

Федеральное государственное автономное образовательное  
учреждение высшего образования  
МОСКОВСКИЙ ФИЗИКО-ТЕХНИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ  
(НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

---

*На правах рукописи*

Балашов Виктор Андреевич

**Разработка биомиметических моделей сердечной ткани *in vitro***

Специальность 03.01.02 —  
«Биофизика»

Диссертация на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
кандидат физико-математических наук  
Агладзе Константин Игоревич

Долгопрудный — 2020

## Оглавление

	Стр.
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> . . . . .	<b>5</b>
<b>ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> . . . . .	<b>9</b>
0.1 Тканевая инженерия сердца . . . . .	9
0.2 Полимерные скаффолды . . . . .	15
0.3 Методы создания трёхмерных тканей . . . . .	19
0.4 Взаимодействия клеток и нановолоконных матриц . . . . .	21
0.5 Методы картирования электрической активности в сердечной ткани . . . . .	25
<b>МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b> . . . . .	<b>28</b>
0.6 Приготовление полимерных подложек для культивации клеток .	28
0.6.1 Материалы и реагенты . . . . .	28
0.6.2 Приготовление подвешенных волокон методом электроспиннинга . . . . .	28
0.6.3 Приготовление плоских нановолоконных матриц . . . . .	29
0.6.4 Приготовление микроподложек . . . . .	30
0.6.5 Приготовление тонких плёнок из PDMS с контролируемой толщиной . . . . .	31
0.7 Работа с культурой ткани . . . . .	32
0.7.1 Выделение и культивация неонатальных желудочковых крысиных кардиомиоцитов . . . . .	32
0.7.2 Культура ChR2-HL1 . . . . .	32
0.7.3 Стимуляция образцов со светочувствительными клетками	34
0.8 Методы получения и обработки данных . . . . .	34
0.8.1 Оптическое картирование волн возбуждения в культурах кардиомиоцитов . . . . .	34
0.8.2 Устройство оптической системы при картировании методом без красителя . . . . .	35
0.8.3 Иммуноцитохимия и флуоресцентная микроскопия . . . . .	36
0.8.4 Сканирующая электронная микроскопия . . . . .	36

	Стр.	
0.8.5	Фиксация и заливка образцов в эпоксидную смолу . . . . .	37
0.8.6	Гистология . . . . .	37
0.8.7	Просвечивающая электронная микроскопия . . . . .	38
0.8.8	Сканирующая зондовая нанотомография . . . . .	38
0.8.9	Атомно-силовая микроскопия . . . . .	39
0.8.10	Измерение механических свойств эластичных мембран . . . . .	40
0.8.11	Повышение контрастности и уменьшение шума . . . . .	40
0.8.12	Построение пространственно-временных развёрток . . . . .	41
0.8.13	Построение карт активации возбуждения . . . . .	41
0.8.14	Оценка контрастности волн сокращения . . . . .	42
0.8.15	Статистический анализ полученных данных . . . . .	43
<b>РЕЗУЛЬТАТЫ . . . . .</b>		<b>44</b>
<b>Глава 1. Особенности роста сердечных клеток на</b>		
	<b>нановолоконных подложках . . . . .</b>	<b>45</b>
1.1	Исследование волоконно-клеточных взаимодействий . . . . .	46
1.1.1	Исследование ультраструктурных особенностей взаимодействия отдельных сердечных клеток и нановолокон. . . . .	46
1.1.2	Исследование динамических взаимодействий отдельных кардиомиоцитов с отдельными нановолокнами . . . . .	57
1.2	Изучение формирования тканеподобных клеточных структур за счёт волоконно-клеточных взаимодействий . . . . .	63
1.2.1	Самоорганизация клеток на сетках нановолокон в трёхмерные структуры . . . . .	63
1.2.2	Иммуноцитохимическое исследование структуры кардиальных жгутов . . . . .	68
1.2.3	Электронно-микроскопическое и гистологическое исследование структуры кардиальных жгутов . . . . .	72
1.2.4	Оптическое картирование кардиальных жгутов . . . . .	81
1.2.5	Модельная васкуляризация кардиального жгута . . . . .	83

<b>Глава 2. Определение оптимальных условий имплантации</b>	
<b>сердечных клеток . . . . .</b>	<b>87</b>
2.1 Определение оптимальных условий имплантации пейсмекерных	
клеток в тканеинженерной модели сердечной ткани <i>in vitro</i> . . . . .	87
2.2 Микроносители для отдельных клеток в виде фрагментов	
нановолокон . . . . .	100
<b>Глава 3. Разработка метода картирования сердечных</b>	
<b>монослоёв без красителя на основе эластичных мембран</b>	<b>106</b>
3.0.1 Схема приготовления образцов . . . . .	106
3.0.2 Детектирование распространения возбуждения в МТП	
без использования красителей . . . . .	108
3.0.3 Сравнение метода картирования без красителя с $\text{Ca}^{2+}$ -	
зависимым оптическим картированием . . . . .	111
3.0.4 Зависимость контрастности метода без красителей от	
жёсткости субстрата . . . . .	114
3.0.5 Оптическое картирование волн возбуждения бытовой	
видеокамерой . . . . .	115
3.0.6 Модуляция скорости распространения возбуждения с	
помощью лидокаина . . . . .	117
3.0.7 Картирование без красителей в анизотропных клеточных	
культурах . . . . .	118
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ . . . . .</b>	<b>124</b>
<b>Список сокращений и условных обозначений . . . . .</b>	<b>126</b>
<b>Список литературы . . . . .</b>	<b>127</b>
<b>Список рисунков . . . . .</b>	<b>149</b>
<b>Список таблиц . . . . .</b>	<b>167</b>
<b>Приложение А. Исходные программные коды . . . . .</b>	<b>168</b>

## ВВЕДЕНИЕ

Тканевая инженерия направлена на создание принципиально новых методов терапии ряда патологических состояний, вызванных нарушением структуры мягких тканей [1; 2]. К таким патологиям относится инфаркт миокарда, в результате возникновения которого некротизируется и поражается фиброзом участок сердечной мышцы [3]. 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 [4]. Открытие технологии эпигенетического перепрограммирования [5] 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 [6]. Но получение тканей с нужной структурой не всегда возможно, в том числе из-за разнообразных 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 [7], и повторяющие фибриллярную структуру естественного окружения клеток [8; 9]. 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 субстра-

тов, 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 [10]. Для эффективной имплантации клеток необходимо повысить их выживаемость, закрепление в месте инъекции, образование электрической связи с окружающими клетками [11]. 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 [12; 13]. В настоящее время для визуализации распространения возбуждения в сердечной ткани чаще всего используются два типа методов: многоэлектродные матрицы (МЭМ) [14; 15] и флуоресцентное оптическое картирование [16; 17]. 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 [18; 19]. 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 субмикронным волокном.

2. Изучить формирование тканеподобных клеточных структур на основе ремоделирования сетки субмикронных волокон культурой кардиомиоцитов и фибробластов.
3. Разработать наноносители 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 специфичные 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 одной подложке.
4. Разработанный новый вид наночастиц 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 соискателем на 2 всероссийских и 7 международных конференциях и представлены в тезисных сообщениях этих конференций.

**Личный вклад.** Диссертационная работа выполнена автором лично. Автор лично проводил все эксперименты, обрабатывал полученные данные и принимал участие в написании статей для публикации результатов в специализированных научных журналах.

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

**Объем и структура работы.** Диссертация состоит из введения, 5 глав, заключения и приложения. Полный объем диссертации составляет 174 страницы, включая 63 рисунка и 3 таблицы. Список литературы содержит 180 наименований.



## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 0.1 Тканевая инженерия сердца

Многие социально важные патологические заболевания в приводят к частичному или полному некрозу и перерождению мягких тканей различных органов [20; 21]. Типичными примерами являются инфаркты, приводящие к омертвлению участков миокарда и их замещению соединительной тканью, или инсульта, ведущие к повреждению участков мозга [22]. Одним из решений этой проблемы может стать замена повреждённых тканей искусственными аналогами [1]. Внедрением таких подходов занимается регенеративная медицина - одна из областей трансляционных исследований, целью которой является внедрение методов тканевой инженерии и молекулярной биологии в традиционную медицину [23].

Центральную роль в развитии регенеративной медицины играют достижения тканевой инженерии, к которым можно отнести как создание модельных органов [24], позволяющих исследовать протекание заболеваний в контролируемых условиях и проводить предварительное тестирование лекарств, так и разработку функционально активных искусственных тканей, уже нашедших своё применение в клинической практике [25].

В частности, тканевая инженерия позволила создать релевантные модели ряда органов по концепции *organ-on-a-chip*, изолированно воспроизводящих конкретные их свойства [24]. Комбинация методов микротехнологии, микрофлюидики и клеточной биологии позволила изолированно воспроизвести физиологию человека в контролируемых условиях *in vitro*, точно регистрируя функциональные ответы на конкретные раздражители [27–29]. К наиболее заметным достижениям в этой сфере можно отнести модели кожи, сердца [30], лёгких, мозга [31].

Наиболее простым ораном для воспроизведения *in vitro* является кожа. Для достаточно точной имитации её структуры и функциональных ответов, нужных для изучения заболеваний кожного покрова или действий на него фармпрепаратов и косметики, модели кожи (*skin-on-a-chip*) должны обладать

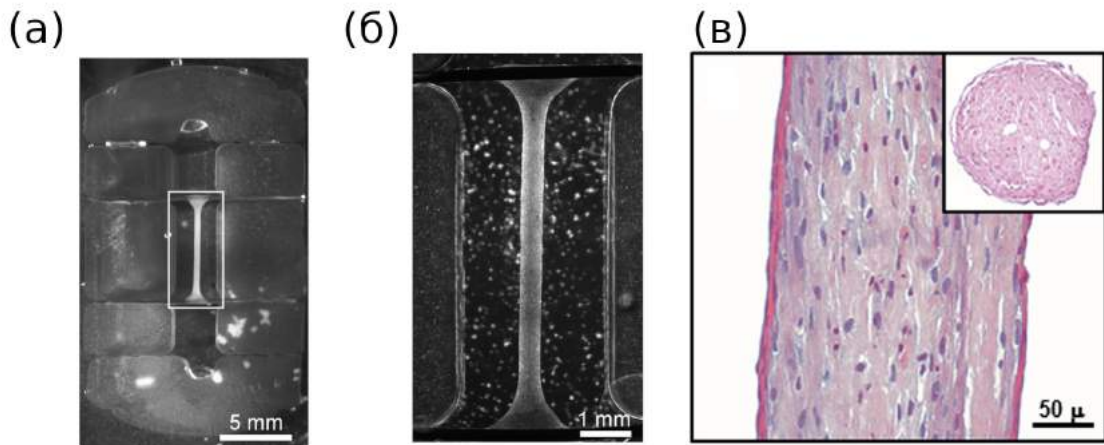


Рисунок 0.1 — Искусственно сконструированная трёхмерная сердечная ткань. (а) Изготовленная из полидиметилсилоксана форма для заливки гидрогеля с сердечными клетками. (б) Увеличенное изображение искусственной сердечной ткани, выделенное белым прямоугольником на панели а. Конструкция прикреплена к титановым проводам. (в) Гистологическое исследование спустя 15 дней культивации. Окраска гематоксилином и эозином продольного и поперечного сечений искусственного миокарда. Из [26].

достаточной сложностью. Наиболее совершенные модели на данный момент состоят из трёх компонентов - эпидермиса, дермы и эндотелия, гидрогели и клеточные компоненты для которых могут быть получены из конкретного человека [32; 33]. С помощью таких моделей удалось смоделировать протекание воспаления кожи и её отёка, исследовать эффективность лекарств и косметики, исследовать её барьерную функцию [34].

Модели сердечной ткани чаще всего пытаются имитировать распространение волны возбуждения либо способность к сокращению миокарда млекопитающих. Они получили наибольшее распространение в виде плоских слоёв [35] и трёхмерных цилиндрических тканей на основе гидрогелей [26]. Для изучения закономерностей распространения волн возбуждения по сердечной ткани из арсенала тканевой инженерии лучше всего подходят монослои кардиомиоцитов, которые позволили обнаружить ряд закономерностей и механизмов возникновения патологий перечислить [36]. Для изучения сократимости искусственного миокарда наиболее подходят ткани на основе гидрогелевых матриц. Выращивание кардиомиоцитов с таких условиях позволило получить из незрелых сердечных клеток, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных клеток человека, кардиомиоциты со взрослым фенотипом [37].

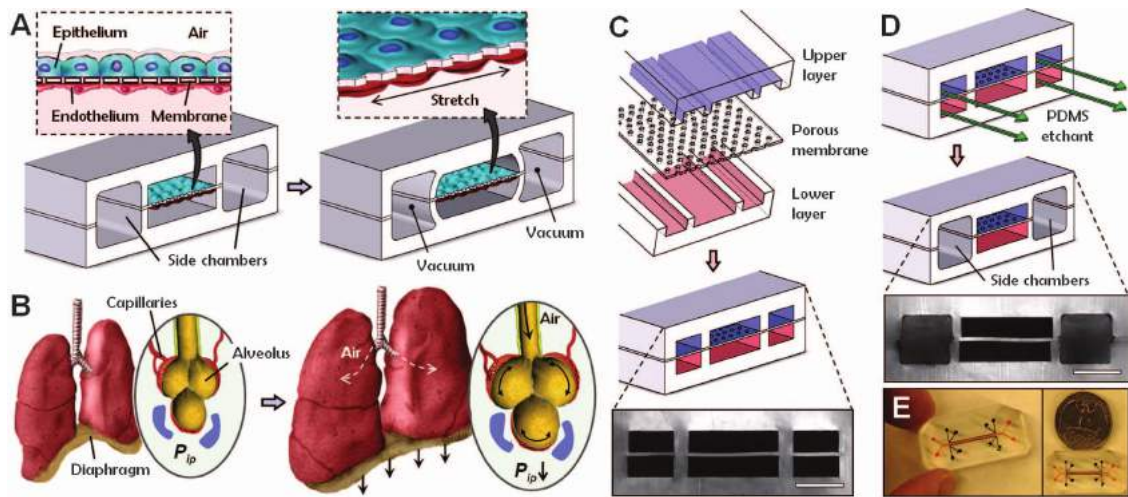


Рисунок 0.2 — Схема устройства микроприборов типа лёгкое-на-чипе. (А) Микроустройство для имитации лёгких состоит из микроканалов в ПДМС и тонкой, пористой ПДМС мембраны. Устройство воссоздаёт движения при дыхании, понижая давление в боковых камерах и вызывая механическое растяжение мембраны ПДМС, образующей альвеолярно-капиллярный барьер. (В) При вдыхании сокращение диафрагмы вызывает снижение внутриплеврального давления, что приводит к растяжению легкого и физическому растяжению альвеолярно-капиллярного интерфейса. (С) Схема получения трёх параллельных микроканалов, разделённых мембраной толщиной 10 мкм, содержащей поры с эффективными диаметрами 10 мкм. Шкала масштаба 200 мкм. (D) Вид готового изделия. Шкала масштаба 200 мкм. (E) Изображения фактического микрофлюидного устройства «лёгкие на чипе», вид сверху. [27].

Модели лёгких на чипе («lung-on-a-chip») воспроизводят наиболее важные структурные, функциональные и механические особенности интерфейса между альвеолами и капиллярами. Например, в работе [27] показана модель лёгкого в виде двух прямоугольных камер, разделённых тонкой пористой мембраной из полидиметилсилоксана. В камере, моделирующей альвеолу, мембрана была засеяна человеческим альвеолярным эпителием и заполнена воздухом, а в камере, имитирующей капилляр, пористая мембрана была засеяна эндотелием и заполнена кровью. Так же в этой модели присутствовали боковые каналы, позволяющие имитировать дыхание путём сжатия и растяжения основной камеры.

Такая модель позволила воспроизвести некоторые процессы происходящие при лёгочной воспалительной реакции, как высвобождение цитокинов и повышенную скорость деления эпителиальных клеток. Модель была способна демонстрировать ответ на инфекцию путём повышения количества иммунных

клеток рядом с альвеолой. В дополнение, модели лёгкого на чипе нашли своё применение в изучении токсичности лекарств на доклинической фазе клинических исследований.

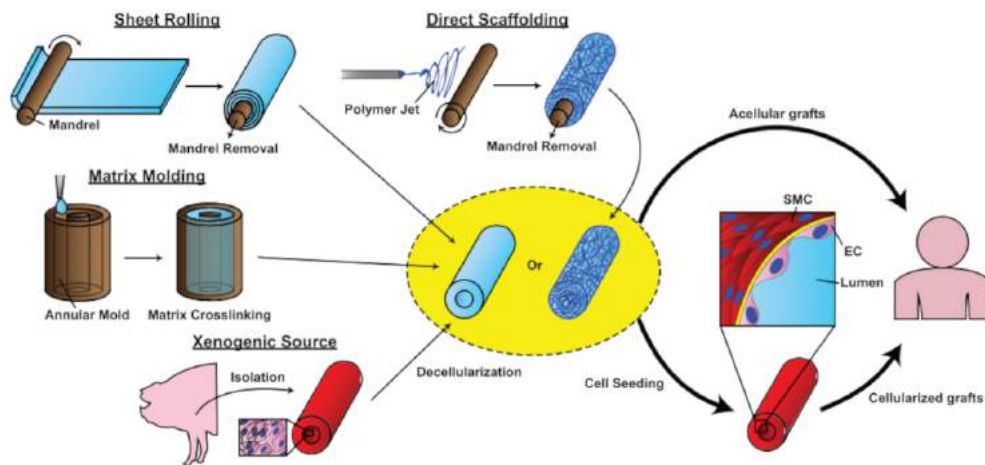


Рисунок 0.3 — (а) Подходы к изготовлению искусственных сосудов. Трубчатые структуры, которые напоминают артерии (диаметром  $<6$  мм), могут быть получены из ксеногенного сырья или изготовлены из биоматериалов посредством листовой прокатки, формовки или прямого скаффолдинга. После изготовления на трансплантаты высеваются эндотелиальные и гладкомышечные клетки, после чего они кондиционируются биомеханическими стимулами перед имплантацией. Из [38].

Сосудистые органоиды (vessel-on-a-chip) играют важную роль в интенсификации исследований заболеваний сердечно-сосудистой системы [39]. Именно патологии сосудов занимают центральную роль не только в развитии болезней сердца, но и мозга, и даже конечностей [3; 22]. Таким образом, физиологичная модель сосудов обладает высокой практической ценностью при изучении механизмов формирования патологий сосудов и проведения испытаний при разработке лекарств. Применение пациент-специфичных клеточных культур позволит изучать ответ сосудов на конкретное лечение и выбирать наиболее оптимальное [39].

