозным гелем, и последующей их нарезкой на фрагменты на XY столике.

Приготовление полимерных мембран. Тонкие эластичные мембраны приготавливались центрифугированием свежеприготовленного раствора полидиметилсилоксана (ПДМС) на плоской поверхности при скорости от 100 до 3000 об/мин. Для получения микротекстурированной поверхности использовался кремниевый шаблон, получаемый с помощью электронной литографии.

Культура первичных кардиомиоцитов. Неонатальные крысиные кардиомиоциты выделялась путём извлечения сердец из 2-5 дневных крысят породы Вистар, механической и энзиматической дезагрегации желудочков, повышения содержания кардиомиоцитов путём инкубации суспензии клеток на пластиковой чашки Петри. Типичная плотность посадки клеток составляла $\sim 300\ 000$ клеток/см².

Культура ChR2-НЛ1. Линия светочувствительных иммортализованных кардиомиоцитов мыши НЛ-1 с трансфецированным канальным родопсином 2 культивировалась по стандартным протоколам. Точечная стимуляция светочувствительных культур производилась через оптоволокно с помощью 470 нм светодиода марки Thorlabs M470F1. Стимуляция всего образца достигалась засветкой излучением с максимум 470 нм одновременно по всей площади.

Оптическое картирование. Флуоресцентное оптическое картирование волн возбуждения выполнялось на бинокулярном флуоресцентном микроскопе Olympus MVX10 с применением Ca²⁺-зависимого красителя fluo-4 в растворе Тирода. В качестве детектора применялась камера Andor iXon3.

Конфокальная микроскопия. Для исследования методом конфокальной микроскопии выполнялось иммуноцитохимическое окрашивание, для которого использовались красители Alexa 488 Phalloidin, антитела к α -актину, DAPI. Для исследования использовался микроскоп Carl Zeiss LSM 710.

Сканирующая электронная микроскопия. Сканирующая электронная микроскопия выполнялась на микроскопе JEOL JSM 6510. Поверхность непроводящих образцов покрывалась нанометровым слоем золота на установке магнетронного напыления Quorum 150R/ES.

Просвечивающая электронная микроскопия. Для исследования методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) производилась двойная фиксация образцов в глутаровом альдегиде и тетраоксиде осмия, дегидратация в растворах этанола повышающихся концентраций, заливка в смолу Epon 812 и ультрамикротомирование затвердевших блоков

из эпоксидной смолы. После этого ультратонкие срезы контрастировались уранил ацетатом и цитратом свинца.

Гистология. Для проведения гистологического исследования выполнялись полутонкие срезы образцов, залитых в эпоксидную смолу по протоколу для ПЭМ. Получившиеся срезы окрашивались фуксином и наблюдались в оптический микроскоп.

Сканирующая зондовая нанотомография. Для изучения с помощью сканирующей зондовой нанотомографии (СЗНТ) (Efimov A. et al., 2007) образцы заливались в смолу по протоколу для ПЭМ и исследовались с помощью системы NTEGRA-Томо с использованием кантилеверов НТМДТ НА_НР. После каждого цикла ультрамикротомирования с шагом 120 нм снималась топография области интереса размером 16x16 мкм.

Атомно-силовая микроскопия. Атомно-силовая микроскопия (АСМ) выполнялась на установке JPK NanoWizard 3 с использованием кантилеверов НТМДТ NSG10. Для измерения модулей Юнга и жесткостей на изгиб мембран использовались кантилеверы НТМДТ НА_НР и строились кривые зависимости деформации от напряжения.

Статистический анализ. Для нормально распределённых величин вычислялось среднее значение и среднеквадратичное отклонение. Для скошенных распределений рассчитывались медиана и интерквартильный размах. Для определения статических различий использовались критерии Стьюдента и Манна-Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0.05$. Обработка результатов производилась в программных пакетах Wolfram Mathematica и R.

РЕЗУЛЬТАТЫ.

Глава 1. Особенности роста сердечных клеток на нановолоконных подложках.

1.1 Исследование волоконно-клеточных взаимодействий. Для изучения ультраструктурных особенностей волоконно-клеточных взаимодействий изготавливались образцы с отдельными подвешенными волокнами из полилактида (ПЛА) со средним диаметром волокон 616 ± 101 нм, покрытые фибронектином (см. Рисунок 1). После культивации на таких подложках культур клеток сердца в течение 72 часов, образцы изучались с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ), просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и сканирующей зондовой нанотомографии (СЗНТ) (Efimov A. et al., 2007).

Конфокальная микроскопия позволила обнаружить различия в прикреплении к волоконному скаффолду между кардиомиоцитами и фибробластами. В частности, было выяснено, что для кардиомиоцитов характерно обёртывание полимерных филаментов, что нетипично для фибробластов. Для количественной характеристики этого явления строились трёхмерные реконструкции случайных клеток обоих видов, позволяющие оценить расположение нановолокон по отношению к клеткам (см. Рисунок 3).

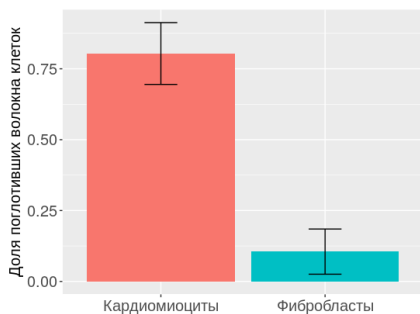


Рис. 2 — Гистограмма, показывающая 95% доверительные интервалы для долей кардиомиоцитов и фибробластов, в которых волокна были локализованы во внутреннем объёме клеток.

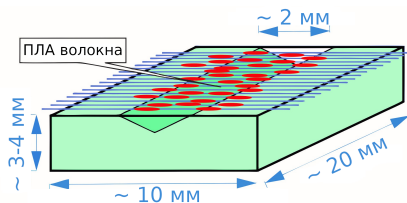


Рис. 1 — Схема образцов с отдельными ПЛА волокнами, представляющими из себя ПДМС блоки с узкой бороздой, перпендикулярно которой помещены выровненные отдельные волокна. Размеры блоков указаны на рисунке.

В результате были найдены статистически значимые различия между двумя типами клеток. В частности, из 51 исследованного кардиомиоцита доля обернувших нановолокна составила 80.4%, в то время как из 57 трёхмерных реконструкций фибробластов только в 10.5% случаев волокна могли быть классифицированы как проходящие через внутренний объём клеток (см. Рисунок 2). Стоит отметить, что здесь приведена оценка сверху доли обернувших волокна фибробластов, ультраструктурные особенности прикрепления которых не всегда удавалось точно идентифицировать из-за недостаточной разрешающей способности лазерной сканирующей микроскопии.

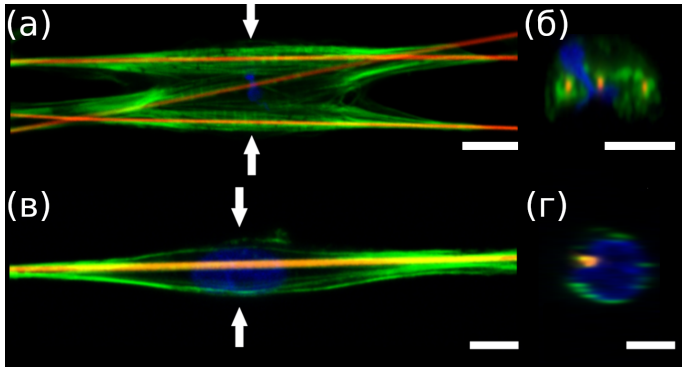


Рис. 3 — КЛСМ-микротографии крысиных неонатальных кардиомиоцитов и сердечных фибробластов, выращенные на подвешенных нановолокнах. Волокна окрашены родамином 6G (красный), актиновые филаменты клеток (в клеточном кортексе и миофибриллах) окрашены Alexa 488 Phalloidin (зеленый), ядра контрастированы DAPI (синий). (а) - Снимок кардиомиоцита в плоскости XY на трёх нановолокнах. (б) - Поперечный срез кардиомиоцита вдоль белых стрелок. Волокна проходят внутри кардиомиоцита. Шкалы 5 мкм. (в) - Снимок фибробласта на полимерном волокне. (г) - Срез фибробласта в плоскости YZ, выполненный вдоль белых стрелок. Волокно проходит сбоку от клетки. Шкалы 4 мкм.

Просвечивающая электронная микроскопия применялась для изучения места контакта кардиомиоцитов, сердечных фибробластов и полимерных волокон, что показано на Рисунке 4. Этот метод позволил узнать, что при посадке двух типов клеток на нановолоконные подложки, только у кардиомиоцитов полимерные филаменты проходят внутри их объёма. При этом волокна оказываются отделёнными от цитоплазмы мембраной, которая образует узкий зазор, ведущий от волокна к внеклеточному пространству. Таким образом, технически они оказываются снаружи клетки. Согласно ПЭМ измерениям, средняя ширина зазора составляет 22 ± 6 нм ($N = 16$). Расположение некоторых складок над волокнами дополнительно указывает на то, что обволакивание происходит а за счёт адгезионных взаимодействий, вынуждающих клетку принимать менее энергетически выгодную конформацию. Миофибриллы располагались вблизи обёрнутых волокон, что является признаком прикрепления кардиомиоцитов к полимерным филаментам за счёт костамер (Dabiri V. et al., 2012). В отличие от сердечных миоцитов, в зависимости от конфигурации нановолокон фибробласт образует несколько кластеров фокальных контактов (Sheets K. et al., 2013), в результате чего происходит растяжение и распластывание клеток. Частичное обёртывание волокон происходит в местах расположения фокальных контактов, в остальных случаях фибробласт минимизирует

контакт с волокнами. Для построения трёхмерного интерфейса кардиомиоцит - нановолокно использовалась сканирующая зондовая нанотомография (Efimov A. et al., 2007). Она позволила узнать, что поглощение так же возможно при разделении клетки на несколько более мелких отростков.

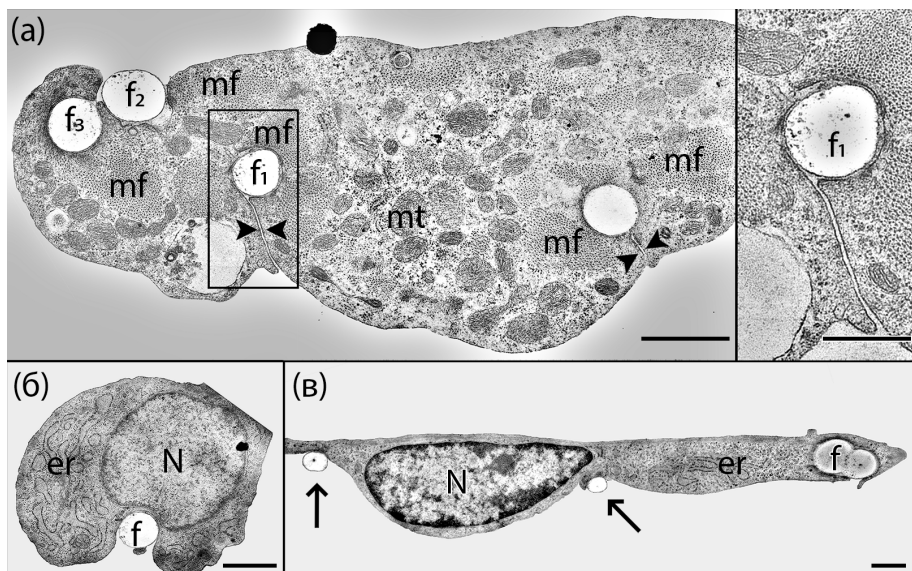


Рис. 4 — ПЭМ микрофотографии кардиомиоцита и сердечных фибробластов, выращенных на подвешенных волокнах. (а) - Типичное ПЭМ изображение кардиомиоцита, выращенного на подвешенных волокнах. На вставке представлен увеличенный участок с обёрнутым волокном (f1) и цитоплазматической мембраной, окружающей волокно. Волокна f2 и f3 поглощены клетками, но складка мембраны, образованная в результате поглощения, расположена над ними. Большинство миофибрилл (mf) расположены вблизи полимерных нановолокон. (б) - ПЭМ-изображение веретенообразного фибробласта, выращенного на подвешенном волокне. (в) - ПЭМ-изображение полигонального фибробласта, выращенного на нескольких подвешенных волокнах. Клетка имеет минимальную площадь взаимодействия с двумя волокнами, обозначенными стрелками. Двойное волокно (f) частично обвито тонкими выростами клетки без образования складки мембраны. Используются следующие обозначения: f - ПЛА волокна, mt - митохондрии, mf - миофибриллы, er - шероховатый эндоплазматический ретикулум, N - ядро. Чёрные стрелки указывают на складки клеточной мембраны. Шкалы масштаба 1 мкм. Шкалы масштаба во вставках - 0,5 мкм.

На Рисунке 5 показаны распределения степеней обёртывания нановолокон кардиомиоцитами (красный) и фибробластами (голубой). Этот параметр рассчитывался для каждого контакта волокно-клетка как отношение длины соприкосновения к периметру всего волокна. Распределение для фибробластов имеет две моды 40% и 91%, что говорит о его неоднородности. Изучение первоначальных снимков позволило сделать вывод, что возникновение двух мод в распределении можно объяснить наличием и отсутствием адгезии в местах контакта.

В распределении для кардиомиоцитов на 100% обволакивание приходятся 80.4% рассматриваемых мест контакта. При этом существует небольшой пик около значения 45%, относящийся к взаимодействию кардиомиоцитов с волокнами без адгезии.

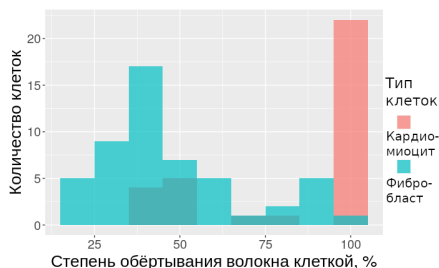


Рис. 5 — Распределения степеней обёртывания нановолокон кардиомиоцитами (красный) и фибробластами (голубой). 100% соответствует полному обёртыванию волокна. Распределение для фибробластов имеет две моды 91% и 40%, соответствующие случаям с адгезией и без соответственно.