Такие модели могут быть созданы с помощью методов микрофлюидики [38]. В этом случае модели сосуда представляют из себя канал, прорезанный в толще полидиметилсилоксана. Изнутри этот канал заселён гладкомышечными клетками и эндотелием. К достоинствам и недостаткам данной модели относятся использование инженерных подходов и простота изготовления. Большой интерес представляют самоорганизующиеся трёхмерные органоиды кровяных

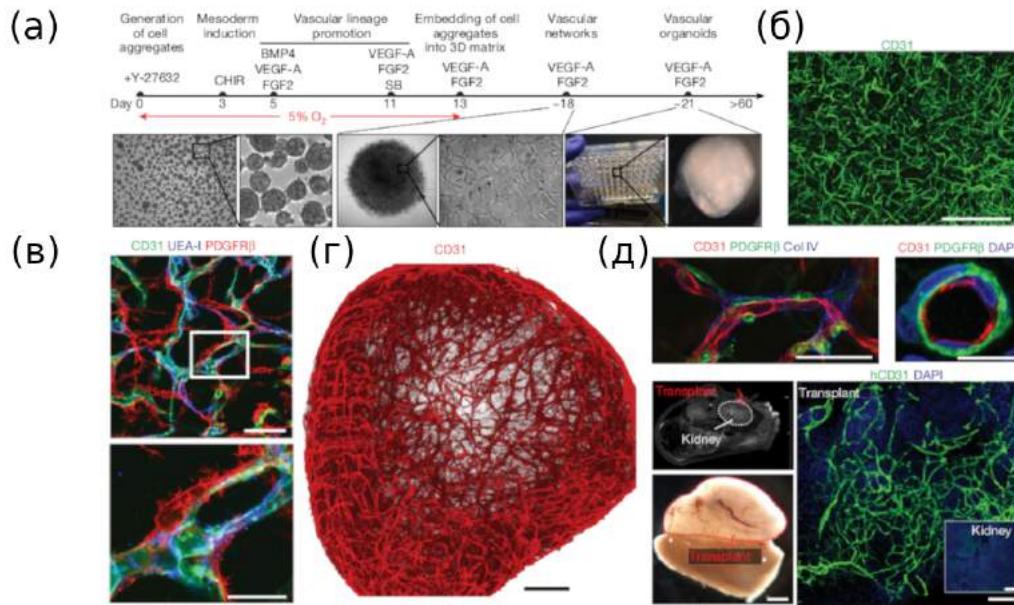


Рисунок 0.4 — (а) Протокол генерации сосудистых органоидов из стволовых клеток человека. (б) Репрезентативная иммунофлюоресценция CD31-экспрессирующих эндотелиальных клеток показывает образование сосудистых сетей (клетки NC8). (в) Эндотелиальные сети (CD31 и UEA-I) покрыты перицитами (PDGFR $\beta$ ) (клетки NC8). (г) 3D реконструкция капиллярной организации (CD31) в сосудистом органоиде (клетки NC8). (д) - эндотелиальные трубки (CD31) в сосудистых органоидах (клетки NC8), покрытые перицитами (PDGFR $\beta$ ) и базальной мембраной (коллаген типа IV (Col IV)). (е) трансплантация сосудистых органоидов человека (клетки NC8) мышам NSG. Слева вверху, место трансплантации с помощью МРТ. Внизу слева целая трансплантация после изоляции. Из [39].

сосудов человека из плюрипотентных клеток [39]. Такие органоиды содержат эндотелиальные клетки и перициты, которые самоорганизуются в капиллярную сеть, окружённую базальной мембраной, и корректно воспроизводят структуру и функцию сосудов человека. При трансплантации в животных такие органоиды формируют стабильную сеть сосудов, перфузируемую кровью. При трансплантации в мышью, большую диабетом, искусственно выращенные капилляры воспроизводили особенности сосудов человека, поражённых диабетом. Таким образом, сосудистые органоиды позволяют моделировать и идентифицировать регуляторы патологии сосудов, возникающей при диабете.

В последние годы подходы тканевой инженерии и молекулярной биологии нашли реальное применение в клинической практике для лечения заболева-

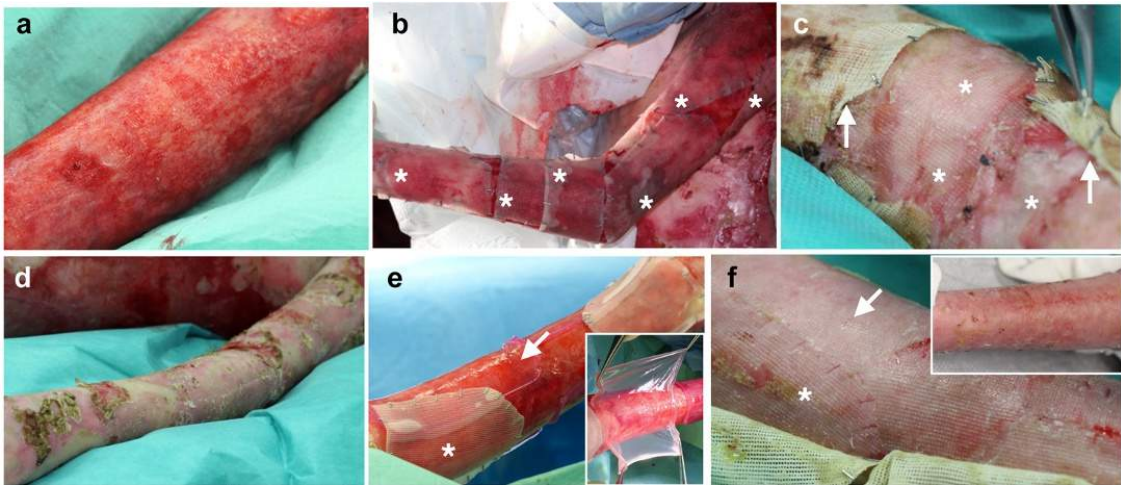


Рисунок 0.5 — Регенерация эпидермиса трансдуцированными культурами кератиноцитов. (а) Подготовка ложа кожной раны во время трансплантации. (б) Трансплантация на левую руку эпидермальных трансплантатов с культуры на пластике, установленных на неприлипающей марле (звездочки). (с) Приживленный эпидермис (звездочки) проявляется при удалении марли (стрелки) через десять дней после пересадки. (d) восстановленный эпидермис на левой руке через 1 месяц. (е) трансплантация и приживление кожных трансплантатов на левой ноге. (f) полная эпидермальная регенерация проявляется через 1 месяц.

Из [40].

ний, с трудом поддающихся терапии другими методами. В частности, важным достижением является лечение пациента с генетическим заболеванием кожи - пограничным буллезным эпидермолизом, выражающимся в наличии мутации в гене компонента базальной мембраны ламинина-332 [40]. Это заболевание приводило к высокой ранимости кожи пациента, полная потеря эпидермиса составляла 60%, что угрожало его жизни. Подход к лечению этого пациента заключался в взятии у него биопсии кожи, из которой была выделена культура кератиноцитов. С помощью ретровирусного вектора в клетки был внедрён рабочий ген LAMB3, кодирующий субъединицу бета 3 ламинина. После этого с помощью методов тканевой инженерии был выращен функциональный аналог кожи, состоящий из здоровых кератиноцитов в фиброновом гидрогеле в качестве внеклеточного матрикса. Такой способ позволил восстановить 80% кожного покрова пациента.

Однако подходы тканевой инженерии по-прежнему не позволяют создать функционально активные и клинические релевантные аналоги более сложно организованных тканей, например, миокарда [41]. Но учитывая тренды разви-

тия биотехнологий, материаловедения и других смежных наук, в ближайшем будущем такие аналоги будут созданы.

## 0.2 Полимерные скаффолды

В типичном тканеинженерном конструкте можно выделить 3 компонента: специализированные клетки, биосовместимый материал (играющий роль внеклеточного матрикса) и сигнальные молекулы [1; 2]. Клеточная биология достигла значительных успехов в получении клеточных компонентов для искусственных тканей. Открытие технологии эпигенетического перепрограммирования [5] сделало доступными аутологичные стволовые клетки взрослых организмов для использования в клеточно-инженерных конструкциях. Получаемые таким образом индуцированные стволовые клетки (ИПСК) способны дифференцироваться в широкий спектр соматических клеток [42].

Прогресс в улучшении характеристик биоматериалов не менее важен для развития тканевой инженерии, как и развитие методов получения специфичных типов клеток [43]. Скаффолды в тканеинженерных конструкциях играют роль внеклеточного матрикса, обеспечивают механическую стабильность имплантата, сайты для прикрепления и роста клеток, являются источником биомеханических сигналов, управляющих клеточными процессами, например, их дифференцировкой или апоптозом [44]. Основными видами клеточных субстратов в тканевой инженерии являются гидрогели, нановолокна, пористые губки, децеллюризованные матриксы, каждый из которых имеет свои достоинства и недостатки [45].

В последнее время роль гидрогелей в тканевой инженерии в качестве основы внеклеточного компонента значительно повысилась [46]. Гидрогели представляют из себя трёхмерные гидрофильные полимерные цепи в жидкости, сшитые друг с другом специально подобранными связывающими агентами [47]. Чаще всего используются гидрофильные молекулы, благодаря чему гидрогели способны поглощать большие количества жидкости. Именно высокое содержание воды, а так же биосовместимость и хорошая способность к диффузии

делают некоторые гидрогели подходящими для выращивания и инкапсуляции клеток.

Гидрогели могут иметь нужные для решения задач тканевой инженерии физические (механика, жесткость, деградация, диффузия) и биологические свойства (адгезия клеток, пролиферация, дифференцировка, фенотип, распределение сигнальных молекул, факторов роста). Эти свойства гидрогелей зависят от типа используемых макромолекул, содержания жидкости, плотности, связанности молекулярных цепей, ассоциации с другими активными веществами [48].

Полимеры могут быть как натурального так и синтетического происхождения. Естественно полученные полимеры обладают преимуществом, заключающимся в биосовместимости, наличием сайтов для взаимодействия с клетками, деградируемости, биоактивности [46; 49]. Особо стоит отметить тот факт, что гидрогели, выделенные из конкретной ткани, будут содержать присущие ей пептидные последовательности и сигнальные молекулы, легко определяемые рецепторами и приводящими к поведению клеток, свойственному для этой ткани. Их недостатком является вариабельность свойств в зависимости от источника получения, не всегда подходящие механические свойства, иммуногенность [50].

Искусственный синтез полимеров позволяет получать их в больших количествах, точно контролировать их состав и физические свойства, такие как жёсткость, плотность, пористость, проводимость, что важно для стандартизации применения гидрогелей на практике [50]. В последние годы появились синтетические полимеры, одобренные контролирующими органами для применения на людях [51]. Но такие макромолекулы не имеют сайтов распознавания клетками, что является их основным недостатком. Это возможно преодолеть с помощью дополнительной химической модификации, но на данный такие методы недостаточно развиты.

Достоинством гидрогелей любого происхождения является возможность диффузии кислорода и питательных веществ внутри тканеинженерного конструкта [52; 53]. Другим важным преимуществом является лёгкость придания конструктам из гидрогелей нужной формы, что особенно важно в тканевой инженерии. Процесс производства придаёт искусственным тканям финальные размер, топографию, жёсткость, пористость [54]. Такие свойства гидрогелей



позволяют получать с их помощью трёхмерные ткани с максимальным на данный момент объёмом.

Таблица 1 — Физико-химические свойства полилактида и других биополимеров. <sup>a</sup>:  $\rho$ - плотность полимера,  $\sigma$ - предел прочности,  $E$ - модуль упругости,  $\varepsilon$ - предельное растяжение,  $\sigma^*$ - удельная прочность на разрыв,  $E^*$ - удельный модуль упругости при растяжении,  $T_g$ - температура стеклования,  $T_m$ - температура плавления. <sup>b</sup>: ам - аморфное вещество, не имеющее точки плавления. Из [55], [56].

Величина <sup>a</sup>	Ед. изм.	PLA	PLLA	PDLLA	PGA	PDLLA/ PGA 1:1	PDLLA/ PGA 3:1	PCL	PНВ
$\rho$	г/см <sup>3</sup>	1.21–1.25	1.24–1.30	1.25–1.27	1.50–1.71	1.30–1.40	1.3	1.11–1.15	1.18–1.26
$\sigma$	МПа	21–60	15.5–150	27.6–50	60–99.7	41.4–55.2	41.4–55.2	20.7–42	40
$E$	ГПа	0.35–3.5	2.7–4.14	1–3.45	6.0–7.0	1–4.34	1.38–4.13	0.21–0.44	3.5–4
$\varepsilon$	%	2.5–6	3.0–10.0	2.0–10.0	1.5–20	2.0–10.0	2.0–10.0	300–1000	5.0–8.0
$\sigma^*$	Н* <sub>м</sub> /г	16.8–48.0	40.0–66.8	22.1–39.4	40.0–45.1	30.9–41.2	31.8–42.5	18.6–36.7	32.0–33.9
$E^*$	кНм/г	0.28–2.80	2.23–3.85	0.80–2.36	5.00–4.51	0.77–2.14	1.06–2.12	0.19–0.38	2.80–2.97
$T_g$	°С	45–60	55–65	50–60	35–45	40–50	50–55	(-60)-(-65)	15.0–5.0
$T_g$	°С	150–162	170–200	ам <sup>b</sup>	220–23	ам <sup>b</sup>	ам <sup>b</sup>	58–65	168–182

Высокое структурное свойство гидрогелей с макромолекулярным компонентом внеклеточного матрикса некоторых тканей позволило уже сейчас найти им реальные применения в клинической практике. В частности, с помощью гидрогелей возможно воспроизводить структуру природных гликозаминогликанов, что важно для создания искусственных соединительных тканей, кожи [40], роговицы глаз, костей [57]. В качестве другого заметного достижения, полученного на основе гидрогелей, можно отметить искусственно выращенную микроткань сердечной мышцы с фенотипом клеток, присущим взрослым кардиомиоцитам [37].

Другим важным типом субстратов для роста клеток являются волоконные подложки, которые также нашли достаточно широкое применение в тканевой инженерии и медицине [58]. Ценность матриксов такого типа заключается в том, что они имитируют свойства фибриллярного компонента во внеклеточном матриксе, придавая искусственным тканям большую механическую стойкость, а также обеспечивая клетки биомеханическими сигналами, управляющими их ростом и дифференцировкой [9]. По сравнению с гидрогелями, нановолоконные субстраты обладают значительно большей прочностью на растяжение. Можно провести параллель с естественным внеклеточным матриксом,

где коллагеновые фибриллы сопротивляются растяжению ткани, а гель из гликозаминогликанов препятствует её сжатию [59].

Наиболее популярным методом получения нановолоконных субстратов является электроспиннинг или электроформование [7]. Коротко, он заключается в подаче раствора полимера через тонкую металлическую иглу, к которой прикладывается напряжение порядка 10 кВ. Под действием электростатических сил из капли вырывается струя растворённого полимера по направлению катоду, которая расщепляется на множество более мелких струй под действием сил отталкивания. В процессе перемещения от кончика иглы к коллектору растворитель испаряется, в результате чего получаются полимерные волокна. Дополнительные приспособление, как параллельные электроды или вращающийся катод позволяют получать ориентированные волокна [36; 60]. Этот процесс позволяет контролировать структуру и физико-химические свойства волокон.

Получаемые таким способом подложки имитируют внеклеточный матрикс, имеют высокое соотношение площади-к-объёму, высокую пористость. Их действие на клетки может быть изменено с помощью дополнительной функционализации биоактивными молекулами. В качестве материалов для волокон могут быть использованы полимеры как синтетического, так и искусственного происхождения [61]. К наиболее популярным полимерам относятся полилактид, поликапролактон, полигликолид, полигидроксибутират, коллаген, фиброин шёлка [56]. Механические и физические свойства этих полимеров представлены в таблице 1.

Оборудование для электроспиннинга широко доступно, большое количество полимеров подходят для этой цели. Параметры полимеров (скорость деградации, жёсткость, эластичность, проводимость, биосовместимость, биоактивность) Другим достоинством электроспиннинга является возможность масштабирования его производства при увеличении нужды в нановолоконных подложках [61].

К недостаткам этого метода можно отнести тот факт, что из-за особенностей технологического процесса, он наиболее приспособлен для получения двумерных подложек [62]. Существуют методы создания трёхмерных искусственных тканей на основе нановолоконных субстратов, но их применение на данный момент очень ограничено.

Нановолоконные подложки нашли ряд применений как в научных исследованиях, так и в клинической практике. Самым простым примером применения является контроль за ориентацией клеток в монослое, например кардиомиоцитов, что нужно для создания более релевантных моделей сердечной ткани [36]. На *in vivo* моделях был проведён ряд экспериментов, направленных на регенерацию инфарктного шрама на сердце крысы с помощью прикрепления на него тонкой нановолоконной подложки со слоем сердечных клеток [63; 64].

### 0.3 Методы создания трёхмерных тканей

Ввиду трёхмерности типичных поражённых областей в мягких тканях органов, необходимым условием для большинства клинических применений является возможность создания тканевого каркаса таким образом, чтобы после посадки нужного типа клеток, он способствовал формированию трёхмерных тканей.

Легче всего трёхмерный конструкт получить из гидрогеля, залив его смесь с нужными клетками в шаблон требуемой формы [65]. Применение гидрогелей позволяет увеличить интенсивность диффузии нутриентов, увеличивая таким образом объём искусственных тканей. Это подходит для создания небольших фрагментов тканей или тканей с простой плоской топологией, такой как кожа [40; 66]. Однако для создания тканей большего какого объёма необходимо создание сосудистой сети [67], для чего на данный момент не разработано универсального и эффективного подхода. Так же существуют сложности в придании необходимой структуры некоторым типам тканей на основе гидрогелей. Например, для выращивания лоскута сердечной ткани с кардиомиоцитами со взрослым фенотипом длиной 6 мм, потребовалось её растяжение и электрическая стимуляция с увеличивающейся интенсивностью в течение 4 недель [37]. Ткани на основе гидрогелей обладают неудовлетворительными для некоторых задач механическими характеристиками ввиду низкой прочности полимеров в используемых концентрациях [68]. В итоге, эта технология не позволяет воспроизводить многие клеточные структуры, поэтому нуждается в доработке [69].

Сфероиды из гидрогелей активно используются в 3D аддитивной печати органов [70]. Наибольшим достоинством этого метода является применение методов САПР, позволяющих создавать органы в соответствии с компьютерной моделью. Комбинация сфероидов с клетками нескольких типов потенциально может позволить печатать ткани со сложной структурой, например с сосудами [71; 72]. Возможность реализации данной концепции была продемонстрирована при печати сердца, имеющего крупные сосуды и внешнюю структуру настоящего органа. Однако получившаяся структура миокарда пока не позволяет найти ему практических применений [73]. Таким образом, технология трёхмерной печати применима для создания ограниченного количества тканей. Для тканей со сложной структурой и разнообразным клеточным составом не разработаны способы воспроизводства их физиологических и биохимических особенностей во время трёхмерной печати.

Децеллюляризация является другой перспективной технологией создания трёхмерных тканей [74]. В этом методе используются физико-химические методы для удаления всего клеточного материала из конкретной ткани и получения естественного внеклеточного матрикса. Такой матрикс может иметь структуру готового органа и создаёт необходимое физическое и биохимическое окружение для роста и дифференцировки клеток конкретного типа. Как и другие методы, этот подход обладает своими недостатками как необходимость перфузии матрикса суспензией клеток в питательном растворе и одновременное их осаждение на выбранный децеллюляризованный каркас. Это приводит к невозможности посадки клеток на матриксы со сложной структурой и применимости метода для создания просто организованных тканей, как кожа, кости. Перспективным подходом является создание гидрогелей из децеллюляризованных матриксов и последующее их использование в печати органов [75].

Несмотря на значительную популярность нановолоконных подложек в тканевой инженерии, их использование ограничено трудностями при создании на их основе трёхмерных тканей [76; 77]. Размер пор в традиционных толстых двумерных субстратах слишком мал, для заполнения их клетками, поэтому клеточные культуры могут развиваться только на поверхности. Но, всё же существует ряд подходов, позволяющих использовать электроспиннинг для получения трёхмерных матриксов. Можно выделить многослойный электроспиннинг, постобработку двумерных подложек, электроспиннинг по

трехмерному шаблону, электроспиннинг на жидкую фазу, электроспиннинг с порообразователем и самосборку волокон.