фокальных контактов, в которых стягивали полимерные филаменты. А кардиомиоциты не только натягивали нановолокна, но и прикреплялись к деформированному участку волокна, фиксируя таким образом его положение.

Были изучены ультраструктурные и динамические характеристики прикрепления кардиомиоцитов и сердечных фибробластов к отдельным подвешенным нановолокнам. Рассмотренный материал позволяет сделать вывод о том, что для кардиомиоцитов характерна максимизация контакта

Было исследовано воздействие неонатальных кардиомиоцитов и сердечных фибробластов на отдельные нановолокна в зависимости от времени. В этой серии экспериментов движение клеток и расположение волокон фиксировалось с помощью прижизненной оптической микроскопии.

Выяснилось, что растущие на нановолокнах клетки прикладывают к нановолокнам силы, достаточные для их деформации. Сокращение кардиомиоцитов вызывало более сильное изгибание волокон, чем приложение сил упругости цитоскелета к волокну. По мере развития клеток на нановолокнах, напряжение в цитоскелете росло, что приводило к увеличению натяжения волокон. При этом фибробласты образовывали пару

с волокнами, что может приводить к их обёртыванию. Для фибробластов характерна минимизация контакта с волокнами, что нарушается только в местах расположения фокальных контактов, где происходит частичное обёртывание. Такой механизм находится в соответствии с результатами моделирования динамики цитоскелета (Nedelec F. et al., 2007), которые говорят о минимизации клетками площади своей поверхности, что может быть нарушено действием дополнительных сил в системе. Так же было выяснено, что сил упругости и сокращения клеток достаточно для деформации единичных нановолокон. По мере культивации клеток на таких подложках деформация полимерных филаментов возрастает со временем. При этом фибробласты мигрируют по волокнам и стягивают их, образуя несколько кластеров фокальных контактов. А кардиомиоциты натягивают волокна без миграции, фиксируя их положение прикреплением к деформированным участкам.

1.2 Формирование тканеподобных клеточных структур за счёт волоконно-клеточных взаимодействий. В этом разделе исследуется возможность ремоделирования нановолоконных подложек за счёт волоконно-клеточных взаимодействий, показанных в предыдущем разделе. В качестве подложки, поддающейся воздействию со стороны кардиомиоцитов и фибробластов, была выбрана сетка волокон из полилактида, каждое из которых сравнительно легко может перемещаться относительно остальных филаментов. Показано, что коллективные взаимодействия сердечных культур и сеток волокон могут приводить к формированию трёхмерных структур, которые были названы сердечными микротканями

В серии экспериментов данного раздела кардиомиоциты и фибробласты культивировались на подложках, которые представляли из себя сетки подвешенных ориентированных адгезивных волокон из полилактида, плотностью - 15 - 80 волокон/мм (см. Рисунок 6). Посредством интервальной съёмки регистрировалось поведение культур клеток на таких сетках, что показано на Рисунке 7. По мере культивации, происходило изменение положения волокон, которое выражалось в сближении волокон и вследствие этого уменьшении ширины сетки как целого. Этот процесс можно разделить на несколько этапов. Во время первой фазы кардиомиоциты и фибробласты стягивали ближайшие волокна, в результате чего образовывались первичные пучки, состоящие из отдельных полимерных нитей, часто в виде плотных кластеров. При наличии между несколькими первичными пучками близкого контакта или связей в виде неагрегированных волокон, могло происходить их сближение и дальнейшее объединение. В результате происходило образование более крупных – вторичных пучков. На скорость этого процесса влияли среднее расстояние между волокнами и количество посаженных клеток.

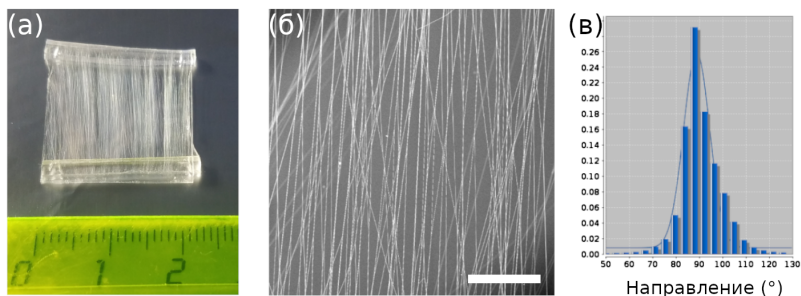


Рис. 6 — Образец с сеткой нановолокон из полилактида. (а) - Общий вид образца. По краям квадратного стекла 22х22 мм помещаются две полоски из ПДМС, перпендикулярно которым наносятся адгезивные нановолокна из полилактида. (б) - СЭМ изображение сетки полимерных волокон плотностью 35 волокон/мм. Средняя толщина волокон 683 ± 175 нм. Шкала масштаба 0,5 мм. (в) - Типичное распределение по направлениям в образце, вычисленное с помощью метода локального градиента плагинном Directionality ImageJ.

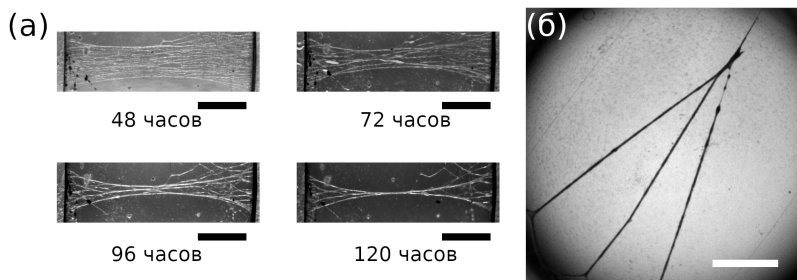


Рис. 7 — Процесс формирования жгутов в результате ремоделирования сетки полимерных нановолокон культурой клеток. (а) - Интервальное фотографирование процесса сближения клеток и волокон за счёт волоконно-клеточных взаимодействий. Шкала масштаба 4 мм. (б) - Изображение сформированных кардиальных микротканей. Шкала масштаба 2 мм.

Конфокальная микроскопия позволила получить данные о трёхмерной структуре кардиальных пучков и закономерностях их формирования (см. Рисунок 8). В частности, из Z-стеков реконструировалась форма сечения микротканей, которая оценивалась по формуле эксцентриситета эллипса. С помощью таких методов удалось выяснить, что с течением времени плоская сетка волокон сжимается в жгут, форма сечения которого

приближается к окружности. Это явление было названо созреванием сердечных микротканей.

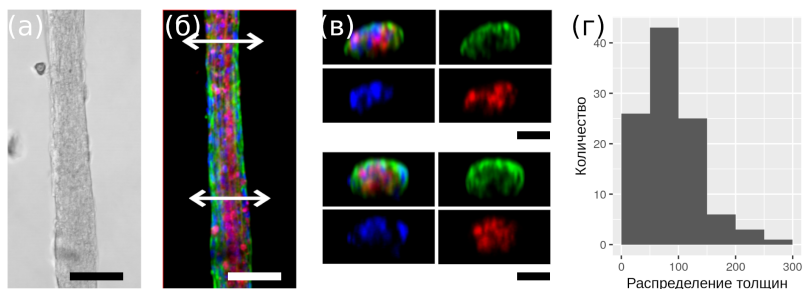


Рис. 8 — КЛСМ иммуноцитохимические снимки крысиных кардиомиоцитов и сердечных фибробластов, самоорганизовавшихся в трёхмерные жгуты. (а) - Оптический снимок в проходящем свете кардиальной микроткани. (б) - КЛСМ оптический срез в плоскости XY кардиальной микроткани. Вдоль белых стрелок реконструированы оптические срезы в плоскости XZ. (в) - Оптические срезы в плоскости XZ, реконструированные из Z-стеков. (г) - Распределение диаметров проекций исследованных сердечных жгутов. В связи с вариабельностью формирования жгутов, производились множественные измерения толщин с отступом 500 мкм ($N = 104$). Медианная толщина - 77 мкм. Шкалы масштаба 15 мкм.

Для изучения структуры и ультраструктуры срезов микротканей использовались методы гистологии, просвечивающей растровой электронной микроскопии (ПРЭМ) и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Для этого применялась двойная фиксация образцов в глутаровом альдегиде и тетраоксиде осмия, дегидратация, заливка в эпоксидную смолу Epon 812 с последующим микротомированием или ультрамикротомированием.

Гистологическое окрашивание образцов фуксином (см. Рисунок 9 (а)) позволило оценить морфологию отдельных клеток в сердечной микроткани. С помощью этого метода было выяснено, что фибробласты мигрируют из объёма жгута и распластаются на его поверхности. Также этот метод позволил обнаружить мёртвые клетки, попавшие в культуру на этапе посадки. Просвечивающая растровая электронная микроскопия позволила изучать большие площади сечений образцов и обнаруживать отдельные полимерные волокна. Метод ПРЭМ позволил узнать, что первичные кардиальные пучки могут включать случайно распределённые отдельные нановолокна или их кластеры по 2 - 14 штук. Также этот метод позволил обнаружить в рамках одной микроткани структуры, характерные

для нескольких первичных пучков, что добавило данных, необходимых для определения механизма формирования микротканей.

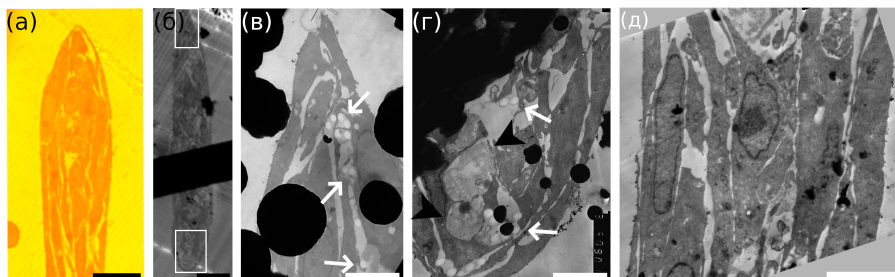


Рис. 9 — Гистологическое и электронно микроскопическое исследование структуры сердечной микроткани. (а) - гистологический снимок полутонкого среза кардиального жгута, окрашенного фуксином. (б) - ПЭМ микрофотография полутонкого среза кардиального жгута. Белыми прямоугольниками выделено положение ПЭМ снимков. Шкалы масштаба 10 мкм. (в) - ПЭМ микрофотография области, отмеченной белым прямоугольником сверху на (б). Кластеры нановолокон обозначены белыми стрелками. (г) - ПЭМ снимок области, отмеченной белым прямоугольником снизу на (б). Видны случайно расположенные волокна. Клетки, поражённые некрозом, обозначены чёрными стрелками. (д) - ПЭМ микрофотография средней области сердечной микроткани. Видна ориентация клеток. Шкалы масштаба 5 мкм.

Метод просвечивающей электронной микроскопии (см. Рисунок 9 (в, г, д)) использовался для получения информации об ультраструктурных особенностях морфологии клеток и их прикреплении к полимерным нановолокнам в кардиальных микротканях. Благодаря этому методу была оценена анизотропия клеток в ткани, вычислена её пористость и кластеризация полимерных волокон. Полученные результаты позволили сделать вывод о возможности формирования жгутов из сердечных клеток без некротического ядра с толщиной как минимум 60 мкм.

Проверка функциональной активности выращенных описанным образом микротканей проводилась посредством оптического картирования возбуждения с помощью их окраски Ca^{2+} -чувствительным красителем fluo-4 и регистрации возбуждения клеток. В ответ на электрическую стимуляцию, микроткани демонстрировали сократительную активность и распространение волн возбуждения со скоростью до 36 ± 8 мм/с, что говорит о достаточном для проведения волн количестве кардиомиоцитов и формировании между ними контактов по мере созревания микротканей.

В данном разделе был исследован механизм ремоделирования сетки полимерных волокон кардиомиоцитами и фибробластами, и было показано как волоконно-клеточные взаимодействия могут приводить к формированию тканеподобных клеточных структур, названных "сердечными микротканями". С помощью оптической и электронной микроскопии было исследовано их строение, и было показано, что клетки в кардиальных пучках имеют нормальную ультраструктуру, а сами пучки являются функционально активными. Так же была продемонстрирована возможность размещать в таких микротканях внешние фибриллярные структуры с размерами, характерными для капилляров. Проведённые эксперименты показали, что сердечные микроткани могут использоваться как экспериментальные модели сердечной ткани *in vitro*.

Глава 2. Определение оптимальных условий имплантации сердечных клеток. Важной проблемой тканевой инженерии является доставка клеток к поражённому органу. Не является исключением и тканевая инженерия сердца. Одной из важных задач в этой области является имплантация пейсмекерных клеток, призванных заменить поражённую проводящую систему сердца. В этом процессе важны не только выживаемость инъецированных клеток и закрепление их в ткани органа мишени, но и образование функционально активного синцития из подсаженных клеток и окружающей ткани. Для исследования этих аспектов во второй главе были проведены тканево-инженерные эксперименты по исследованию оптимального паттерна имплантации.

2.1 Определение оптимальных условий имплантации пейсмекерных клеток в тканеинженерной модели сердечной ткани *in vitro*. В этом разделе исследовались оптимальные условия имплантации пейсмекерных клеток в тканеинженерной модели сердечной ткани с точки зрения образования функционального синцития с тканью реципиентом. В качестве поисков рабочих подходов к созданию оптического биологического водителя ритма изучалась эффективность различных способов внесения и интеграции светочувствительных кардиомиоцитов линии ChR2-HL1 в монослой неонатальных кардиомиоцитов крысы. Эффективность полученного таким образом модельного водителя ритма оценивалась следующими способами: методом оптического картирования производилась регистрация волн возбуждения, инициированных оптической стимуляцией, воздействующей исключительно на клетки линии Ch2-HL1; иммуноцитохимическими методами производилась характеристика морфологии полученной со-культуры и оценивалась степень интеграции внесённых в монослой структур.