Субстраты, полученные постобработкой двумерных подложек или электроспиннингом по шаблону являются квази-трёхмерными, так как такие субстраты представляют из себя изогнутые поверхности. При получении матриц остальными методами, существуют значительные сложности в контроле за формой и структурой получаемых образцов, эффективном выращивании на них клеток.

В этой связи значительный интерес представляет исследование самосборки тканей - важного «снизу-вверх» подхода, так же широко исследуемого и используемого в физике, химии, материаловедении и биологии. С помощью этого подхода удалось получить нановолоконные подложки с чёткой гексагональной сотовой структурой. Также есть работы, демонстрирующие самосборку тканей. Например, в [78] представлен эксперимент по самосборке хондроцитов телёнка в хрящеподобную структуру на агарозном геле. А в работе [79] показано, как с помощью приложения давления можно управлять самосборкой хондроцитов и получать хрящи с механическими свойствами, сравнимыми с натуральными хрящём.

#### 0.4 Взаимодействия клеток и нановолоконных матриц

Взаимодействие клеток с физическим окружением можно рассмотреть как взаимное двунаправленное влияние подложек и клеток друг на друга. Полимерные субстраты модулируют прикрепление клеток, их морфологию, миграцию, дифференцировку. В свою очередь клетки могут подвергать субстрат ремоделированию, заключающемуся в его деформации и деградации. В этом разделе будут рассмотрены некоторые аспекты таких взаимодействий.

Наиболее важным взаимодействием является прикрепление опорно-зависимых клеток к субстрату. Это происходит с помощью так называемых фокальных контактов (ФК) [80–82]. Они представляют из себя кластеры адгезионных молекул - интегринов, трансмембранных белков, соединяющих внеклеточный матрикс с актиновым цитоскелетом клетки [83; 84]. Интегрины соединяются с RGD последовательностями вне клетки и посредством адап-

терных белков крепятся к клеточному кортексу [85]. Структура фокальных контактов влияет на адгезию клеток, их миграцию, пролиферацию и поведение в общем.

У мышечных клеток присутствует дистрофин-ассоциированный гликопротеиновый комплекс (ДАГ-комплекс) [86], дополнительно прикрепляющий их актомиозиновый комплекс к внеклеточному матриксу [87]. Это увеличивает площадь прикрепления миоцитов по сравнению с другими типами клеток.

Для возможности прикрепления клеток, субстрат должен быть иметь участки связывания клеток - RGD последовательности, состоящие из аминокислот L-аргинина, глицина и L-аспарагиновой кислоты [85]. Такие участки имеют в основном натуральные полимеры, как фиброин шёлка, спидроин [88]. Не имеющие участков связывания материалы должны быть покрыты адгезивным белком, таким как коллаген, фибронектин, ламинин.

Интенсивность взаимодействия зависит от плотности участков связывания на материале. Она зависит от состава материала и отношения площадь поверхности/объём. Прикрепление к подложкам с большим отношением площади поверхности при прочих равных будет крепче. В частности, это справедливо для нановолоконных подложек [89]. В работе [90] было показано, что рост мышечных миобластов C2C12 на подвешенных нановолокнах приводит к формированию более удлинённых кластеров фокальных контактов и к более высоким скоростям миграции по сравнению с ростом клеток на плоских подложках.

После прикрепления клетки к подложке на её морфологию влияют жёсткость и топография поверхности субстрата. Для контроля за архитектурой ткани применяют так называемые микротекстурированные поверхности. Они могут представлять из себя механически обработанную поверхность [91], нановолокна на плоском субстрате [36] или поверхность с выступами, полученную с помощью использования кремниевого шаблона и мягкой литографии. Все эти подходы позволяют сформировать выступы на плоской поверхности, задающие направление элонгации клеток. При этом на анизотропию культуры будут влиять степень ориентации выступов, их высота, среднее расстояние между ними, а так же радиус кривизны [92]. В частности было показано, что на выступах с острыми углами клетка вытягивается, а на выступах со скруглёнными углами клетка имеет примерно ту же форму и площадь, что без выступов, но ориентирует цитоскелет [92].

Жёсткость субстрата значительно влияет на морфологию клеток. В [93] было показано, что морфология гладкомышечных клеток, выращенных в ПЭГ-фибриновых гидрогелях с разными жёсткостями, менялась от распластанной в гидрогеле с  $E = 11.6$  (модуль Юнга) кПа до практически сферической в жёстком гидрогеле с  $E = 497$  кПа. В работе [94] было показано, что неонатальные кардиомиоциты крысы формируют более зрелый фенотип и имеют большую силу сокращений на субстратах с жёсткостью натурального миокарда, 10 кПа, чем на более мягких и жёстких подложках. Работа [95] продемонстрировала, что дифференцировка индуцированных плюрипотентных клеток в кардиомиоциты более эффективна на более мягких субстратах из ПДМС по сравнению с покровными стёклами.

Функциональные различия между монослоями кардиомиоцитов на матриксах с разной твёрдостью были показаны в работе [96]. Она показала, что вероятность спонтанной активности в монослое крысиных кардиомиоцитов ниже при их культивации на более мягком субстрате из ПДМС с  $E < 300$  кПа по сравнению с жёстким субстратом из стекла с  $E \sim 30$  ГПа). Так же было выяснено, что увеличение жёсткости коллагеновых волокон снизило скорость миграции фибробластов [97].

Взаимодействия клеток с субстратами не ограничиваются влиянием подложки на их структуру. При определённых условиях клетки так же могут изменять строение окружающего их матрикса. Прежде всего это проявляется в деформации подложки и её деградации.

Распластывание клетки по субстрату вызывает натяжение её цитоскелета [59]. Напряжение клеточного кортекса передаётся на нижележащий субстрат посредством фокальных контактов и оказывает на него сжимающее действие. Миоциты и кардиомиоциты могут дополнительно деформировать подложку сокращением акто-миозинового комплекса в пределах расположения фокальных контактов. При культивации таких клеток на субстратах с модулями Юнга менее  $E < 10$  кПа, будет происходить их деформация [94]. Этот эффект используется в traction force microscopy для измерения силы сокращения отдельных клеток [99; 100].

Посадка на субстрат культуры из миллионов клеток может вызывать его макроскопические деформации. В работе [101] было показано, что сила сокращения фибробластов после посадки на мукополисахаридно-коллагенную губку

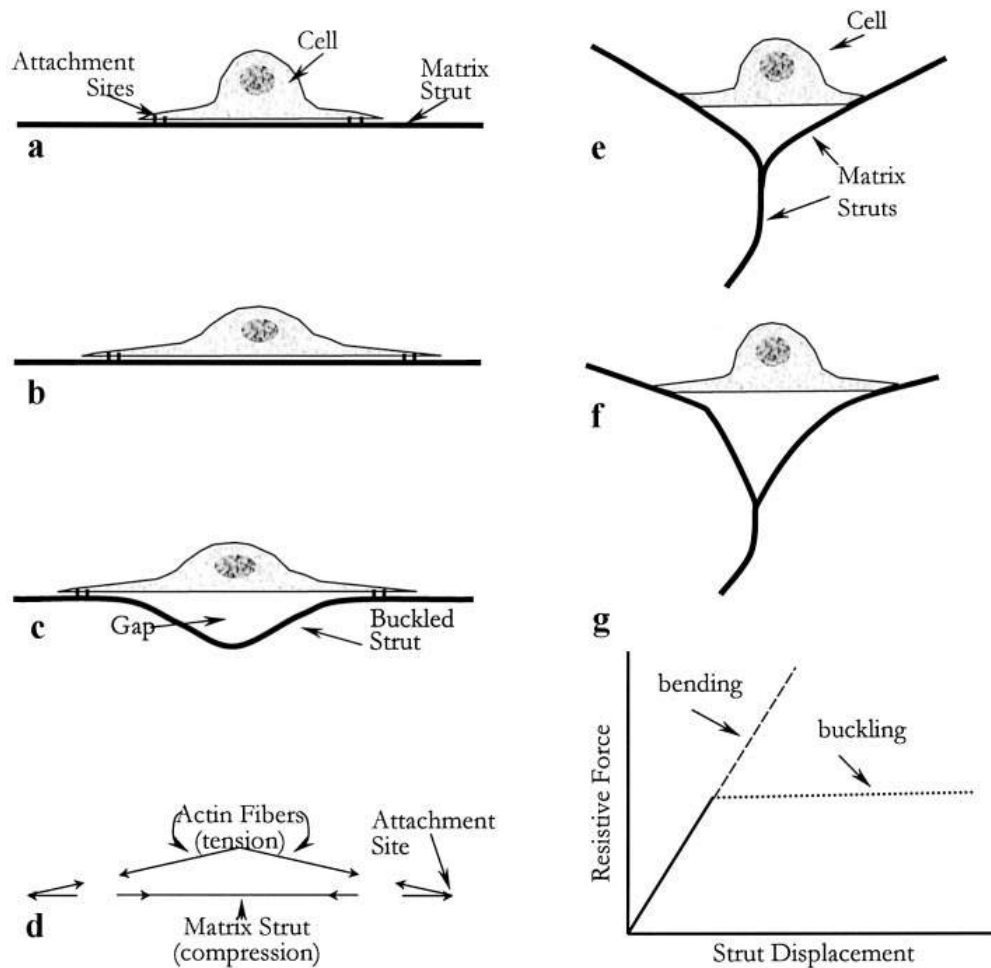


Рисунок 0.6 — (a, b) Схемы удлинения клетки, показывающие сайты прикрепления. (c) Схема изгиба филамента матрикса из-за силы, развиваемой актиновыми волокнами в клетке, показывающая зазор между клеткой и филаментом. (d) Диаграмма, показывающая натяжение актиновых волокон, напряжение в матриксе и результирующий баланс сил в месте прикрепления. (e, f) Схемы, показывающие стягивание клеткой нескольких филаментов. (g) Схематический график силы сопротивления, создаваемой филаментами матрицы для заданного смещения, создаваемого клеткой. Обратите внимание, что после начала потери устойчивости сила сопротивления не увеличивается значительно при увеличении деформации. Из [98].

возрастает со временем до достижения максимальной силы. Нарастание силы описывается формулой:

$$F = F_{\max}(1 - e^{-t/\tau})$$

Константа времени  $\tau$  этого процесса в статье [101] составила 5.7 часов. В этом эксперименте сила сокращения, приходящаяся на одну клетку, по порядку



величины составила  $\sim 1$  нН, она не зависела от количества клеток на субстрате и его жёсткости. Стоит отметить, что это нижняя оценка силы сокращения одного фибробласта, так как клетки были не полностью ориентированы в одном направлении. Схема сокращения субстрата клеткой показана на Рисунке 0.6.

Сокращение фибробластов имеет важную биологическую роль. В частности, при заживлении ран коллективное сокращение фибробластов приближает края пореза друг к другу.

При посадке культур на цельные субстраты клетки могут вызывать только их деформацию. Однако, при посадке клеток на матриксы, состоящие из отдельных элементов, могут происходить более значительные трансформации их структуры. Такими матриксами являются, например, нановолоконные подложки.

При взаимодействии с двумя параллельными волокнами, миобласты стягивают их, на чём основан метод измерения сил прикрепления клеток [102]. Влияние такого поведения при большом количестве клеток на данный момент исследовано не было.

## 0.5 Методы картирования электрической активности в сердечной ткани

Волны возбуждения в сердце человека координируют синхронные сокращения его камер, что нужно для обеспечения физиологически нормального тока крови по кровеносным сосудам камер. Нарушения в распространении волн возбуждения могут привести к возникновению аритмий, фибрилляции или внезапной сердечной смерти. В частности, было показано, что возникновение спиральных волн возбуждения в сердечной ткани приводит к возникновению одних из самых опасных видов аритмий в желудочках сердца. Поэтому исследование особенностей распространения волн возбуждения в сердечной ткани играет важную роль в исследованиях возникновения и терапии аритмий в сердце.

Микроэлектродные матрицы являются одним из самых ранних способов регистрации пространственного паттерна возбуждения клеток. Они представ-

ляют из себя отдельные электроды для записи внеклеточного потенциала, помещённые в узлы сетки. Ранние матрицы имели плохое пространственное разрешение и малое количество электродов (менее 10), с выведением сигнала на отдельный усилитель [103]. Развитие микроэлектроники, компьютерной обработки информации и технологий производства позволили значительно улучшить характеристики этой технологии [104]. Количество электродов может достигать 65 536 штук [105]. Метод обладает хорошим временным разрешением. Но пространственное разрешение наиболее широко применяемых матриц с разрешением менее 64 x 64 на порядок хуже, по сравнению с оптическими методами. Стоимость таких матриц достаточно высока. А большая стоимость матриц размером 256 x 256 электродов и разрешением 25 мкм делает желательной применение других методов регистрации распространения возбуждения. Так же интерпретация результатов в некоторых условиях, таких как фибрилляция, может быть сложной [106].

Оптическое флуоресцентное картирование является наиболее широко распространённым методом визуализации распространения волн возбуждения в сердечной ткани *in vitro* и *in vivo*. Высокая популярность объясняется высоким пространственно-временным разрешением, широким полем обзора, гибкостью настройки для разных экспериментальных условий и высокой чувствительностью современных красителей к изменениям трансмембранного потенциала. Эти преимущества позволяют точно характеризовать распространение возбуждения в миокарде [107]. Этот метод был разработан и применён для регистрации изменения трансмембранного потенциала кардиомиоцитов в 1970х [108]. Впоследствии были разработаны разные флуоресцентные молекулы, изменяющие свой квантовый выход в ответ на изменение в трансмембранном потенциале или концентраций внутриклеточного кальция, никотинамидадениндинуклеотида (НАД) и других. Несмотря на возможности широкого применения этого метода, в некоторых постановках эксперимента применение флуоресцентных молекулярных зондов может являться фактором неопределённости и влиять на результат, что является недостатком [18; 19]. Так же окраска культур сердечной ткани может приводить к нарушению стерильности образцов, что нежелательно при долговременных наблюдениях. В связи с этим в некоторых условиях могут понадобиться методы картирования без использования красителей.

Методы картирования волн возбуждения в сердечной ткани без использования красителей основываются на детектировании сокращения кардиомио-

цитов. Был разработан ряд методов на разных пространственных масштабах от отдельных клеток [109–112], клеточных культур [113–119] до картирования без красителей на препарате Лангендорфа [120; 121]. В последнее время подобные методы приобрели дополнительную популярность из-за применения в исследованиях созревания и развития сердечной ткани, дифференцированной из индуцированных плюрипотентных клеток [109; 111; 114; 122–124]. К основным подходам, используемым в безметочных методах картирования относятся анализ вектора движений в микроскопических изображениях с высоким увеличением [109; 122; 123; 125], варианты косого освещения образцов [114; 126], голографическая микроскопия [112; 115; 116].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 0.6 Приготовление полимерных подложек для культивации клеток

#### 0.6.1 Материалы и реагенты

Коллагеназа типа II, пенициллин / стрептомицин, L-глутамин, среда сбалансированного солевого раствора Хэнкса (HBSS), модифицированная по Дульбекко среда Игла (DMEM), среда Лейбовица L15, физиологический раствор с фосфатным буфером (PBS), фетальная бычья сыворотка (FBS) и Fluo-4 утра были приобретены у Thermo Fisher Scientific Inc. (США). Фибронектин плазмы человека был приобретен у ИМТЭК, Российский кардиологический научно-производственный комплекс (Россия). PDMS Sylgard 184 и Sylgard 527 были приобретены у Dow Corning (США). Параформальдегид, лидокаин и соль Тирода были приобретены у Sigma-Aldrich (США). Фаллоидин Alexa Fluor 488 был приобретен у Molecular Probes (США). DAPI были приобретены у Vector Laboratories Inc. (Канада). Колбы для культивирования были приобретены у Corning (США). Чашки Петри были приобретены у Greiner (Австрия).

#### 0.6.2 Приготовление подвешенных волокон методом электроспиннинга

В Главе 1 применялись плоские сетки из отдельных полимерных волокон разной плотности. Для этого полимер полилактид (PLA, Mw 700 000, Polysciences Inc., США, 21512) растворяли в гексафторизопропанол (HFIP, Sigma-Aldrich Co., США, 105228) в концентрации 25 мг / мл. Для проведения флуоресцентных исследований, в раствор PLA был добавлен флуоресцентный

краситель Rhodamine 6G в конечной концентрации 0,01 мкг / мл. Полосы из полидиметилсилоксана 184 (ПДМС, Dow Chemical, США) размером 10 × 20 × 3 мм использовали в качестве подложки для электроформованных волокон. Каждая полоса посередине имела углубление с треугольным сечением шириной 2 мм и глубиной 1 - 2 мм вдоль длинной стороны. Раствор ПЛА подвергали электроформированию с использованием установки для электроспиннинга Nanon-01 (Mesc Co., Japan). Раствор подавали с помощью шприца объёмом 3 мл и иглой с тупым наконечником 22 калибра. Скорость потока составляла 0,5-1 мл/ч. Напряжение, приложенное между наконечником шприца и заземленным коллектором, находилось в диапазоне от 4 до 7 кВ, а расстояние от наконечника иглы до коллектора составляло 10 см. Полосы из ПДМС были прикреплены к барабанному коллектору так, чтобы канавки были перпендикулярны направлению движения, поэтому нановолокна оказывались поперек канавки (см. Рисунок 1.1). Процедура электроспиннинга проводилась в течение 5 мин. Среднее расстояние между отдельными электропрядными нановолокнами составляло 3 - 6 мкм. Образцы покрывали раствором человеческого фибронектина (10 мкг / мл в PBS, Imtech, Россия) путём 12-часовой инкубации при 37 ° С для получения клеточного адгезивного матрикса.

### 0.6.3 Приготовление плоских нановолоконных матриксов

В Главе 2 использовались плоские плотные нановолоконные подложки. Для их получения методом электроспиннинга использовался раствор полилактида (PLA, MW 700 000 Да) в гексафторизопропаноле (HFIP) в концентрации 25 мг/мл. В качестве субстрата для напыления волокон использовались кольца из полидиметилсилоксана (PDMS, Dow chemical, США) с внешним диаметром 9 мм, внутренним диаметром 7 мм, толщиной 2 мм. Электроформирование проводилось при помощи установки Nanon (MECC Corporation, Япония). Для подачи раствора использовался шприц объёмом 3 мл и игла с внутренним диаметром 0,413 мм. Скорость подачи раствора полимера варьировалась в пределах от 0.5 мл/ч до 2 мл/ч, напряжение между иглой и коллектором составляло от 4 до

7 кВ. Напыление волокон производилось на плоском коллекторе, на который были положены кольца из PDMS. Расстояние от конца иглы до плоскости коллектора равнялось 10 см. Процесс электроспиннинга продолжался до получения плотного, стабильного слоя волокон. Среднее время напыления составляло 15 минут, средняя толщина волокон составляла 1,6 мкм.

Готовые образцы стерилизовались УФ излучением 265 нм, не менее 30 минут с каждой стороны. Стерилизованные матрицы помещались в культуральную чашку и хранились до посадки клеток в стерильных условиях не более 3-х дней.

#### 0.6.4 Приготовление микроподложек

Для приготовления микроподложек на покровное стекло наносился слой агарозного геля для предотвращения адгезии клеток и слой сахарозы, играющей роль водорастворимого жертвенного слоя. После этого поверх слоя агарозы наносились выровненные полимерные нановолокна, полученные электроспиннингом с катодом в виде параллельных электродов. Затем стекла с полимерными волокнами закреплялись на программируемом моторизованном XY столике, на манипуляторе устанавливалось лезвие на минимальную высоту, достаточную для резки волокон. Управление XY столиком производилось с помощью собственноручно написанного плагина на языке Java для программного комплекса  $\mu$ Manager [127], предназначенного для управления моторизованными микроскопами и являющегося расширением программы для обработки изображений ImageJ. Исходный код приведён в приложении А.4. Входящими данными для алгоритма являются шаг резки, диаметр стекла и координаты центра образца. Перемещения ножа относительно образца, обеспечиваемые написанных плагином, показаны на Рисунке 2.10(б). Благодаря возможности программно задавать шаг резки, такой подход позволяет получать микроподложки в достаточно узком диапазоне длин. После нарезки образцы стерилизовались ультрафиолетом и были готовы для использования.

### 0.6.5 Приготовление тонких плёнок из PDMS с контролируемой толщиной

В Главе 3 использовались мембраны из ПДМС различной толщины. Они были изготовлены по методике, описанной ранее [128]. ПДМС (Sylgard 184) и отверждающий агент смешивали в соотношении 10:1 и дегазировали в течение 15 минут в слабом вакууме. Мембраны различной толщины изготавливали путем центрифугирования полимерной смеси на крышках чашки Петри диаметром 90 мм при 480 об/мин в течение 1,5 мин, 1020 об/мин в течение 1 мин, 3000 об/мин в течение 1 мин. Для получения еще более тонких мембран, на крышку чашки Петри наносили смесь ПДМС:гексан в соотношении 1:2 при 3000 об/мин в течение 1 минуты. Это позволило получить мембраны толщиной 213, 117, 40, 14 мкм соответственно. Другой набор более мягких мембран толщиной 21 мкм изготавливали из смеси двух сортов ПДМС (Sylgard 184:Sylgard 527 1:2) путем центрифугирования на крышке чашки Петри при 3000 об/мин в течение 30 секунд. После этого кольца из ПДМС приклеивали к поверхности каждой пленки с помощью небольшого количества жидкого ПДМС и запекали в течение дополнительного часа при 70° С (см. Рисунок 3.1). Внутренний диаметр ПДМС колец, используемых в различных сериях экспериментов, составлял 10 или 13 мм.

Для изготовления ПДМС мембран с микроструктурированной поверхностью кремнивую форму с необходимой топографией покрывали смесью ПДМС (Sylgard 184:527 в соотношении 2:1) при 3000 об/мин в течение 30 секунд. После приклеивания кольца PDMS к пленке их обрабатывали гексаном для отделения пленки от силиконовой формы.

В большинстве экспериментов использовались барабаны с ПДМС мембранами 40 мкм. В эксперименте с оценкой контрастности без меток использовались мембраны всех толщин.

## 0.7 Работа с культурой ткани

### 0.7.1 Выделение и культивация неонатальных желудочковых крысиных кардиомиоцитов

Первичная культура неонатальных крысиных желудочковых кардиомиоцитов выделялась согласно протоколу, разработанному компанией Worthington <http://www.worthingtonbiochem.com/NCIS/default.html>. В работе использовались сердца крыс Вистар возрастом от 1 до 4 дней.

Коротко, механически измельчённая ткань желудочков подвергалась энзимной дезагрегации в 1 % растворе трипсина в HBSS в течении 16 часов. После обработки ферментном коллагеназа II в течение 1 часа, суспензия клеток пропускалась через фильтр грубой фильтрации, а среда заменялась с L15 на среду MEM, модифицированную Дульбекко (DMEM), с добавлением 10 % фетальной бычьей сывороткой (FBS), 1 % пенициллина, стрептомицина и канамицина. Получившийся клеточный изолят выдерживали в течение 1 ч в флаконе для культивирования клеток площадью 75 см<sup>2</sup> (Corning Inc., США) с целью уменьшения количества фибробластов. Неприкреплённые клетки собирали и затем высевали на стерильные субстраты в плотности 100 000 клеток / см<sup>2</sup>. После инкубации в течение 24 часов в насыщенной атмосфере с 5 % содержанием CO<sub>2</sub> при 37° С, неприкреплённые клетки смывали и культуральную среду заменяли на DMEM с содержанием 5 % FBS. Все исследования соответствовали Руководству по уходу и использованию лабораторных животных, опубликованному Национальным институтом здравоохранения США (публикация № 85–23, пересмотренный в 1996 г.) и одобренным Центром живых систем Московского физико-технического института, протокол № А2–2012–09–02.

### 0.7.2 Культура ChR2-HL1



В Главе 2 использовалась иммортализованная клеточная линия кардиомиоцитов HL-1 [129;130] с трансфицированным канальным родопсином в связке с сигнальным белком eYFP (в дальнейшем данная клеточная линия будет обозначена ChR2-HL-1), что придало данной линии светочувствительные свойства. Для культивирования линии ChR2-HL-1 использовалась среда Клейкомба [131], смена среды производилась каждые три дня. Клетки выращивались во флаконах T25 при 37 °C и 5 % CO<sub>2</sub>. Когда клеточный монослой достигал 80 % конfluence, клетки пассировались с помощью 0.25 % трипсина с ЭДТА.

В дальнейшем светочувствительные клетки линии ChR2-HL-1 вносились к первичным культурам неонатальных крысиных кардиомиоцитов. Посадка производилась спустя 6, 24 и 48 часов с начала культивирования и проводилась в виде отдельных клеток и в виде малых сфероидов.

Отдельные клетки в виде суспензии подсаживали в лунку культурального планшета с первичной культурой в концентрации 30 - 1100 клеток/м<sup>2</sup>. В качестве контроля эти клетки высаживались в том же количестве на покровные стекла, покрытые фибронектином. Для выяснения процента клеток,севших на монослой, производилось сравнение количества клеток на монослое и контрольном образце.

Для получения малых кластеров светочувствительных клеток плоская лунка 24-луночного планшета предварительно покрывалась агарозой для предотвращения прикрепления клеток к поверхности лунки. В нее помещалась суспензия клеток культуры ChR2-HL1. Плотность клеток в лунке составляла 500 тыс - 1 млн клеток/см<sup>2</sup>. Через сутки эти клетки образовывали на неадгезивной подложке своеобразную сеть (Рисунок 2.1а). Полученные и скрепленные между собой клетки разбивались на отдельные кластеры с помощью механического пипетирования (Рисунок 2.1б). Полученная суспензия кластеров подсаживалась к образцам первичной культуры. Площадь проекции кластеров, получаемых таким методом, варьировалась в пределах 1 000 – 20 000 мкм<sup>2</sup>, что составляло порядка 30-500 клеток.

### 0.7.3 Стимуляция образцов со светочувствительными клетками

Общая оценка способности культуры, содержащей светочувствительные клетки, отвечать на световой импульс производилась с помощью световой стимуляции по всей площади образца, что достигалось путём быстрого открытия затворки флуоресцентной лампы с соответствующим флуоресцентным кубом. Так как максимумы поглощения красителя Fluo-4-AM и канального родопсина 2 лежат в одном спектральном диапазоне, то представлялось возможным одновременно возбуждать мембранный белок и флуоресцентный краситель. Для более точной стимуляции использовалось излучение 470 нм от светодиода M470F1 8 мВт (Thorlabs, США), подаваемое через оптоволокно. На выходе оптоволокна мощность составляла  $5.5 \pm 0.3$  мВт/мм<sup>2</sup>. При этом присутствовала фоновая засветка излучения, используемого для регистрации волн возбуждения. Её интенсивность составляла примерно 0,33 мВт/мм<sup>2</sup>. Длительность светового импульса, используемого для оптической стимуляции, составляла 50 мс. Площадь светового пятна, в пределах которого стимулировались клетки, составляла 1 - 2 мм<sup>2</sup>. В качестве контроля производилась стимуляция культуры с помощью точечного платинового и референтного кругового электродов. Напряжение составляло 4 - 7 В. Длительность импульса 10 мс. Периоды стимуляции варьировались в пределах 200 - 5000 мс.

## 0.8 Методы получения и обработки данных

### 0.8.1 Оптическое картирование волн возбуждения в культурах кардиомиоцитов

Для контроля функциональной активности кардиомиоцитов производилась их окраска Ca<sup>2+</sup>-чувствительным индикатором Fluo-4 (Life Technologies,

США, F14201). После окрашивания среду заменяли раствором Тироде (Sigma-Aldrich Co., США, T2145). Во время экспериментов по картированию поддерживали температуру 20 °С. Волны возбуждения регистрировали с помощью высокочувствительной камеры Andor iXon3 EM-CCD и микроскопа MVX-10 (Olympus, Япония). Если требовалось визуализировать активность клеток с большим увеличением, то применялась цифровая камера Olympus DP72 на инвертированном микроскопе Olympus IX71 с объективами 4x, 10x, 20x.

### **0.8.2 Устройство оптической системы при картировании методом без красителя**

Для визуализации распространения волн возбуждения, выполняемой в рамках исследования, описанного в Главе 3, применяли метод оптического картирования с использованием  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительного флуоресцентного красителя Fluo-4, либо описанный в Главе 3 метод без меток, основанный на мониторинге изгибов тонкой ПДМС мембраны, вызванных сокращениями кардиомиоцитов. Для флуоресцентного картирования образцы окрашивали в растворе Tyrode  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительным флуоресцентным красителем Fluo-4 в концентрации 4 мкг/мл. После 35 мин окрашивания среду заменяли свежим раствором Тирода и регистрировали флуоресценцию с разрешением 256x256 пикселей и частотой кадров 68 кадров/с с помощью камеры Andor iXon3 EM-CCD, установленной на микроскопе Olympus MVX-10.

Для картирования без меток была использовался осветитель Olympus SXZ2-ILLB для косоугольного освещения поверхности мембраны (Рисунок 3.1). Для создания расходящихся пучков света между осветителем и образцом была размещена дополнительная полосовая диафрагма. Изменения яркости на поверхности образца регистрировались с разрешением 256x256 и частотой кадров 68 кадров/с с помощью камеры Andor iXon3 EM-CCD. В одной серии экспериментов для съемки без меток использовалась модифицированная камера C-mount GoPro Hero 3+ Silver Edition. Видео с этой камеры записывались с разрешением 720x1280 и 120 кадров в секунду.

### 0.8.3 Иммуноцитохимия и флуоресцентная микроскопия

Для исследования с помощью иммуноцитохимических флуоресцентных методов, культуры сердечных клеток фиксировались с помощью 4 % раствора параформальдегида в фосфатном буфере и окрашивались на специфичный сократительному аппарату кардиомиоцитов белок  $\alpha$ -актинин, актиновые филаменты и ДНК клеток. Для этого использовались красители на F-актин Alexa Fluor 488 Phalloidin Conjugate (Molecular Probes, A12379) и краситель на ядерное ДНК DAPI. При необходимости производилось дополнительное окрашивание при помощи первичных антител на  $\alpha$ -актинин (monoclonal anti- $\alpha$ -actinin (sarcomeric) antibody produced in mouse, Sigma. 1:1000) и вторичные антитела к мышинным антителам (anti-mouse Alexa Fluor 594 (ab') 2 fragment of Goat anti-mouse IgG (H+L) 1:2000). Исследование проводилось на сканирующем конфокальном микроскопе Carl Zeiss LSM 710 (Zeiss, Германия)

### 0.8.4 Сканирующая электронная микроскопия

Сканирующая электронная микроскопия выполнялась на микроскопе JEOL JSM 6510LA при ускоряющем напряжении 15 кВ. Для исследования во вторичных электронах образцы покрывались слоем золота, толщиной 10 нм, при помощи установки магнетронного напыления 150R/ES (Quorum Technologies, Великобритания). Морфология и характерные размеры образцов оценивались по полученным снимкам с помощью программного обеспечения JEOL.

### 0.8.5 Фиксация и заливка образцов в эпоксидную смолу

В Главе 1 клеточные культуры исследовались с помощью методов просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), гистологии и сканирующей зондовой нанотомографии (СЗНТ). Для этого использовалась двойная фиксация образцов в 2 % глутаровым альдегиде, разведённом в фосфатном буфере, и 1 % тетроксиде осмия (Sigma, США, O5500) в PBS. После этого производилась дегидратация тканей в растворах этилового спирта повышающихся концентраций (50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 %), смеси 96 % этанола и ацетона 1:1 и ацетоне 100 % концентрации. Ероху Embedding Medium (Sigma, США, 45359) использовалась для заливки образцов в соответствии со стандартными протоколами [89]. Обезвоженные препараты клеток переносился в смесь ацетона и эпоксидной смолы 1:1 на 30 мин, после чего на поверхность субстрата наносилась чистая эпоксидная смола. После полимеризации в течение 12 часов при 37° С и в течение 48 часов при 60° С, субстрат из ПДМС отделялся, и тонкий слой эпоксидной смолы (ФЭМ, Павлово, Россия) наносился на гладкую «нижнюю» сторону отъёленного блока эпоксидной смолы с клетками, после чего проводилась дополнительная полимеризация путём выдерживания в течение 24 ч при температуре 60° С. В результате вышеописанных манипуляций получалась эпоксидная «сэндвичная» структура с клетками на нановолокнах посередине.

### 0.8.6 Гистология

Для гистологического исследования кардиальных жгутов выполнялись полутонкие срезы залитых в эпоксидную смолу образцов с помощью стеклянного ножа на микротоме Reichert (Австрия). Плоскость срезов была перпендикулярна преимущественному направлению волокон, их толщина составляла 2-5 мкм. После микротомирования срезы переносились на стеклянные покровные стекла и окрашивались фуксином.

После фотографирования полученных образцов, производилась оценка пористости изучаемых тканей и морфологии составляющих её клеток.

### 0.8.7 Просвечивающая электронная микроскопия

Образцы с сердечными культурами на нановолокнах, залитые в эпоксидную смолу, микромировались в плоскости, перпендикулярной преимущественному направлению нановолокон. В разделе 1.1.1 для этой цели использовался ультрамикротом Leica UC6 (Leica Microsystems GmbH, Австрия) с алмазным ножом Diatome Ultra sonic 35 (Diatome AG, Швейцария), с помощью которого удавалось получать серебристые ультратонкие (70 нм) срезы. В разделе 1.2.3 применялся ультрамикротом LKB 4802 со стеклянным ножом, который позволял получать золотистые срезы с толщиной в пределах 90 - 150 нм. После ультрамикротомирования срезы помещались на медные сеточки для электронной микроскопии и контрастировались уранилацетатом и цитратом свинца. Изображения получали на просвечивающем электронном микроскопе JEOL JEM 100B при ускоряющем напряжении 80 кВ. Регистрация изображения проводилась на пленку Agfa Camera CE с размером кадра 65x90 мм (Agfa-Gevaert N.V., Бельгия). Для повышения контрастности полученных микрофотографий мог использоваться полосовой фильтр в программе ImageJ.

### 0.8.8 Сканирующая зондовая нанотомография

Для исследования трехмерной микро- и наноструктуры отдельных клеток на нановолокнах в разделе 1.1.1 применялся метод Сканирующей Зондовой Нанотомографии СЗНТ [132]. Для этого использовалась система NTEGRA-Tomo (NT-MDT Spectrum Instruments Co., Москва, Россия), состоящая из сканирующего зондового микроскопа, интегрированный с ультрамикротомом Leica EM UC6 (Leica Microsystems GmbH, Австрия). Последовательные срезы образцов с

сердечными клетками с шагом в 120 нм были выполнены с использованием алмазного ножа Ultra sonic 35 (Diatome AG, Биль, Швейцария) с шириной лезвия 3,0 мм. СЗМ-измерения поверхности образца после каждого среза проводились в полуконтактном режиме со скоростью сканирования 1,5 Гц с использованием кремниевых кантилеверов ETALON HA\_HR (NT-MDT Spectrum Instruments Co., Москва, Россия) с резонансной частотой 390 кГц и радиусом иглы меньше 10 нм. В результате томографического исследования был получен набор из 54 последовательных СЗМ-изображений размером  $16 \times 16$  мкм и разрешением  $512 \times 512$  пикселей с Z-шагом разреза 120 нм. Предварительную обработку изображений проводили с помощью программного обеспечения Nova ImageAnalysis 1.0.26.1443 (НТ-МДТ Спектрум, Москва, Россия). Трехмерная структура клетки на волокнах была реконструирована и визуализирована с использованием программного пакета Visage Imaging Amira 5.3.2. Это программное обеспечение использовалось для выравнивания изображений в плоскости XY, сегментации изображения, генерации и рендеринга поверхностей клеток и волокон. Окончательная трехмерная реконструкция была построена с использованием размера вокселя  $1 \times 1 \times 6$  с учетом физических размеров Z-шага и XY пикселей во время СЗМ сканирования.

### 0.8.9 Атомно-силовая микроскопия

Для изучения топографии и механических свойств ПДМС мембран из Главы 3 использовался атомно-силовой микроскоп NanoWizard 3 BioScience (JPK Instruments AG, Германия). Построение топографии поверхности при помощи атомно-силового микроскопа (АСМ) проводилось в полуконтактном режиме со скоростью сканирования 1 Гц с использованием кремниевого кантилевера NSG10 (НТ-МДТ, Россия) с резонансной частотой 240 кГц и жесткостью 11,8 Н / м.

### 0.8.10 Измерение механических свойств эластичных мембран

Для количественной оценки модулей Юнга и жёсткости на изгиб 57 ПДМС мембран с помощью атомно-силового микроскопа NanoWizard 3 BioScience (JPK Instruments AG, Германия) были построены кривые зависимости деформации от напряжения. Измерения модулей Юнга и жесткости мембран для плёнок 213 мкм, 117 мкм и 40 мкм проводились при помощи кантилевера HA\_HR В (НТ-МДТ, Россия) с жёсткостью 19,74 Н/м. Жесткость 14 мкм мембраны и 21 мкм мембраны из мягкого ПДМС количественно определяли с помощью кантилевера NSG03 (НТ-МДТ, Россия) с постоянной силы 1,58 Н/м.

Для измерения модуля Юнга материала мембран, они помещались на жесткие пластиковые чашки Петри, после чего для каждой из плёнок строились 64 кривых зависимости силы от вдавливания, которые фитировались моделью Герца для расчета модуля Юнга [133].

Жёсткость на изгиб  $k$  мембран измерялась как наклон кривой вдавливания или отношение прилагаемой к мембране силы к вдавливанию [134]. Для этого мембраны натягивали на круглые рамы с внутренним диаметром 10 мм. Чтобы избежать прилипания иглы кантилевера к мембране, маленькие жёсткие капли эпоксидной смолы со средней площадью 0,3 мм<sup>2</sup> помещались в центр каждого барабана [135]. Жёсткость рассчитывали по 10 кривым силы-к-вдавливанию, измеренным в центре мембраны.

### 0.8.11 Повышение контрастности и уменьшение шума

Записанные во время картирования видео анализировались с использованием программного пакета ImageJ (НИН, Мэриленд, США, <http://rsb.info.nih.gov/ij>). Усиление их контрастности производилось посредством вычисления разницы между фоновой интенсивностью и каждым видеокадром. В качестве другого способа вычисления контрастности применялось дифференцирование видеозаписей заключающееся в вычислении для



каждого кадра разницы с соседним кадром с задержкой 60 мс. При наличии достаточно интенсивного шума на полученных видеозаписях производилась их дополнительная обработка при помощи размытия по Гауссу с радиусом 0,6 пикселя.