Для моделирования сердечной ткани органа-реципиента был выбран монослой неонатальных кардиомиоцитов. Для исследования влияния микроокружения на имплантируемые клетки использовались монослой с

разной степенью конфлюэнтности, анизотропные монослои, а также полужаселённые монослои. Иммуортализованные кардиомиоциты мыши линии ChR2-HL1 были трансфецированы гибридным белком канального родопсина 2 с YFP, что позволяло им реагировать на раздражение светом, демонстрируя электрическое возбуждение. Светочувствительные клетки вносились в виде отдельных изолированных клеток, так и в виде кластеров по 100 - 300 клеток. После внесения сфероидов клеток на монослои с разной структурой, вычислялась степень распластанности.

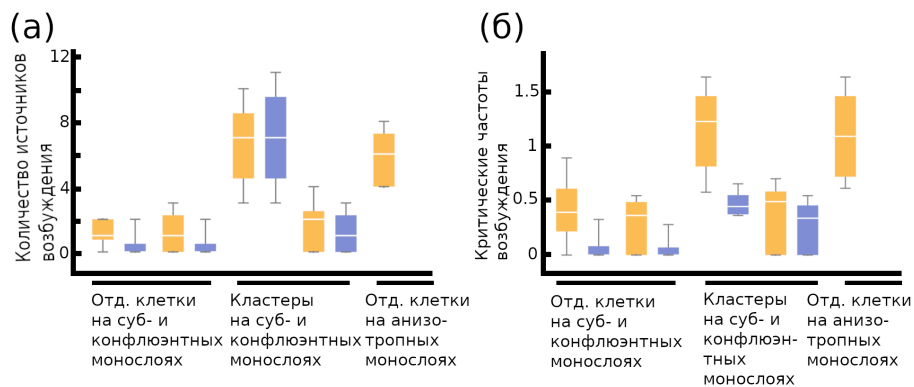


Рис. 10 — Характеристики ответа на световой импульс отдельных светочувствительных ChR2-HL1 клеток и их кластеров, посаженных на 75% и 100% конфлюэнтные и анизотропные монослои неонатальных крысиных кардиомиоцитов. Оранжевые и фиолетовые солбцы показывают распределения до и после воздействия 0.86 мМ лидокаином. (а) Количество источников волн возбуждения, появляющихся в ответ на засветку образца по всей площади. Кластеры, посаженные на субконфлюэнтные монослои, и отдельные клетки ChR2-HL1 на анизотропных монослоях активно отвечали на раздражение светом, что проявлялось в одновременном появлении 5 -12 источников волн возбуждения. В остальных группах образцов, количество источников волн возбуждения было значительно ниже, вплоть до полного отсутствия ответа. Воздействие лидокаином наименее эффективно подавляло кластеры на субконфлюэнтных монослоях. (б) Критические частоты, воспринимаемые сердечными монослоями из разных групп в ответ на точный световой импульс. В этом случае кластеры HL1, посаженные на 6 ч. культуры, воспринимали наиболее физиологически релевантные частоты. После воздействия лидокаина происходило статистически значимое снижение частот, полного подавления не происходило. В случае отдельных клеток происходило полное подавление ответа в более половине случаев после такого воздействия.

С помощью оптического картирования оценивалось формирование с подсаженными клетками функционального синцития. Его образование определялось эффективностью оптической стимуляции данных образцов и максимальными критическими частотами, усваемыми ими при стимуляции светом. По результатам этих экспериментов (см. Рисунок 10) оказалось, что наибольшую эффективность стимуляции демонстрировали сферойды, внесённые на субконфлюэнтные монослои. Вдобавок на этих образцах наблюдалось наименьшее снижение критических частот стимуляции при воздействии на культуру клеток блокатором натриевых каналов - лидокаином. Высокая вероятность возникновения электрической связи наблюдалась при внесении отдельных клеток ChR2-HL1 на анизотропные сердечные культуры.

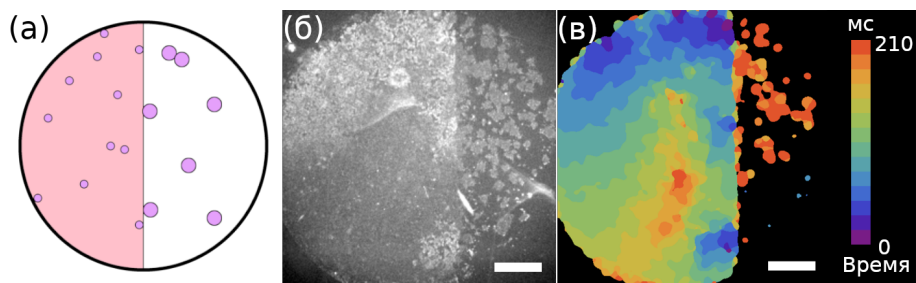


Рис. 11 — Влияние взаимодействия с субстратом на возникновение электрической связи между кластерами светочувствительных клеток ChR2-HL1 и монослоем неонатальных крысиных кардиомиоцитов. (а) - Схема эксперимента. Розовым обозначена часть стекла, заселённая неонатальными первичными кардиомиоцитами. Белым — незаселённая. Маленькие фиолетовые окружности обозначают подсаженные кластеры ChR2-HL-1. Их размер обозначает разную степень расплывания на заселённой и незаселённой частях образца. (б) - Один из кадров оптического картирования волн возбуждения с помощью Ca-зависимого красителя fluo-4. Видно границу монослоя и распластанные кластеры. (в) - Карта активации монослоя (б) в ответ на стимуляцию светом по всей площади образца. Синим и фиолетовым показаны места возникновения волн возбуждения. Видно, что появилось 6 источников волн, все из которых расположены по краям образца, где у кластеров был контакт с субстратом. Шкалы масштаба 2 мм.

Для выяснения влияния прикрепления возбудимых клеток к матриксу на формирование электрических контактов между ними был проведён следующий эксперимент (Рисунок 11 (а)). Культура первичных кардиомиоцитов высаживалась только на половину покровного стекла, благодаря чему формировалась граница монослоя, проходящая через центр образца. Спустя 48 ч его культивации, выполнялось внесение светочувствительных

кластеров ChR2-HL-1 и дополнительная культивация ещё в течение 24 часов. В результате такой подсадки, часть кластеров попадала на заселённую часть образца и интегрировалась в монослой так же, как в предыдущем эксперименте. Часть светочувствительных кластеров попадала на пустую часть стекла, значительно распластывалась и образовывала небольшие участки культуры ChR2-HL1. При этом часть таких кластеров оказывались рядом с границей первичной культуры и во время распластывания образовывали контакт с кардиомиоцитами.