### 0.8.12 Построение пространственно-временных развёрток

Оптическое картирование записывались в режиме градаций серого. После обработки для повышения контрастности участкам сердечной культуры в состоянии покоя соответствовал тёмно-серый цвет, а участкам в состоянии возбуждения соответствовал белый или светлосерый. Для определения скорости волны возбуждения на видеозаписях выделялась прямая, расположенная по нормали ко фронту волн в культуре клеток. После чего значения интенсивности сигнала вдоль прямой откладывались на координатной плоскости. В частности, вдоль оси  $X$  откладывались значения интенсивности в разные моменты времени, а в вдоль оси  $Y$  откладывались значения интенсивности в разных участках прямой. В результате чего получалось новое изображение размером длина прямой  $\times$  количество кадров. Распространение возбуждения на такой развёртке представляло собой наклонные светлые полосы. После преобразования размерностей осей в размерности конкретной длины и времени, скорость распространения волны возбуждения равнялась  $tg(\alpha)$ , где  $\alpha$  - угол наклона этой прямой.

### 0.8.13 Построение карт активации возбуждения

Карта активации представляет собой изображение, на котором время возбуждения каждой точки показано цветом. При этом общее время, запечатлённое на видеозаписи, разбивается на несколько интервалов, каждому из которых присваивается своё цветовое значение. В таком случае карта активации

будет представлять из себя наложение фронтов в эти временные промежутки. Алгоритм построения карты:

1. Контрастность видеозаписей повышалась в соответствии с пунктом **0.8.11**

2. Значения каждого  $(i,j)$  пикселя  $u_n^{i,j}$ , где  $n$  соответствует  $n$ -му кадру, дискретно дифференцировались по времени  $v_n^{i,j} = u_n^{i,j} - u_{n+k}^{i,j}$ , при этом смещение между кадрами подбиралось так, чтобы оно соответствовало 60 мс.

3. По максимальному значению производной  $v_n^{i,j}$  для каждого пикселя  $i,j$  определялось положение фазы нарастания  $n = n'$ .

4. После этого выполнялось разбиение видеозаписи на  $m$  временных интервалов  $t_1, t_2, \dots, t_m$ , и вычислялось отношение фазы нарастания  $n'(i,j)$  каждого пикселя  $i,j$  к конкретному временному интервалу.

Реализацию данного алгоритма в программном пакете Wolfram Mathematica можно найти в Приложении **A.2**.

### 0.8.14 Оценка контрастности волн сокращения

Для оценки контрастности, достижимой при помощи метода без меток, образцы освещались расходящимися пучками света. В результате максимальный контраст для диапазона углов освещения оценивался при одном измерении. Интенсивность фона, рассчитанная как средняя интенсивность пикселей из 20 видеок кадров, записанных до возбуждения образца, вычиталась из видео. После этого каждый кадр видео был разделен на 1024 квадратных области размером  $8 \times 8$  пикселей каждая. Для каждой области яркость была усреднена по площади, а контрастность была рассчитана в соответствии с определением Вебера как:

$$C = (I_{max} - I_{bg}) / I_{bg} \quad (1)$$

Здесь  $C$  обозначает контраст,  $I_{max}$  - максимальная яркость области;  $I_{bg}$  - яркость фона региона, усредненного по 20 кадрам. Максимальный контраст, наблюдаемый для каждого видео, рассчитывали как среднее 10 регионов с максимальным контрастом. Расчёты были выполнены в Wolfram Mathematica 11.

### 0.8.15 Статистический анализ полученных данных

Для нормально распределённых величин вычислялось среднее значение и стандартное отклонение, для которых использовались стандартные формулы. Для скошенных распределений рассчитывались квартили и интерквартильный размах. Для проверки статистических гипотез о наличии значимых различий между выборками использовались критерии Стьюдента, Манна-Уитни и дисперсионный анализ (ANOVA). Различия считались статистически значимыми при  $p < 0.5$ . Размеры выборок обозначались в соответствующих разделах. Статистическая обработка производилась в пакетах Wolfram Mathematica 11 и R.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

## Глава 1. Особенности роста сердечных клеток на нановолоконных подложках

Нановолоконные подложки широко используются в качестве скаффолдов для клеток в тканевой инженерии [4]. Основными преимуществами таких субстратов являются их механические свойства, высокая степень схожести с природным внеклеточным матриксом, контроль за морфологией ткани, возможность создания умных субстратов [61]. Применение таких скаффолдов имеет хорошие перспективы и в инженерии сердечной ткани. Основной причиной является то, что клетки сердца, кардиомиоциты, являются опорно-зависимыми, и для поддержания жизнедеятельности им требуются ряд биохимических сигналов, таких как связывание интегринов, формирующих кластеры фокальных контактов клетки, с белками внеклеточного матрикса [136; 137]. При длительном отсутствии этих сигналов опорно-зависимые клетки уходят в апоптоз и прекращают свою жизнедеятельность [59].

Одним из наиболее важных свойств нановолоконных скаффолдов является возможность направлять и контролировать рост культивируемых на них клеток, что довольно обширно представлено в соответствующей литературе [36; 138; 139]. Но и клетки при распластывании и росте на каком-либо субстрате в свою очередь прилагают к нему силы в диапазоне 1 - 10 нН [101] и более 10 нН для кардиомиоцитов [94]. Таких сил достаточно для деформации относительно мягких субстратов с модулем Юнга менее 10 кПа [94]. Но особенно сильно эффекты воздействия клеток на подложку могут проявить себя при их культивации на нановолоконных матриксах, состоящих из отдельных полимерных филаментов с относительно малой жёсткостью.

Но на данный момент в литературе не представлено достаточно полных данных о взаимодействиях культивируемых клеток и искусственных полимерных скаффолдов. Известная на данный момент информация приведена в разделе 0.4 обзора литературы. Целью данного раздела является покрытие аспекта взаимодействия сердечных клеток и нановолокон на микро- и макроуровнях.

## 1.1 Исследование волоконно-клеточных взаимодействий

### 1.1.1 Исследование ультраструктурных особенностей взаимодействия отдельных сердечных клеток и нановолокон.

Структурные, механические и функциональные характеристики тканеинженерных конструкций на нановолоконной основе зависят как от отдельных свойств составляющих их клеток и волокон, так и от взаимодействия между этими компонентами. Исследование подобных взаимодействий важно для создания тканеинженерных конструкций с требуемой архитектурой, что применимо и для создания искусственной сердечной ткани. В этом разделе волоконно-клеточные взаимодействия исследовались посредством изучения ультраструктурных особенностей прикрепления сердечных клеток к нановолоконным подложкам с помощью высокоразрешающих методов микроскопии.

Хорошо известно, что на развивающиеся клетки большое влияние оказывает их физическое окружение: топография и жёсткость подложки влияют на фенотип клеток, их миграцию, пролиферацию и дифференцировку [36; 94; 95; 139]. Конфигурация подложки влияет на распределение кластеров адгезионных молекул, что определяет структуру актиновой сети и, следовательно, влияет на морфологию клеток. При взаимодействии опорно-зависимых соматических клеток с плоскими субстратами, происходит их распластывание, которое может быть ограничено размерами клетки или контактным торможением. Особая топография или молекулярный состав поверхности могут вызывать изменения в ориентации их цитоскелета [36; 92]. Рост клеток достаточно хорошо изучен в простейшем случае - на плоском субстрате. Но структура нановолоконных матриц заметно отличается от других типов субстратов, поэтому рост клеток на них требует дополнительного исследования. Существующие данные о прикреплении клеток к таким подложкам были получены либо с помощью методов с недостаточным разрешением, либо для других типов клеток [140; 141]. Для заполнения этого пробела в знаниях было проведено исследование ультраструктурных особенностей взаимодействий сердечных клеток, кардиомиоцитов и фибробластов, с отдельными волокнами из полимолочной кислоты (полилактида), полученными методом электроформования (электро-

спиннинга). Исследование проводилось с помощью трёх методов микроскопии: конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ), просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и сканирующей зондовой нанотомографии (СЗНТ) [132].

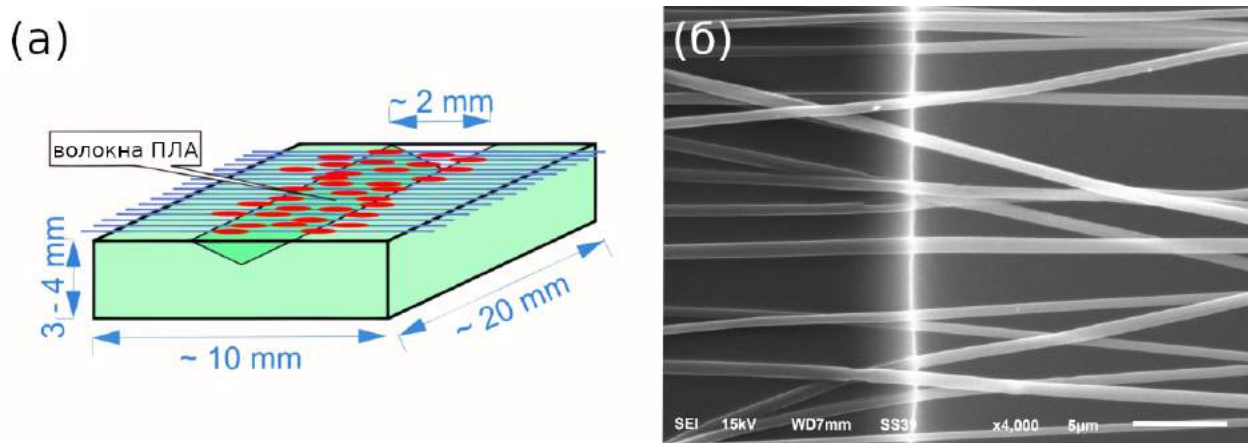


Рисунок 1.1 — (а) - Схема приготовления подложек с подвешенными нановолокнами из PLA. (б) - СЭМ-изображение подвешенных нановолокон из PLA, полученных с помощью электроспиннинга. Средний диаметр  $616 \pm 101$  нм. Шкала 5 мкм.

Для изучения этого явления изготавливались образцы, приготовленные в соответствии со схемой на Рисунке 1.1 (а). Они представляли из себя блоки из ПДМС, на поверхности которых было проделана треугольная борозда с максимальной глубиной 2 мм. Поперёк борозды наносились полимерные нановолокна, полученные электроформованием. По данным СЭМ измерений, их средний диаметр составлял  $616 \pm 101$  нм (см. Рисунок 1.1 (б)).

После посадки первичной сердечной культуры, выделенной из неонатальных крысят, образцы культивировались в течение двух - трёх дней. После чего наблюдались посредством оптической фазово-контрастной микроскопии и флуоресцентного картирования возбуждения, с помощью которого было подтверждено, что кардиомиоциты проявляют обычную спонтанную сократительную активность, т.е. они жизнеспособны и функционально состоятельны.

Метод конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) применялся для изучения взаимного расположения клеток сердечной культуры на отдельных полимерных волокнах из полилактида (PLA), покрытых фибронектином. На Рисунке 1.2 показаны КЛСМ изображения желудочковых кардиомиоцитов, культивированных в течение 72 часов на подвешенных нановолокнах. Нановолокна здесь помечены оранжевым, F-актин в клеточном

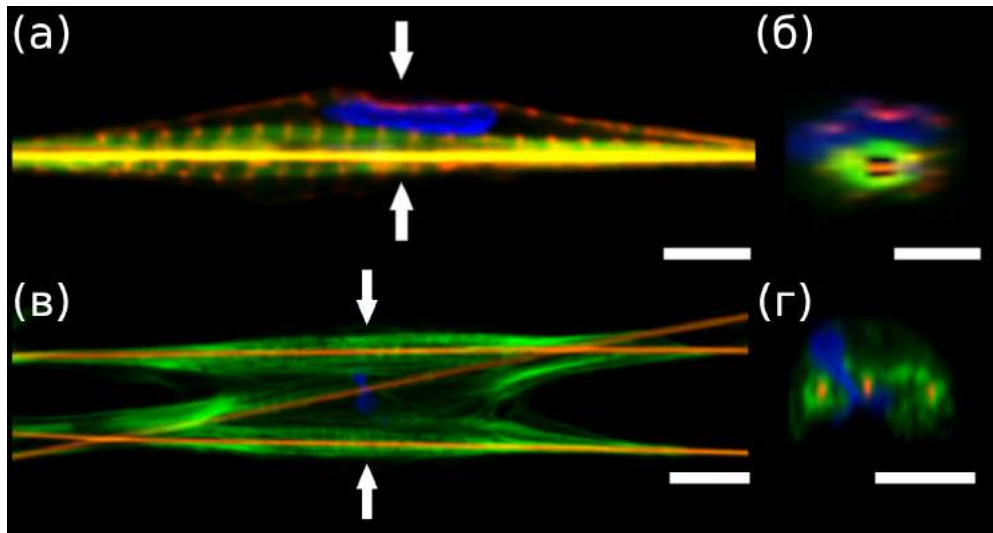


Рисунок 1.2 — КЛСМ-микрофотографии крысиных неонатальных кардиомиоцитов, выращенные на подвешенных нановолокнах. Нановолокна окрашены родамином 6G (оранжевый), актиновые филаменты клеток (в клеточном кортексе и миофибриллах) окрашены Alexa 488 Phalloidin (зеленый),  $\alpha$ -актинин в Z-дисках саркомер кардиомиоцитов окрашен первичными антителами к  $\alpha$ -актину и вторичными антителами Alexa Fluor 594 (красный), ядра контрастированы DAPI (синий). (а) Оптический срез кардиомиоцита, поглотившего единичное нановолокно. (б) Реконструкция среза кардиомиоцита вдоль белых стрелок на (а). Полимерное нановолокно (оранжевый) окружено миофибриллой (зеленый). Шкалы масштаба 4 мкм. (в) Снимок кардиомиоцита, выращенного на трёх нановолокнах. (г) Реконструкция среза кардиомиоцита вдоль белых стрелок на (в). Миофибриллы примыкают к нановолокнам. Шкалы масштаба 5 мкм.

кортексе и миофибриллах окрашен зелёным,  $\alpha$ -актинин в Z-дисках саркомер кардиомиоцитов окрашен красным, а ядра окрашены синим. Поперечная полосатость акто-миозинового комплекса свидетельствует о том, что это сократительные клетки.

На панели (а) представлен снимок веретенообразного кардиомиоцита на единичном волокне. Для определения взаимного расположения клетки относительно полимерного филамента была выполнена трёхмерная реконструкция из Z-стека конфокальных снимков. После этого вдоль белых стрелок было реконструировано сечение кардиомиоцита в перпендикулярной плоскости, показанное на панели (б). На этом изображении нановолокно, показанное оранжевым цветом, располагается не рядом с клеткой, а проходит сквозь её объём.



Так же можно отметить, что единственная миофибрилла этой клетки так же полностью окружает волокно.

На Рисунке 1.2 (в, г) представлены снимки в двух проекциях кардиомиоцита, выращенного на трёх нановолокнах. Этот кардиомиоцит так же выровнен вдоль направления преимущественной ориентации полимерных филаментов, обозначенных оранжевым. В этом случае все три волокна оказались так же проходящими сквозь объём клетки. На аксиальном сечении кардиомиоцита на панели (г), ярко зелёным показан актин в миофибриллах, а бледно зелёным - в остальной цитоплазме. На этом изображении так же можно отметить плотное примыкание миофибриллы к полимерным филаментам.

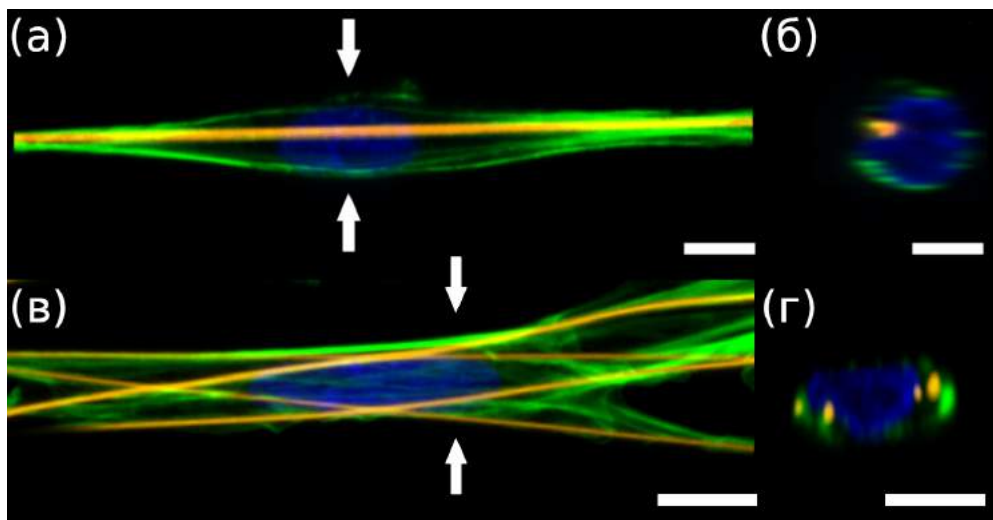


Рисунок 1.3 — КЛСМ-микротографии крысиных фибробластов сердца, выращенных на полимерных нановолокнах. (а) Оптический срез фибробласта на отдельном волокне. (б) Реконструкция среза фибробласта вдоль белых стрелок на (а). Нановолокно находится рядом с клеткой. Шкалы 4 мкм. (в) Фибробласт, выращенных на кластере полимерных волокон. Шкала 10 мкм. (г) Реконструкция среза фибробласта вдоль белых стрелок на (в). Волокна на этом срезе могут быть классифицированы как проходящие через объём клетки. Шкала 5 мкм.

На Рисунке 1.3 представлены конфокальные микротографии фибробластов сердца на полимерных волокнах. На панели (а) показан веретенообразный фибробласт на единичном волокне, а на панели (б) показано его сечение в перпендикулярной плоскости. На этом снимке можно отметить, что волокно располагается рядом с клеткой, а большая часть пространства в этой проекции занята ядром клетки. Рисунок 1.3 (в) представляет фибробласт, выращенный на кластере волокон. На сечении этого фибробласта (панель (г)) видно, что часть волокон проходят внутри этой клетки.

Для определения наиболее характерного механизма прикрепления к нановолоконным матриксам клеток каждого вида, на конфокальном микроскопе были проведены трёхмерные реконструкции 51 неонатального кардиомиоцита и 57 фибробластов сердца. В результате выяснилось, что доля обернувших нановолокна кардиомиоцитов составила 80.4%, в то время как для фибробластов только в 10.5% случаев волокна могли быть классифицированы как проходящие через внутренний объём клеток. 95% доверительные интервалы для долей клеток, обернувших волокна, показаны на Рисунке 1.4. Стоит отметить, что здесь приведена верхняя оценка обвивших волокна фибробластов, так как их ультраструктурные особенности прикрепления не всегда удавалось чётко определить этим методом микроскопии.

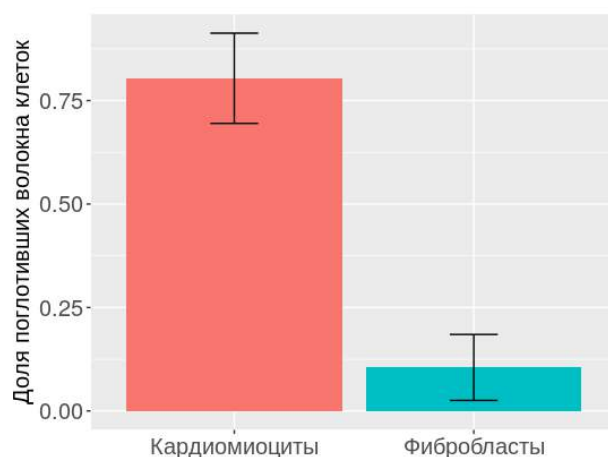


Рисунок 1.4 — Гистограмма, показывающая 95% доверительные интервалы для долей кардиомиоцитов и фибробластов, в которых волокна были локализованы во внутреннем объёме клеток.

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия позволила обнаружить эффект обёртывания волокон сердечными клетками, проанализировать десятки кардиомиоцитов и фибробластов по этим параметрам и определить доли поглотивших клеток. Однако, этот метод имеет ограниченное разрешение и не может визуализировать с достаточной точностью ультраструктурные особенности прикрепления клеток к полимерным нанофиламентам. Например, этот метод не позволяет ответить на вопрос, проникают ли волокна в клетки или просто глубоко обворачиваются мембраной, оставаясь отделёнными от цитоплазмы. Ответы на эти вопросы были получены с помощью высокоразрешающих методов просвечивающей электронной микроскопии и сканирующей зондовой нанотомографии [132].

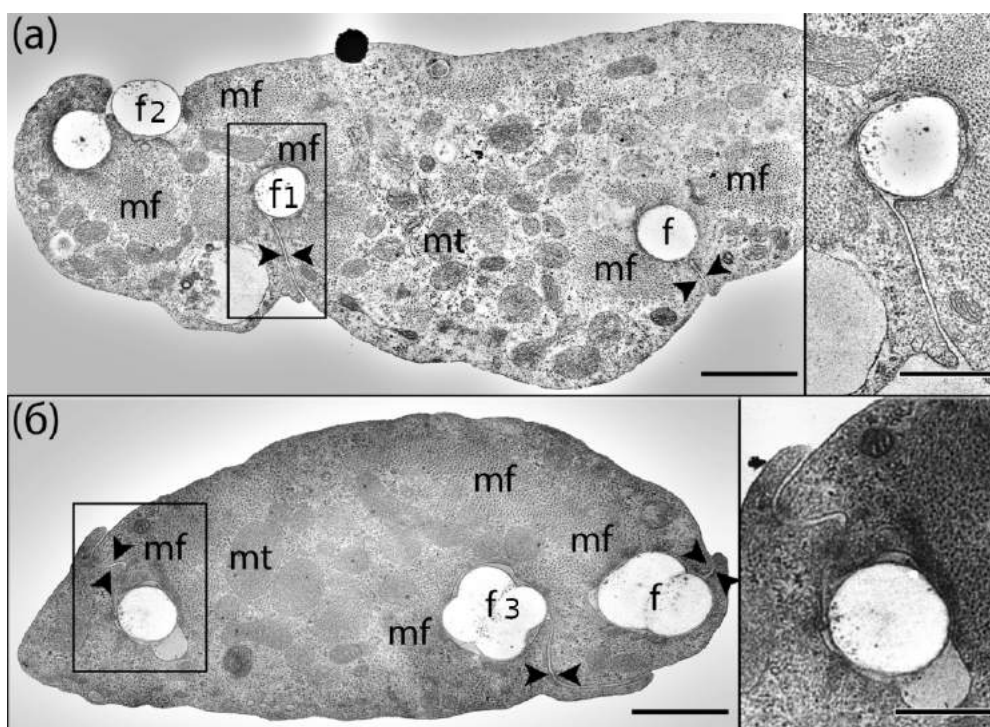


Рисунок 1.5 — ПЭМ микрофотографии кардиомиоцитов, выращенных на подвешенных волокнах. (а, б) Типичные ПЭМ изображения кардиомиоцитов, выращенных на подвешенных волокнах. На вставках представлены увеличенные участки с поглощёнными волокнами и клеточными мембранами, окружающими волокно. Волокна f1 и f2 на (а) и f3 на (б) поглощены клетками, но складка мембраны, образованная в результате поглощения, расположена над ними. Большинство миофибрилл (mf) расположены вблизи полимерных нановолокон. Шкалы масштаба 1 мкм. Шкалы масштаба во вставках - 0,5 мкм.

На Рисунке 1.5 показаны ПЭМ микрофотографии поперечных срезов кардиомиоцитов, выращенных на подвешенных нановолокнах из полилактида. Стоит отметить, что ультрамикротомирование проводилось в плоскости, перпендикулярной преимущественному направлению клеток. Поэтому в этой проекции будут видны только поперечные срезы акто-миозинового комплекса, имеющие решётчатую структуру [142]. В зависимости от места среза саркомера, эти сечения будут выглядеть по-разному. А именно, в АI - зоне миофибрилла будет выглядеть как одно толстое миозиновое волокно, окружённое шестью тонкими актиновыми филаментами, в АН - зоне будут видны только толстые миозиновые волокна, а в I - диске - только тонкие актиновые. Такие структуры на ПЭМ микрофотографиях обозначены как «mf».

Значительное количество миофибрилл у клеток на этих снимках позволяет сделать вывод о том, что это именно кардиомиоциты, а не фибробласты

или миофибробласты, которые характеризуются большим количеством шероховатого эндоплазматического ретикулума и наличием только периферических актиновых филаментов (стрессовые волокна), но не миофибрилл [137].

Полимерные нановолокна из полилактида состоят из лёгких ядер (углерод, кислород, водород) и имеют однородную структуру, поэтому они сравнительно мало рассеивают электроны, и на микрофотографии 1.5 (а) их поперечные срезы выглядят белыми кругами и обозначаются буквой «f». На этой панели видно, что три волокна полностью окружены клеткой, а одно волокно окружено ею частично. При этом от каждого поглощённого волокна к внеклеточному пространству идёт узкая складка цитоплазматической мембраны. Таким образом, технически волокна оказываются снаружи клетки, оказываясь полностью обёрнутыми ей. Согласно ПЭМ измерениям средняя ширина зазора составляет  $22 \pm 6$  нм ( $N = 16$ ). Расположение некоторых складок над волокнами указывает на то, что обволакивание происходит не за счёт силы тяжести, 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.

Панель (б) показывает, что кардиомиоциты могут поглощать не только отдельные нановолокна, но и их кластеры с эффективным диаметром более 1 мкм. Под «f3» обозначен кластер из четырёх полимерных волокон, поглощённый этой клеткой.

На Рисунке 1.6 представлена ПЭМ микрофотография кардиомиоцита, находящегося в процессе оборачивания нановолокон. Можно отметить, что волокно «f1» полностью окружено клеткой. Чёрными стрелками показана складка цитоплазматической мембраны, соединяющая его с внеклеточным пространством. Волокно «f2» является частично обёрнутым -  $\sim 82\%$  его поверхности соприкасается с клеткой. Стрелками показаны выпячивания клетки, которые в дальнейшем образуют складку цитоплазматической мембраны. «c1» обозначен кластер волокон, к которому у клетки нет прикрепления - цитоплазматическая мембрана в этом месте касается кластера, не повторяя его форму. Под «c2» обозначен кластер, к которому произошла частичная адгезия. Рядом находится миофибрилла, а плазмолемма частично повторяет форму кластера.

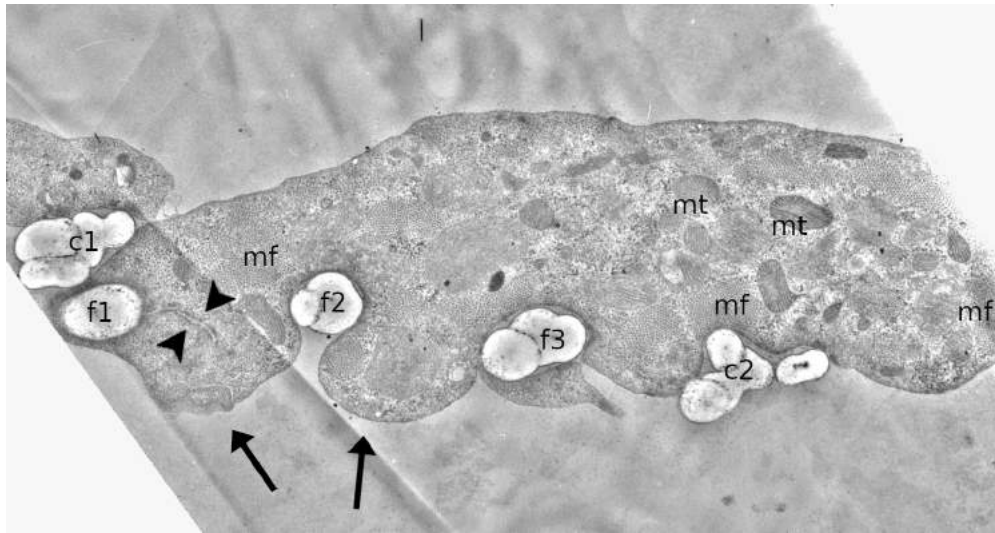


Рисунок 1.6 — ПЭМ микрофотография кардиомиоцита, полностью и частично обернувшего нановолокна. Волокно f1 находится в небольшой полости, образованной клеточной мембраной. Поверхность мембраны контактирует с волокном только в месте расположения миофибрилл. Волокно f2 частично обёрнуто клеткой. Используются следующие обозначения: f - волокна PLA/FN, mt - митохондрии, mf - миофибриллы, cl - шероховатый эндоплазматический ретикулум.

Чёрные стрелки указывают складки клеточной мембраны. Шкала 2 мкм.

На Рисунке 1.7 (а) показана ПЭМ микрофотография поперечного сечения веретенообразного фибробласта, взаимодействующего с одиночным подвешенным волокном. Наличие развитого шероховатого эндоплазматического ретикулума [143] (обозначение на «er» Рисунке) и отсутствие миофибрилл говорит о том, что эта клетка - фибробласт. Можно заметить, что ядро клетки занимает всё пространство практически от границы волокна до противоположной стороны плазмолеммы и, таким образом, ограничивает удлинение клетки вдоль направляющего. Это наблюдение согласуется с предыдущими исследованиями [143; 144], предполагающими, что ядро имеет более высокий модуль Юнга, чем другие клеточные структуры. На подвешенных нановолокнах клетка способна растягивать цитоплазматическую мембрану в широких пределах, однако более ригидная ядерная оболочка препятствует её максимальному расширению. В этом случае можно сказать, что нановолокно вдавлено в клетку. Стрелкой показана соответствующая вмятина в ядре.

На панели (б) представлен ПЭМ снимок фибробласта на нескольких волокнах. Степень обёртывания клеткой этих волокон разная. В то время, как площадь контакта с клеткой двух волокон, обозначенных стрелками, составляет

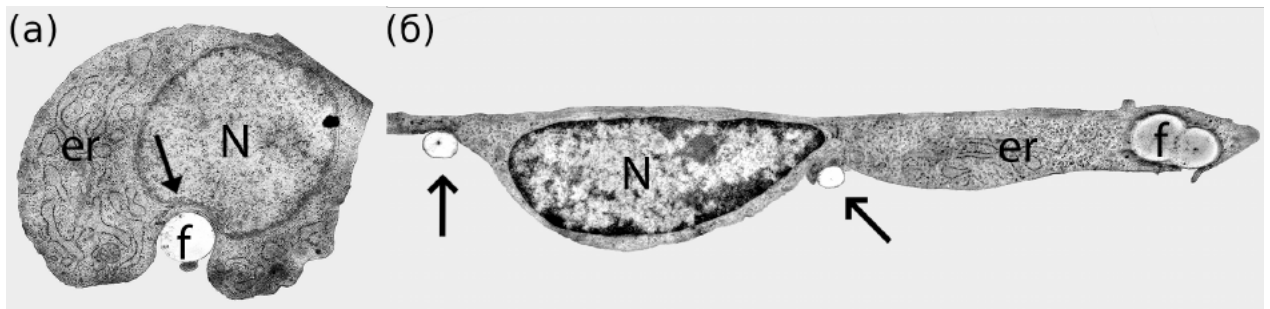


Рисунок 1.7 — ПЭМ микрофотографии сердечных фибробластов, выращенных на подвешенных волокнах. (а) ПЭМ-изображение веретенообразного фибробласта, выращенного на подвешенном волокне. (б) ПЭМ-изображение полигонального фибробласта, выращенного на нескольких подвешенных волокнах. Клетка имеет минимальную площадь взаимодействия с двумя волокнами, которые обозначены стрелками. Одно волокно (двойное) частично поглощено. Используются следующие обозначения: f - волокна PLA / FN, mt - митохондрии, mf - миофибриллы, er - шероховатый эндоплазматический ретикулум, N - ядро. Шкалы масштаба 1 мкм. Шкалы масштаба во вставках - 0,5 мкм.

менее 50% площади поверхности волокон, кластер из двух волокон (обозначен "f" на панели (б)) окружен фибробластом более чем на 90%. Стоит отметить, что обволакивание кластера волокон "f" произошло не клеткой с основной цитоплазмой, а тонким микровыростом (псевдоподией)

Предыдущие исследования показали, что фибробласты имеют от двух до пяти кластеров адгезивных молекул - фокальных контактов, где клетка взаимодействует с нановолокнами [90]. На основе свойств динамики цитоскелета было показано [145], что клетки пытаются минимизировать площадь своей поверхности, в результате чего обволакивание волокна энергетически не выгодно. Учитывая этот факт, мы можем предположить, что обёртывание волокна "f" произошло в результате расположения там адгезивного контакта, где возникают силы, способные преодолеть сопротивление актинового цитоскелета.

На микрофотографии 1.8 показаны сечения кластера фибробластов на трёх нановолокнах. Клетки полностью окружают полимерные филаменты, поэтому в таком случае на конфокальном микроскопе волокна могут быть классифицированы как проходящие внутри фибробластов. Однако в этом случае три фибробласта примыкают со всех сторон к волокнам, создавая видимость их обёртывания. Площадь контакта с клеткой для представленных волокон не превышает 50% площади их поверхности.

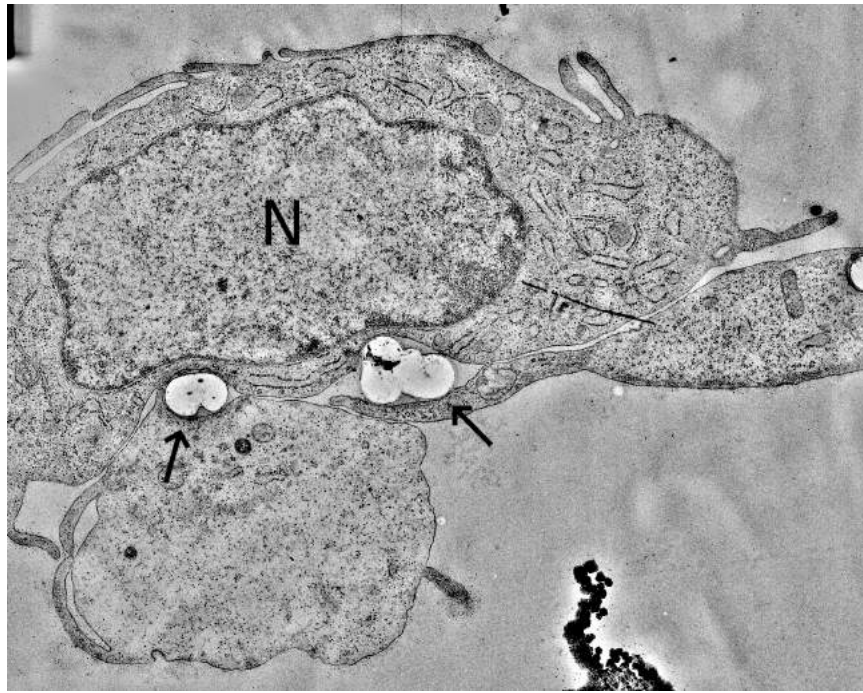


Рисунок 1.8 — ПЭМ микрофотография кластера фибробластов на подвешенных полимерных нановолокнах. На снимке видно три отдельных фибробласта, которые прилегают к трём полимерным волокнам, но не обёртывают их.

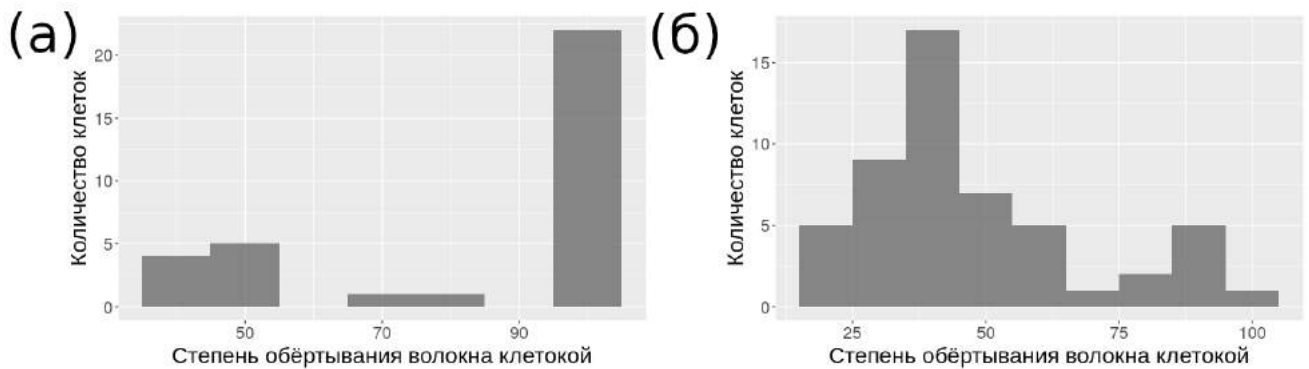


Рисунок 1.9 — Распределения степеней обёртывания нановолокон кардиомиоцитами и фибробластами. 100% соответствует полному обёртыванию волокна. (а) Распределение степеней обёртывания для кардиомиоцитов. (б) Распределение степеней обёртывания для фибробластов.

На Рисунке 1.9 показаны распределения степеней обёртывания нановолокон клетками. Этот параметр рассчитывался для каждого места контакта волокон с клетками как отношение длины этого контакта к периметру всего волокна. На панели (б) показано распределение для фибробластов. Это бимодальное распределение, что говорит о его неоднородности. Модами этого распределения являются 40% и 91%. Возникновение двух мод в распределении

можно объяснить контактами фибробластов с волокнами без адгезии и с адгезией.

На панели (а) представлено распределение степеней обёртывания полимерных филаментов кардиомиоцитами. Это не нормальное распределение, где на 100% обволакивание приходится 80.4% значений. Однако можно заметить два кластера вокруг значений 45% и 75% процентных обволакиваний. Обратившись к исходным данным было выяснено, что эти значения относятся к случаям контакта кардиомиоцитов с волокнами без адгезии и с неполным обёртыванием.