Одновременная засветка таких образцов показала ($N = 7$), что 100% источников стимуляции культуры в таком эксперименте находились только на границе монослоя (см. Рисунок 11). Эксперименты с точечной стимуляцией показали, что только 11% обнаруженных источников оптической стимуляции приходились на внутреннюю часть культуры, а 89% источников находились на её границе, при том что с ней контактируют только 10-15% от посаженных кластеров. Такие результаты свидетельствуют о том, что электрическая связь кластеров ChR2-HL-1 и культуры первичных кардиомиоцитов возникала преимущественно по краям монослоя, где кластеры имели возможность расти по субстрату.

Таким образом удалось получить свидетельства того, что прикрепление к подложке способствует образованию электрической связи между клетками ChR2-HL1 и первичными кардиомиоцитами. В проведённых экспериментах высокая эффективность образования электрических контактов между неонатальными кардиомиоцитами и линией ChR2-HL1 наблюдалась при распластывании светочувствительных кластеров по субстрату с образованием контакта с первичными клетками или при внесении отдельных клеток HL1 в анизотропную культуру. В обоих случаях присутствовало направление роста подсаживаемых клеток субстратом и последующим образованием контакта с первичными кардиомиоцитами. Была выполнена оценка, которая показала, что при миграции двух клеток по подложке во взаимном направлении давление их цитоплазматических мембран друг на друга по крайней мере на 2 порядка выше, чем при соприкосновении клеток под действием силы тяжести. Таким образом, совместный рост клеток на едином матриксе способствует достижению более плотного контакта между ними. Это важно для достижения эффективной электрической интеграции, так как электрическое возбуждение может переходить с клетки на клетку в местах тесного контакта их мембран как за счёт коннексинов, так и напрямую (Picone J. et al., 1991). Для окончательного подтверждения этого механизма необходимо провести исследование мест контактов двух типов клеток с помощью высокоразрешающих методов микроскопии, например, просвечивающей электронной микроскопии.

2.2 Наноносители для отдельных клеток в виде фрагментов нановолокон.

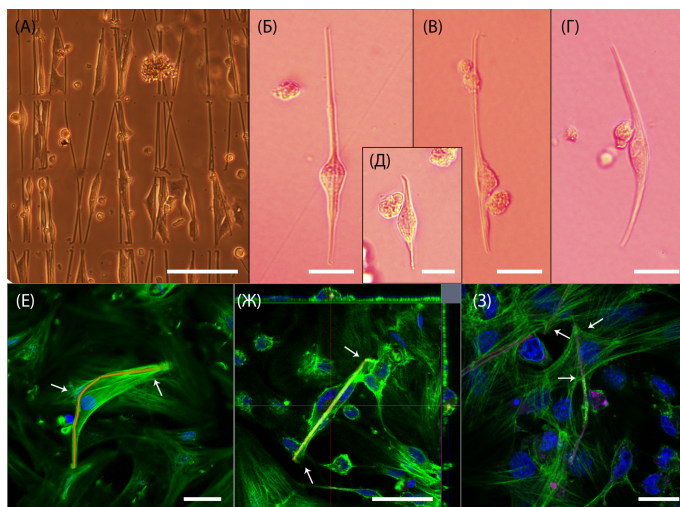


Рис. 12 — Свободные и подсаженные кардиомиоциты на наноподложках. (а) - Клетки, во время посадки на фрагменты волокон. Шкала 100 мкм. (б, в, г, д) - Отдельные кардиомиоциты на наноподложках. (б, в, г) - Шкала 20 мкм. (д) - Шкала 10 мкм. (е, ж) - Кардиомиоциты на наноподложках, подсаженные на монослой неонатальных крысиных кардиомиоцитов. Стрелками показаны места образования связей с монослоями. Иммуноцитохимическое окрашивание. Зелёное – F-актин. Синее – ядра. Красное – наноподложки. (е) - Шкала 20 мкм. (ж) - Шкала 50 мкм. (з) - Взаимодействие клеток монослая кардиомиоцитов с фрагментами волокон. Стрелками показаны изменения в структуре актинового цитоскелета, вызванные прикреплением наноподложек к клеткам. Шкала 20 мкм.

При доставке пейсмекерных клеток в миокард их выживаемость является необходимым условием для успешной терапии заболеваний, связанных с поражением проводящей системы сердца. Кардиомиоциты, как и большинство других соматических клеток млекопитающих, являются опорно-зависимыми и могут жить в суспензии лишь несколько часов. В этом разделе описана разработка нового вида наноносителей, представляющих из себя фрагменты полимерных нановолокон. Такие наноподложки были использованы для культивации отдельных клеток и поэтому могут быть применены для доставки их в орган посредством инъекций. Методика их получения заключается в нанесении полимерных нановолокон, получаемых с помощью электроформования, на покрытое агарозой стекло и

прецизионной резке на ХУ столике. Приготовленные таким способом образцы были пригодны для посадки и культивации клеток (Рисунок 11(а)).

На Рисунках 12 (б, в, г, д) представлены микрофотографии кардиомиоцитов на наноподложках. В таком состоянии клетки могли поддерживать жизнедеятельность более трёх суток. На таких субстратах клетки вытягиваются, приобретая веретенообразную форму. На Рисунках 12 (е, ж) показана интеграция кардиомиоцитов на наноподложках в монослой крысиных первичных сердечных культур. После 48 ч. культивации на наноподложках, клетки не только выживали, но и могли образовывать связи с клетками монослоя реципиента.

Клетки из монослоя взаимодействовали не только с подсаженными клетками, но и с самими наноподложками (см. Рисунок 12(з)), что происходило за счёт адгезивных свойств поверхности нановолокон. Этот эффект может способствовать образованию электрической связи между подсаживаемыми клетками и сердечной тканью реципиента по механизму, описанному в разделе 2.1. Фрагмент волокна может играть роль направляющего между клетками ткани-мишени и имплантированными клетками. Клетки могут мигрировать вдоль нановолокна и в какой-то момент придти в плотный контакт, в результате чего будет образовываться плотный контакт их мембран, стимулирующий образование электрической связи между ними.

Глава 3. Разработка метода оптического картирования сердечных монослоёв без красителей.

Волны возбуждения в сердце человека координируют синхронные движения его отделов, необходимые для нормальной перекачки крови (Камкин А., Каменский А., 2004). Аномалии распространения волн возбуждения могут вызывать нарушения ритма сердца, фибрилляцию и внезапную сердечную смерть (Cherry E. et al., 2008, Winfree A. et al., 1988). В частности, было показано, что развитие так называемых спиральных волн объясняет возникновение наиболее опасных желудочковых аритмий сердца. Именно поэтому изучение особенностей распространения волн возбуждения в сердечной ткани имеет большое значение (Kleber A. et al., 2004) .