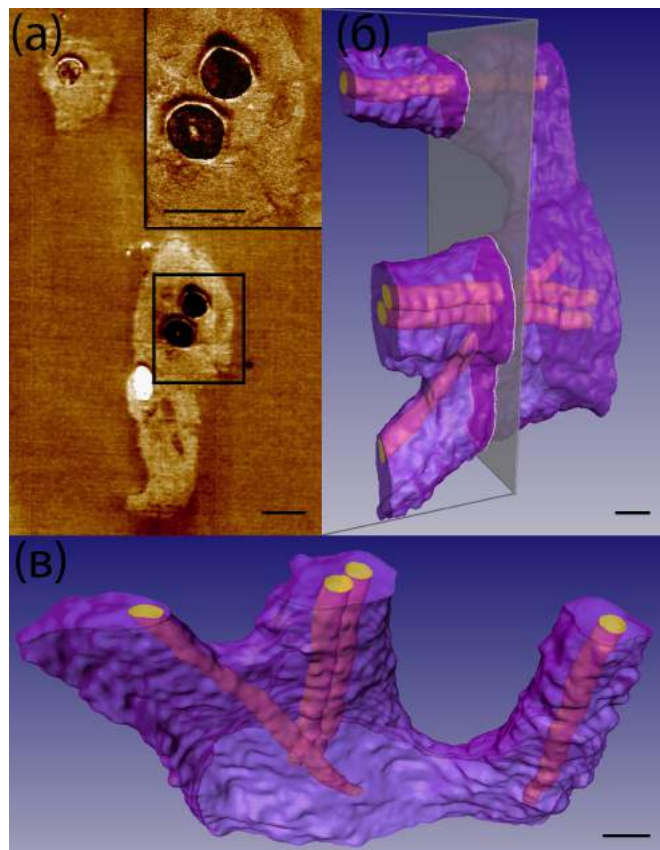


Рисунок 1.10 — Трехмерная СЗНТ реконструкция кардиомиоцита, поглотившего нановолокна из PLA. (а) Одно из топографических АСМ изображений (№ 27 из 54), использованное для трехмерной реконструкции. На вставке присутствует увеличенная отмеченная область с волокнами и клеточной мембраной складки. (б) 3D-модель кардиомиоцита с оболочкой из полимерных волокон ( $16,0 \times 16,0 \times 6,5$  мкм, 54 среза, толщина среза 120 нм). Серая плоскость представляет местоположение АСМ изображения из а). (с) Еще один ракурс трехмерной модели кардиомиоцитов. Можно видеть, что все полимерные волокна расположены глубоко внутри клетки, которая имеет разветвления, направляемые волокнами.

Шкала масштаба 1 мкм.



Рис. 1.10 показывает трехмерную реконструкцию кардиомиоцита, поглотившего подвешенные нановолокна из PLA / FN. Реконструкция была проведена с использованием метода сканирующей зондовой нанотомографии. Для этого были выполнены 54 среза этой клетки, залитой в эпоксидную смолу, по протоколу, описанному в материалах и методах. Шаг ультрамикротомы составлял 120 нм. Каждая поверхность среза сканировалась атомно-силовым микроскопом. После выполнения всех срезов, снимки были сегментированы и интегрированы для построения трёхмерной реконструкции. На рис. 1.10 (а) представлено одно из таких АСМ изображений; на вставке представлено изображение с более высоким разрешением, где также виден зазор цитоплазматической мембраны, ведущий к нановолокнам. Интересно, что на этой трёхмерной реконструкции с высоким разрешением видно разделение клетки на несколько отростков, каждый из которых так же поглотил по волокну.

### 1.1.2 Исследование динамических взаимодействий отдельных кардиомиоцитов с отдельными нановолокнами

В научной литературе широко представлены исследования влияния физического окружения на фенотип клеток [36; 94; 95; 139], говорящие о том, что топография и молекулярный состав поверхности субстрата могут вызывать изменения в ориентации цитоскелета клетки. Но и клетки при своём развитии прикладывают к подложке силы порядка 100 нН [94]. Это не существенно при использовании твёрдых подложек, сделанных, например, из стекла или пластмассы. Но при развитии культур на нановолоконных матриксах, состоящих из отдельных полимерных нитей, возникновение сил такого порядка может приводит к изменению их структуры. Коэффициент жёсткости каждого волокна сравним с жёсткостью цитоскелета, что даёт клеткам возможность производить изменение структуры нановолоконных подложек. В предыдущем разделе были показаны различия в механизме прикрепления к нановолоконной подложке между неонатальными кардиомиоцитами и сердечными фибробластами. В этом разделе представлено исследование воздействия неонатальных кардиомиоцитов и сердечных фибробластов на отдельные нановолокна во времени.

В покое цитоскелет распластанных клеток находится под определённым натяжением, которое передаётся на волокна. Сокращение акто-миозинового комплекса кардиомиоцитов прилагает дополнительную силу к волокнам. На Рисунке 1.11 (а) показан неонатальный кардиомиоцит крысы в покое, выращенный на подвешенном волокне. За пределами клетки волокно натянато и имеет прямую форму. Однако в районе прикрепления клетки имеются 3 точки изгиба, которые схематично изображены на панели (г). Углы на схема соотносятся как  $2\alpha + 180 = \beta + \gamma$ . Угол изгиба  $\alpha$  в этом случае составляет  $\sim 75^\circ$ . На панели (б) изображена та же клетка на волокне со сниженным натяжением, что было достигнуто путём пространственного сближения его концов. Полимерный филамент остался после этого по-прежнему натянутым, но изгиб волокна  $\alpha$  в районе прикрепления клетки увеличился до  $125^\circ$ . На Рисунке 1.11 (в) показано сокращение этого кардиомиоцита. В результате угол изгиба волокна дополнительно увеличился на  $10^\circ$ .

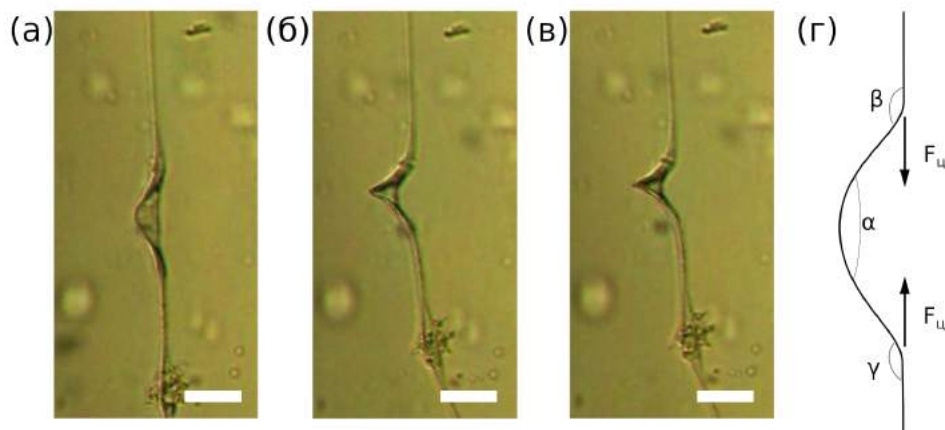


Рисунок 1.11 — Деформация нановолокна неонатальным кардиомиоцитом и влияние натяжения на его морфологию. (а) - Кардиомиоцит в покое на натянутом волокне. (б) - кардиомиоцит в покое на волокне с ослабленным натяжением. (в) - Кардиомиоцит на ослабленном волокне в состоянии сокращения. Шкалы масштаба 20 мкм. (г) - Схема деформации волокна кардиомиоцитом.

Деформации волокна клеткой противодействует его натяжение и жёсткость материала. Для проверки воздействия клетки на полимерный филамент без натяжения, был проведён эксперимент с разрезанием волокон, что лишало их натяжения. Он представлен на Рисунке 1.12. На панели (а) показано натянутое волокно с посаженными фибробластами и кардиомиоцитами. Оно имеет характерные изгибы в районе роста клеток. На панели (б) показан результат

разрезания этого волокна. Кардиомиоциты под номерами 1, 2, 3 согнули волокно примерно на  $180^\circ$ . На Рисунке 1.12 (в) показана другая пара волокон с клетками на них. После их обрезания, что показано на панели (г), кардиомиоциты изогнули волокна сильнее, чем фибробласты.

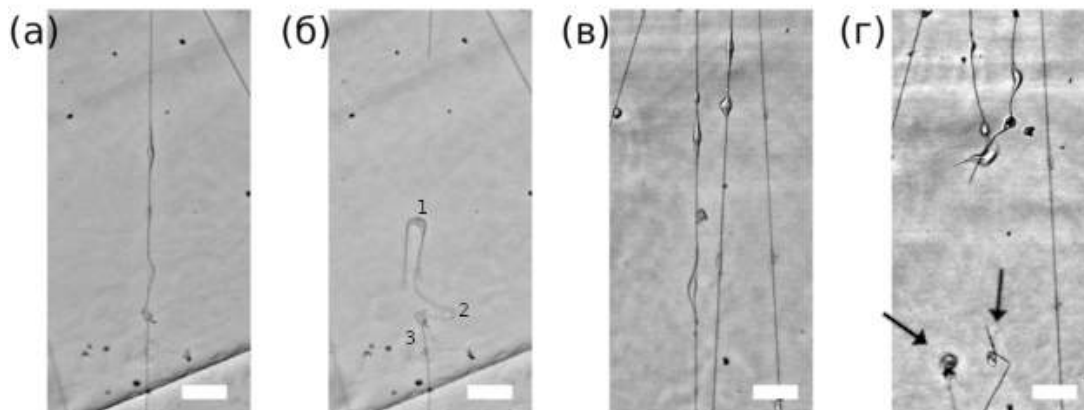


Рисунок 1.12 — Поведение кардиомиоцитов и сердечных фибробластов при внезапном снижении силы натяжения волокна. (а) - Кардиомиоциты и фибробласты на натянутом волокне. Кардиомиоциты отмечены цифрами. (б) - Деформации кардиомиоцитов и фибробластов после снижения натяжения. (в) - Кардиомиоциты и фибробласты на натянутых волокнах. Кардиомиоциты отмечены стрелками. (г) - Деформации кардиомиоцитов и фибробластов после снижения натяжения. Шкалы масштаба 50 мкм.

Так же изучался вопрос долгосрочного влияния роста клеток на пространственную организацию волокон. На Рисунке 1.13 представлена микрофотография сердечного фибробласта, развивающегося в течении 72 ч. на нановолокне, что соотносится с литературными данными [90]. В этих местах фибробласт прикладывает силу и натягивает волокно.

На Рисунке 1.13 (б) показан неонатальный крысиный кардиомиоцит. В месте прикрепления клетки волокно также изогнуто, но наличие 5 точек перегиба говорит о дополнительном сайте адгезии посередине клетки, зафиксировавшем волокно в таком положении. Кардиомиоцит на панели (в) так же вызвал деформацию волокна с пятью точками изгиба. Это объясняется тем, что за счёт наличия костамер [87] кардиомиоцит может прикрепляться к подложке по всей площади поверхности, по сравнению с фибробластом, который на отдельном волокне образует 2 отдельных кластера фокальных контактов [90].

Эксперимент с обрывом волокон показал, что после разрезания волокон кардиомиоциты, в отличие от фибробластов, сильно сжимались и теряли

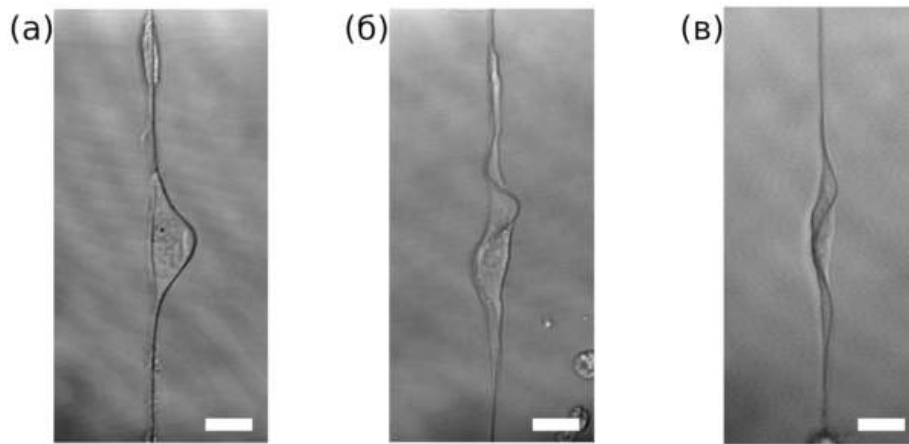


Рисунок 1.13 — Культивация отдельных кардиомиоцитов и сердечных фибробластов на одиночных нановолокнах в течение 72 часов. (а) - Фибробласт на одиночном волокне. Видны два фокальных контакта и 3 точки перегиба нановолокна. (б, в) - Отдельные кардиомиоциты на единичных нановолокнах. Волокно натянуто за пределами клетки. В месте прикрепления нанофиламент имеет 5 точек изгиба, что говорит о наличии дополнительных сайтов прикрепления в середине клетки. Шкалы масштаба 10 мкм.

свою пространственную конфигурацию. Возможно, кардиомиоциты не смогут развить нормальный фенотип на волокнах из полилактида без натяжения. Полученные результаты находятся в соответствии другими данными, свидетельствующими о наличии порога минимальной жёсткости подложки, необходимой для нормального развития неонатальных кардиомиоцитов и фибробластов [94;95]. Известно, что во время распластывания клетки в её цитоскелете возникает напряжение, передающееся подложке. При низком модуле Юнга субстрата, в соответствии с законом Гука, произойдёт слишком сильное его сжатие под действием сил упругости цитоскелета, и клетка не сможет распластаться. Сжимая волокно на одном из участков, клетка поддерживает достаточный для элонгации уровень натяжения нити. Другими словами, происходит самонатяжение волокон.

### Обсуждение результатов раздела

В настоящем разделе представлено исследование ультраструктурных и динамических характеристик прикрепления кардиомиоцитов и сердечных фибробластов к отдельным подвешенным нановолокнам, проведённое с помощью высокоразрешающих и прижизненных методов микроскопии. Приведённые дан-

ные раскрывают ранее не известный механизм адгезии сердечных клеток к нановолоконным субстратам и создают новый перспективный взгляд на то, как такие подложки могут взаимодействовать с растущими на них клетками. Рассмотренный материал позволяет сделать вывод о том, что прикрепление кардиомиоцитов к отдельным адгезивным нановолокнам происходит в виде их обёртывания клетками, в результате чего площадь контакта значительно увеличивается. Для фибробластов характерна минимизация контакта с волокнами, что нарушается только в местах расположения фокальных контактов, где происходит частичное обвивание подложки. Изучение динамических взаимодействий сердечных клеток и отдельных полимерных филаментов показало, что фибробласты стягивают нановолокна, образуя в простейшем случае пару кластеров фокальных контактов. А кардиомиоциты по мере развития увеличивают натяжение волокон, фиксируя положение деформированной части прикреплением к ней.

При сравнении адгезии кардиомиоцитов и фибробластов с нановолокнами, нужно отметить, что, как было показано в предыдущих исследованиях, на подвешенных полимерных нитях фибробласты образуют несколько кластеров интегриновых рецепторов - фокальных контактов (ФК). Их количество зависит от конфигурации волокон к которым они прикреплены [90]. В простейшем случае веретенообразной морфологии фибробласта на одном волокне образуются 2 ФК, которые принимают участие в растяжении клетки в продольном направлении, как показано на Рисунке 1.3. Соответствующее удлинение клетки ограничено размером ядра, которое является относительно жёстким по сравнению с другими компонентами клетки и менее подвержено деформации. При росте клетки на нескольких нановолокнах, формируются более двух кластеров фокальных контактов. При этом формируется лидирующий край клетки, растягивающий её [146]. В актиновом цитоскелете, напротив, действуют силы, направленные на уменьшение площади его поверхности. В результате этого минимизируется контакт со всеми волокнами вне адгезионных контактов, так как поглощение волокон энергетически не выгодно [145]. Таким образом фибробласты на взвешенных волокнах находятся под натяжением и могут прикладывать силу к волокнам только в местах расположения фокальных контактов. В отличие от фибробластов, адгезионные молекулы присутствуют в костамерах кардиомиоцитов - структурах, которые присоединяют саркомеры к субстрату [87; 147–149]. Таким образом, миоциты могут иметь гораздо больше точек креп-

ления к подложке, что стабилизирует области взаимодействия клетки с ЕСМ. Когда кардиомиоцит развивается на подвешенных нановолокнах, миофибриллы начинают ориентироваться по волокну и прикрепляться к нему, максимизируя область взаимодействия с подложкой. В результате волокно поглощается миофибриллой, несмотря на то, что такая конфигурация энергетически не выгодна [145]. Было показано преимущественное примыкание миофибрилл к нановолокнам, что косвенно свидетельствует о поглощении полимерных филаментов за счёт прикрепления Z-дисков к подложке за счёт костамер.

Этот пространственный паттерн волоконно-клеточных взаимодействий приводит к нескольким важным последствиям, которые необходимо учитывать. Во-первых, это механическая адгезия. Хотя волокна относительно тонки, обволакивание их клетками делает поверхность контакта намного больше, чем если бы культура клеток развивалась на плоском субстрате. Этот феномен улучшает адгезию сердечных клеток к нановолоконным матрицам, что может быть важно при помещении клеточных культур в механически нестабильные условия, самым значимым из которых является возникновение напряжения сдвига, отдирающего клетки с субстрата. Такие условия возникают, например, при имплантации ткане-инженерных конструкций в миокард. Во-вторых, в случае создания умных подложек, высвобождающих биологически активные вещества, молекулы из полимерных волокон, размещённых внутри клеток, не рассеются полностью в окружающем растворе, но диффундируют непосредственно из волокна через мембрану в цитоплазму клетки. Это делает эффективную концентрацию намного выше, так как утечка через наноразмерный зазор, соединяющий волокно со средой будет незначительным. В-третьих, в случае использования электрически проводящих полимеров, погружение волокна в клетку делает возможным электрический контакт соседних клеток при условии, что волокна изолированы от окружающего ионного раствора.

## 1.2 Изучение формирования тканеподобных клеточных структур за счёт волоконно-клеточных взаимодействий

### 1.2.1 Самоорганизация клеток на сетках нановолокон в трёхмерные структуры

В предыдущих разделах было показано, как протекают волоконно-клеточные взаимодействия на уровне отдельных клеток и волокон. Было выяснено, что существует разница между кардиомиоцитами и фибробластами в их прикреплении и взаимодействии с полимерными нановолокнами. В этой главе представлено исследование коллективного взаимодействия культур клеток сердечной ткани с сетками нановолокон. В ходе исследования удалось установить, что волоконно-клеточные взаимодействия в такой системе приводят к формированию тканеподобных клеточных структур.

В разделе 1.1.2 было показано, что отдельные фибробласты и кардиомиоциты натягивают нановолокна в продольном направлении, а сила их сокращения возрастает со временем до достижения максимальной величины [101]. В простейшем случае роста клеток на отдельных подвешенных волокнах это приводит к деформации полимерных филаментов в местах посадки клеток и постепенному их растяжению.

Была проведена оценка лёгкости поперечной деформации волокна по сравнению с продольной. На Рисунке 1.14 (а) показана схема смещения конца волокна длиной  $L$  на величину  $dx$  в продольном и поперечном направлениях. Растяжение волокна  $dl$  в продольном случае будет равно его смещению  $dx$ , а в поперечном случае - много меньше. Зависимость отношения  $\frac{dl/L}{dx/L}$  относительных растяжения и смещения конца в поперечном направлении от  $dx$  можно посчитать по формуле  $\frac{dl/L}{dx/L} = \sqrt{1 + \left(\frac{L}{dx}\right)^2} - \frac{L}{dx}$ .