В настоящее время для визуализации распространения возбуждения в сердечной ткани наиболее часто используются два типа методов: многоэлектродные матрицы (МЭА) (Bingen B. et al., 2014, Wang L. et al., 2013) и флуоресцентное оптическое картирование (Herron T. et al., 2012, Kadota S. et al., 2013). Методы оптического картирования могут быть более гибко настроены для различных экспериментальных условий и обеспечивают лучшее пространственное разрешение по сравнению с МЭА. В то же время флуоресцентные красители влияют на клетки и могут быть токсичными (Hardy M. et al., 2006, Schaffer P. et al., 1994). В этой главе

описана разработка нового метода на основе полимерных мембран, который позволяет контролировать распространение возбуждения в клеточных культурах без использования красителей. Метод основан на оптическом мониторинге изгибов тонкой эластичной мембраны, засеянной кардиомиоцитами. Не оказывая токсического воздействия на клетки, этот метод может применяться для постоянного мониторинга волн возбуждения в клеточных культурах во время их созревания.

Субстрат для роста клеток, необходимый для мониторинга волн возбуждения в культуре кардиомиоцитов описываемым методом, представляет из себя тонкую эластичную плёнку из полидиметилсилоксана (ПДМС, показатель преломления 1.4). Мембраны из этого материала закреплялись на круглых кольцах с внутренними диаметрами 13 мм и покрывались фибронектином. После чего на них высаживался монослой сердечных клеток, и вся конструкция помещалась в среду культивации на границу раздела фаз воздух/вода клетками вниз. В данной работе эластичная мембрана с выращенной на ней культурой кардиомиоцитов именуется Мышечная Тонкая Плёнка (МТП).

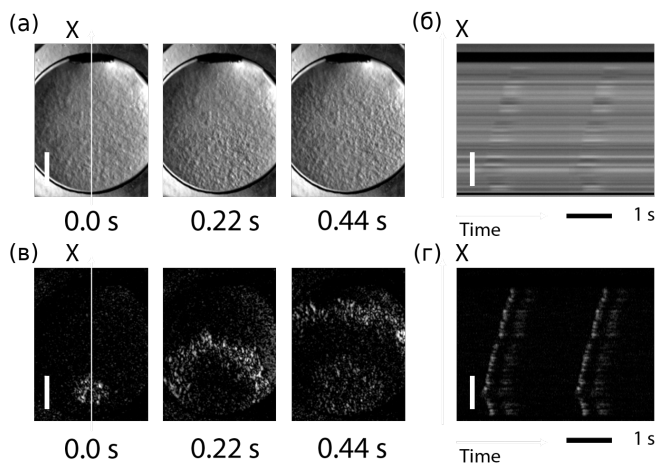


Рис. 13 — Визуализация распространения волны возбуждения на мышечной тонкой плёнке (МТП) с помощью безметочного метода картирования. (а) - последовательность кадров, показывающая распространение волны возбуждения, записанной методом без красителя; (б) - пространственно-временной график, построенный вдоль линии сканирования, показанной на панели (а) стрелкой; (в) и (г) - те же изображения после обработки для повышения контрастности. Шкала масштаба - 3 мм. Шкала времени - 1 с.

Посредством моделирования хода лучей через изгиб мембраны при их движении из более оптически плотной среды в менее оптически плотную, было выяснено что при косом освещении на таком объекте происходит неравномерное преломление света, что будет видно наблюдателю как возникновение тёмных и светлых областей на поверхности мембраны. Данная гипотеза была подтверждена посредством регистрации изгибов мембраны на микроскопе с 100х увеличением. При построении зависимости яркости света на изгибе мембраны от времени, во время сокращения на светлой стороне изгиба появляется максимум, а на тёмной - минимум.

Этот эффект был использован для детекции распространения возбуждения по всей площади мембраны. Раскадровка соответствующей видеозаписи представлена на Рисунке 13а. По представленным изображениям можно судить о форме волны и измерить её скорость с помощью пространственно-временных развёрток. Например, в этом видео скорость равна 16 ± 1 мм / с. Также этим безметочным методом удалось визуализировать две взаимодействующие спиральные волны в изотропной культуре кардиомиоцитов. Для исследования аритмий важно получать монослои с ориентированным ростом кардиомиоцитов, в которых распространение волн возбуждения анизотропно. С помощью применения микротекстурированных мембран были получены такие сердечные монослои, в которых с помощью описываемого метода были визуализированы эллиптические волны возбуждения и анизотропные реентри (см. Рисунок 14).

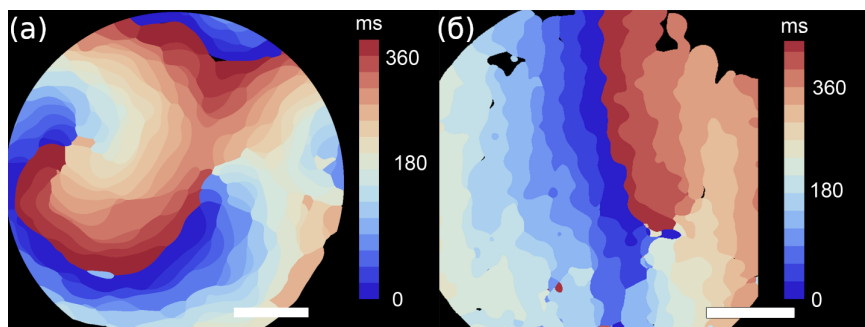


Рис. 14— Карты активации спиральных волн, наблюдаемых с помощью оптического картирования без красителей. (а) - Карта активации спиральной волны в культуре изотропных кардиомиоцитов, взаимодействующей с круговой волной. (б) - Карта активации спиральной волны в анизотропном монослое кардиомиоцитов, выращенном на тонкой микротекстурированной ПДМС мембране. Шкалы масштаба - 3 мм.

Представленный метод визуализации волн возбуждения без использования красителей был сопоставлен с традиционным флуоресцентным Ca^{2+} -зависимым картированием. Для этого, монослои на МТП были

окрашены Ca^{2+} -чувствительным красителем fluo-4 и визуализировались обоими методами сначала последовательно, затем параллельно. Сравнение результатов последовательного картирования обоими методами волны возбуждения в неоднородной сердечной культуре показало высокое качественное сходство получаемых сложных форм фронта. Для параллельного сравнения обоих методов, одна половина окрашенного образца картировалась традиционным методом, а другая - методом без красителей. Скорости волн в образце, измеренные таким образом, равнялись друг другу в пределах погрешности и составляли 86 ± 5 мм/с и 87 ± 7 мм/с соответственно.

Было проведено исследование контрастности волн возбуждения в зависимости от толщины мембран. Для этого использовались мембраны толщиной 213 ± 15 мкм, 114 ± 2 мкм, 40 ± 2 мкм, 14 ± 1 мкм; группа мембран толщиной 21 ± 2 мкм из более мягкого ПДМС. Стекло, покрытое фибронектином использовалось в качестве контроля. Механические свойства всех мембран измерялись посредством атомно-силовой микроскопии. Модули Юнга мембран из ПДМС 184 составляли 1.25 ± 0.08 МПа. Модуль Юнга более мягкого ПДМС составлял 1.07 ± 0.02 МПа. Жесткости на изгиб к мембран составляли 2.9 ± 0.4 Н/м, 1.1 ± 0.1 Н/м, 0.24 ± 0.02 Н/м, 0.056 ± 0.009 Н/м и 0.074 ± 0.019 Н/м соответственно.

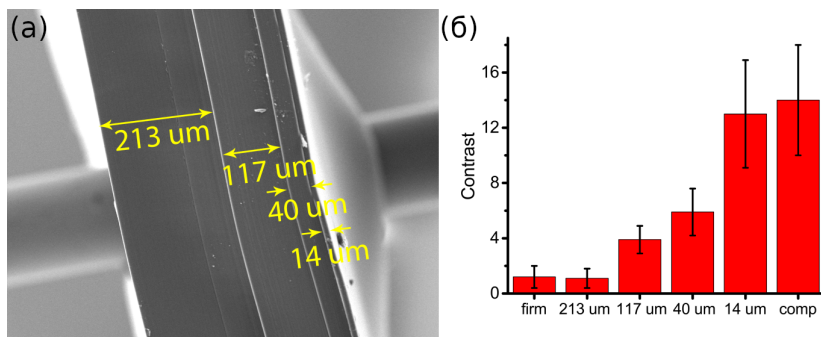


Рис. 15 — Зависимость контраста волн возбуждения, визуализированных методом картирования без красителей, от толщины ПДМС мембраны. (а) - СЭМ микрофотография среза мембран, использованных в исследовании. (б) - зависимость контраста метода от субстрата клеточной культуры. Для каждого значения ($N = 5$) указаны среднеквадратичные отклонения по выборке. По оси абсцисс отложены следующие категории: firm - твёрдые стеклянные подложки; мембраны из стандартного ПДМС, толщиной 213 мкм, 117 мкм, 40 мкм, 14 мкм; comp - 24 мкм мембрана из мягкого ПДМС.

В итоге оказалось, что контраст на тонких и мягких мембранах значительно выше, чем на толстых. Однако, на самой толстой мембране и на

стекле он оказался не равным нулю. Поскольку кардиомиоциты не могли деформировать субстраты этих образцов, это, по-видимому, является результатом регистрации изменений контуров клеток при их сокращении.

Чтобы продемонстрировать применимость на практике предлагаемого метода без красителей, с помощью него была измерена зависимость скорости волн возбуждения в культуре ткани сердца от концентрации блокатора натриевых каналов лидокаина. Снижение скорости на 50% наблюдалось при концентрации 0,5-1 мМ, а при концентрациях выше 2 мМ наблюдался полный блок проводимости. Аналогичные результаты были получены с Ca^{2+} -зависимым оптическим картированием. Согласованность результатов, полученных различными методами, еще раз показывает, что предложенный метод без химических меток способен успешно использоваться для оптического картирования и мониторинга волн возбуждения в тканях кардиомиоцитов, выращенных на тонких пленках из ПДМС.

В настоящей главе был предложен новый безметочный метод для мониторинга возбуждения в культуре ткани сердца. Использование эластичных полимерных мембран на границе раздела фаз вода-воздух позволило усилить сигнал сокращения кардиомиоцитов. Предложенный метод менее требователен к реагентам и оборудованию по сравнению с методами флуоресцентного оптического картирования, широко используемыми сегодня для этой цели (Bingen V. et al., 2014). Отсутствие токсичности красителя делает метод применимым для долгосрочного мониторинга активности возбуждения. Более того, предлагаемый способ не инвазивен в том смысле, что позволяет выполнять картирование возбуждения в закрытых чашках Петри. В отличие от методов флуоресцентного картирования, для картирования возбуждения без химических меток не требуется смена культуральной среды, что снижает риск загрязнения. Предложенный метод может быть принят для создания скрининговой платформы испытаний, способной непрерывно контролировать волны возбуждения в искусственной ткани сердца. Это может быть полезно не только для тестирования лекарств, но и для изучения процессов созревания сердечной ткани, полученной из индуцированных плюрипотентных клеток. Наблюдение за спиральными волнами сложной формы подтвердило возможность использования метода без меток для изучения аритмогенеза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. В диссертационной работе представлено исследование применения полимерных подложек для целей контроля структуры сердечной ткани и для изучения её функции. В частности, были открыты неизвестные ранее особенности взаимодействия неонатальных кардиомиоцитов и сердечных фибробластов с нановолоконными субстратами, на основании которых был разработан новый метод создания сердечных микротканей, воспроизводящих *in vitro* фибриллярную структуру естественного внеклеточного матрикса. В ходе диссертационного исследования была рассмотрена модель имплантации сердечных клеток в миокард, на

основании которой был определён параметр, значительно повышающий вероятность электрической интеграции имплантируемых клеток. Дополнительно были разработаны субстраты, улучшающие выживаемость клеток во время их инъекционной доставки. В последней главе диссертации описана разработка технологии визуализации волн возбуждения в сердечной ткани без использования красителей, основанная на взаимодействиях кардиомиоцитов с эластичными полимерными мембранами.

Выводы

1. Установлена специфика взаимодействия клеток сердца с нановолокнами, которая выражается в более выраженном обволакивании волокон кардиомиоцитами в сравнении с фибробластами.
2. Взаимодействие кардиомиоцитов и фибробластов сердца с нановолоконным матриксом приводит к формированию тканеподобных клеточных структур, демонстрирующих распространение волны возбуждения и сокращение в ответ на стимуляцию.
3. Неонатальные кардиомиоциты и светочувствительные клетки ChR2-HL1, прикрепленные к подложке, способны более эффективно формировать электрическую связь.
4. Разработан способ имплантации единичных клеток на наноносителях.
5. Разработан оптический способ картирования волн возбуждения в культуре кардиомиоцитов без использования флуоресцентных красителей.

Публикации автора по теме диссертации

- Balashov, V., Efimov, A., Agapova, O., Pogorelov, A., Agapov, I., and Agladze, K. High resolution 3D microscopy study of cardiomyocytes on polymer scaffold nanofibers reveals formation of unusual sheathed structure // *Acta biomaterialia*. – 2018 – vol. 68 – pp. 214-222. [Индексируется Scopus, Web of Science]
- Чепелева, Е.В., Балашов, В.А., Докучаева, А.А., Коробейников, А.А., Стрельников, А.Г., Лепендин, С.О., Павлова, С.В., Агладзе, К.И., Сергеевичев, Д.С., Покушалов, Е.А. Исследование биологической совместимости полилактидных нановолоконных матриц, заселенных фибробластами сердца, в эксперименте на мини-свиньях // *Гены и клетки* - 2017 - Т. 12 №4 - С. 62-68. [Индексируется Scopus, РИНЦ]
- Балашов, В.А., Низамиева, А.А., Цвеляя, В.А., Агладзе, К.И. Интеграция светочувствительных кардиомиоцитов в сердечные культуры как модель оптического биопеймейкера // *Гены и клетки* - 2018 - Т. 13 №4 - С. 43-50. [Индексируется Scopus, РИНЦ]
- Balashov, V.A., Gorbunov, V.S., Guria, K.G. and Agladze, K.I. Muscular Thin Films for Label-Free Mapping of Excitation Propagation in Cardiac Tissue // *Annals of Biomedical Engineering* - 2020 - pp. 1-13. [Индексируется Scopus, Web of Science]