График этого выражения на Рисунке 1.14 (б) при относительном смещении  $< 50\%$  хорошо интерполируется прямой. Наклон этой прямой равен 0.5, что говорит о том, что растяжение волокна в 2 раза меньше чем смещение его конца в поперечном направлении. По закону Гука  $F_{upr} = -k * dl$  сила, прикладываемая к волокну клеткой пропорциональна его растяжению. Если зафиксировать силу, прикладываемую клеткой к подложке, то она будет вызывать большие

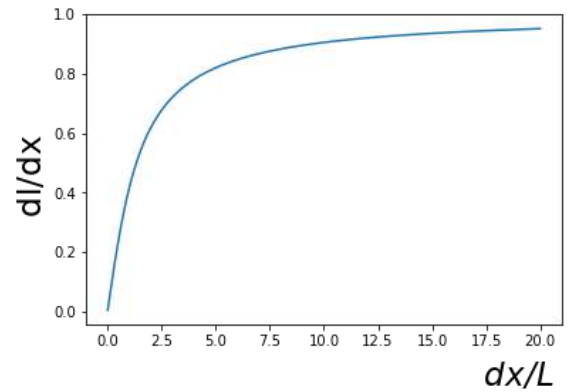
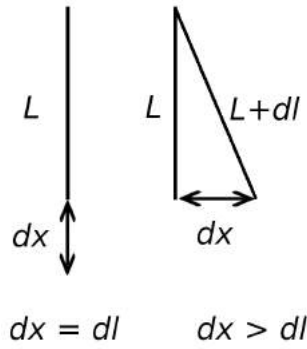


Рисунок 1.14 — (а) - Схема, демонстрирующая отношение растяжения волокна  $dl$  и смещения его конца  $dx$  в продольном и поперечном направлениях. (б) - График, демонстрирующий зависимость отношения  $\frac{dl/L}{dx/L}$  от относительного смещения  $\frac{dx}{L}$  конца волокна в поперечном направлении. При относительных смещениях  $< 50\%$  растяжение волокна  $dl$  в 2 раза меньше смещения  $dx$ .

смещения волокон в перпендикулярном к ним направлении по сравнению с продольным. Поэтому была высказана гипотеза, что на сетке волокон клетки будут их перемещать, меняя таким образом конфигурацию всей системы.

Таким образом клетки могут деформировать волокна в поперечном направлении больше чем в продольном. В разделе 1.1.1 было показано, что кардиомиоциты могут обволакивать сразу несколько полимерных волокон, таким образом скрепляя их и фиксируя их положение. Из литературы известно, что клетки с кадгеринами одного типа на поверхности мембраны склонны к агрегации [59; 150]. При достаточно большом количестве клеток и плотности нановолокон такие волоконно-клеточные взаимодействия могут приводить к значительным трансформациям всей системы, что изучалось в данном разделе.

Для выяснения коллективного влияния волоконно-клеточных взаимодействий кардиомиоциты и фибробласты высаживались на сетки полимерных волокон (см. Рисунок 1.15). Каждый субстрат представлял из себя прозрачное стекло на поверхность которого были помещены 2 параллельные полоски из ПДМС на расстоянии 15 мм друг от друга. Толщина каждой полоски составляла 3 — 5 мм. Поверхность стекла между полосками была покрыта агарозным гелем для предотвращения прикрепления клеток. Между полосками из ПДМС наносились полимерные адгезивные нановолокна из поли-Л-лактида (PLLA), с преимущественным направлением, перпендикулярным длинной стороне полосок. При приготовлении образцов варьировались такие параметры как



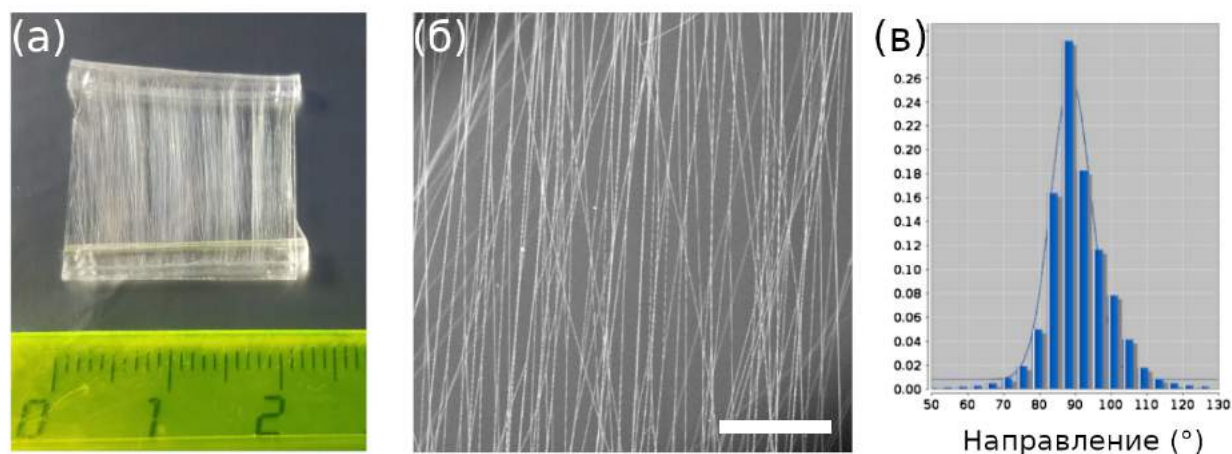


Рисунок 1.15 — Образец с сеткой полимерных нановолокон. (а) - Общий вид образца. По краям квадратного стекла 22x22 мм помещаются две полоски из ПДМС, перпендикулярно которым напыляются адгезивные нановолокна из полилактида. (б) - СЭМ изображение сетки полимерных волокон плотностью 35 волокон/мм. Средняя толщина волокон  $683 \pm 175$  нм. Шкала масштаба 0,5 мм. (в) - Типичное распределение по направлениям в образце, вычисленное с помощью метода локального градиента плагином ImageJ Directionality.

плотность и преимущественное направление волокон, что было нужно для выяснения влияния этих параметров на процесс самоорганизации сердечных клеток.

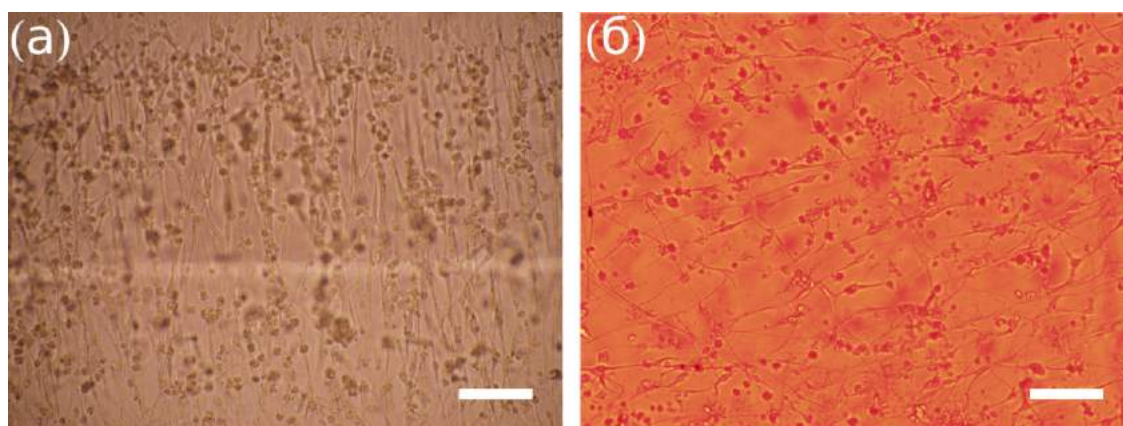


Рисунок 1.16 — Кардиомиоциты и сердечные фибробласты, выращенные на подвешенной сетке нановолокон. (а) - Сердечная культура на выровненной сетке волокон с плотностью 67 волокон/мм. (б) - Сердечная культура на сетке нановолокон с низкой степенью ориентации и плотностью 19 волокон/мм. Шкалы масштаба 100 мкм.

На Рисунке 1.16 показаны сердечные клетки, посаженные на сетки с разной степенью ориентации полимерных волокон. Фотографии сделаны спустя 24 часа после посадки. На обоих изображениях можно заметить не только живые

клетки, но и мёртвые, имеющие характерный вид тёмных шариков. Так же у этих образцов разная плотность волокон:  $\sim 67$  волокон/мм и  $\sim 19$  волокон/мм соответственно. Эти параметры влияют на среднюю ширину участков волокон, не пересекающихся с другими волокнами. На обеих сетках можно отметить, что клетки, развивающиеся на свободных участках филаментов, элонгированы. А клетки на пересечении волокон имеют полигональную форму.

При последующей культивации происходило ремоделирование сетки клетками. Спустя одни сутки после высадки кардиомиоцитов и фибробластов произошло их первоначальное прикрепление к нановолокнам без изменения пространственного расположения полимерных филаментов. После этого проводилась съёмка поведения всей системы с интервалом в 1 сутки.

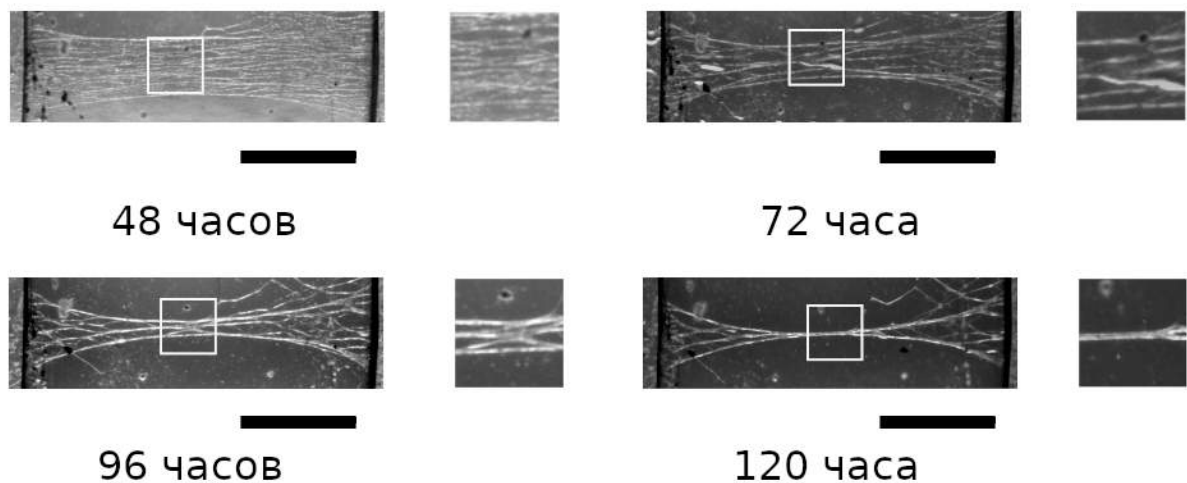


Рисунок 1.17 — Интервальная съёмка с периодом в 1 сутки процесса ремоделирования сетки полимерных волокон культурой клеток сердца. Области, выделенные белыми квадратами, показаны на вставках справа. Изначальная ширина сетки 2 мм, плотность  $\sim 40$  волокон/мм. Шкалы масштаба 4 мм.

На Рисунке 1.17 показана трансформация сетки шириной 2 мм и плотностью  $\sim 40$  волокон/мм во времени. По мере роста и развития клетки стягивали нановолокна в поперечном направлении, что приводило к формированию первичных кластеров волокон, скреплённых клетками. Агрегаты волокон можно видеть на вставке на панели (б) по прошествии 72 часов после посадки клеток. Такие первичные пучки формировались связанными между собой, что позволяло им сближаться далее под действием сокращения клеток. В результате, спустя 120 часов после культивации, образовался единый пучок, названный вторичным. Нужно отметить, что полное объединение отдельных тяжей произошло только в середине жгута, а на участках, более близких к краям, первичные

пучки и отдельные волокна не объединились. Это произошло ввиду того, что концы полимерных филаментов жёстко закреплены на полосках из ПДМС и могут смещаться вбок только за счёт растяжения. Максимальная степень отклонения волокна от его изначального положения возможна в середине, поэтому сердечные ткани быстрее всего формируются на этом участке.

На Рисунке 1.18 показана сетка с плотностью  $\sim 44$  волокон/мм, сопоставимой с 1.17, но шириной 7 мм. В этом случае так же происходило ремоделирование сетки, изменение положения волокон и формирование первичных пучков. Из-за большой ширины крайние кластеры волокон должны были быть подвергнуты более сильному растяжению для формирования единого пучка по сравнению со случаем на Рисунке 1.17. Однако, из-за недостатка силы сокращения клеток переплетённые между собой первичные пучки не смогли сблизиться для формирования вторичного пучка.

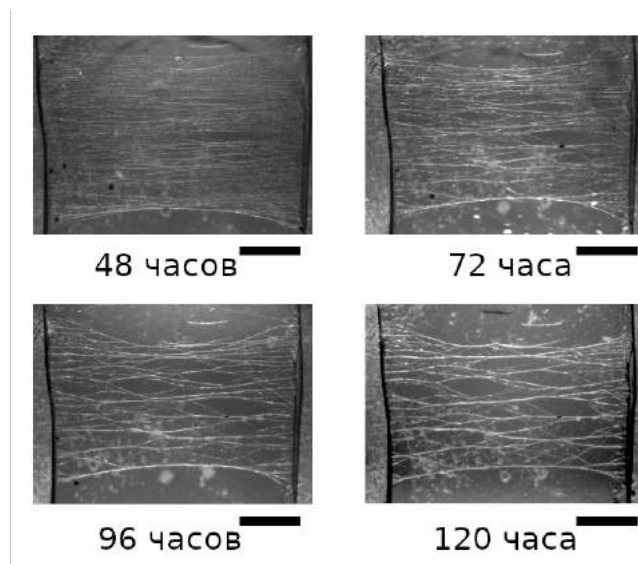


Рисунок 1.18 — Фотографирование с интервалом в 1 сутки процесса ремоделирования сетки полимерных волокон культурой клеток сердца. Ширина сетки 7 мм, плотность  $\sim 44$  волокон/мм. Образовалась сетка взаимосвязанных клеточных пучков, которые не смогли объединиться из-за большой ширины сетки.

Шкалы масштаба 4 мм.

Для того, чтобы получить сердечные жгуты, сформированные по всей длине, культуры клеток сердца высаживались на сетки, концы которых могли перемещаться. Образцы представляли собой круглые покровные стёкла, диаметром 11 мм, покрытые слоями агарозы и сахарозы. Поверх наносились ориентированные нановолокна из полилактида. После этого сетка разрезалась

на части по 3 мм вдоль направления выравнивания. После посадки культуры, края волокон могли двигаться из-за неполного прикрепления к стеклу.

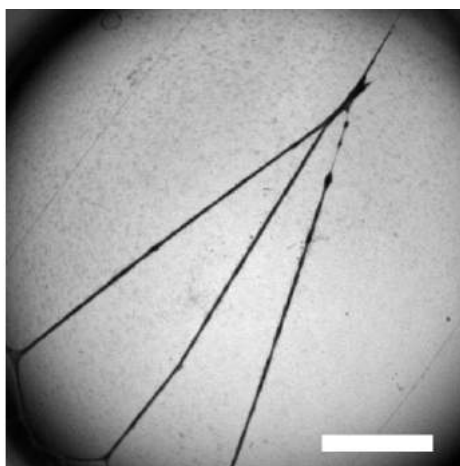


Рисунок 1.19 — Сформированные кардиальные жгуты, полученные в результате ремоделирования культурой клеток сердца сетки полимерных нановолокон с перемещаемыми концами. Жгуты получены из участков сетки, шириной 3 мм. Шкала масштаба 2 мм.

На Рисунке 1.19 показан сформированный жгут на сетке с перемещаемыми концами. На каждом участке изначальной сетки образовался пучок, состоящий из клеток и волокон с ровными краями и постоянной толщиной.

### 1.2.2 Иммуноцитохимическое исследование структуры кардиальных жгутов

Исследование структуры полученных жгутов производилось с помощью методов иммуноцитохимии, конфокальной микроскопии, гистологии и просвечивающей электронной микроскопии.

Для исследования на конфокальном микроскопе проводилось иммуноцитохимическое окрашивание кардиальных микротканей. На представленных КЛСМ снимках зелёным цветом показаны актиновые филаменты, окрашенные красителем Alexa Fluor 488 Phalloidin; синим цветом показаны клеточные ядра, окрашенные красителем DAPI, красным цветом показаны полимерные нановолокна и митохондрии, окрашенные Rhodamine 6G.

На Рисунке 1.20 представлены флуоресцентные конфокальные снимки кардиальных жгутов. На панели (а) показана микрофотография жгута в проходящем свете, выполненная по методу светлого поля. На панели (б) показан флуоресцентный снимок этого же жгута. Для трёхмерной реконструкции структуры этого жгута и оценки формы его поперечного сечения был получен Z-стек из 41 снимка с шагом 1 мкм. Из этой серии оптических срезов вдоль белых стрелок были реконструированы 3 поперечных сечения, представленные на Рисунках 1.20 (г). Можно отметить, что форма сечений на разных участках одного кардиального пучка различается, представляя из себя эллипсы с разным эксцентриситетом. Средняя ширина этого пучка равняется  $46 \pm 4$  мкм (10 измерений).

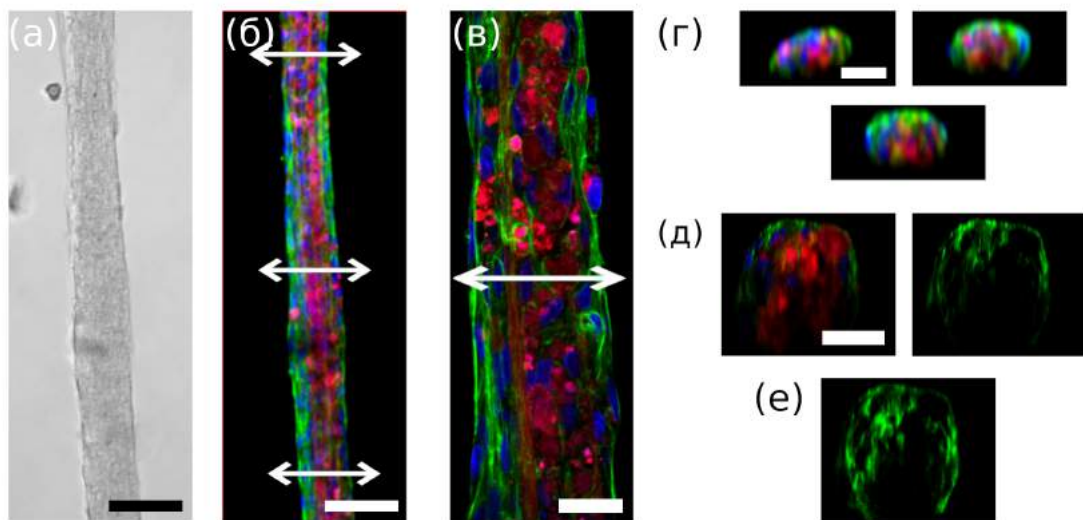


Рисунок 1.20 — КЛСМ иммуноцитохимические снимки крысиных кардиомиоцитов и сердечных фибробластов, реорганизовавших сетку полимерных волокон в трёхмерные жгуты. (а) - Оптический снимок в проходящем свете кардиальной микроткани. (б) - КЛСМ оптический срез в плоскости XY кардиальной микроткани. Её средняя толщина составляет  $46 \pm 4$  мкм. Сечения пучка вдоль белых стрелок показаны на панели (г). (в) - КЛСМ снимок другой кардиальной микроткани, толщиной  $44 \pm 2$  мкм. Реконструкции поперечного оптического среза вдоль белой стрелки показаны на панели (д). Форма сечения этого кардиального жгута более приближена к окружности по сравнению с (а, б). Шкалы масштаба (а, б) 50 мкм, (в, г, д, е) 20 мкм.

На Рисунке 1.20 (в) представлен снимок другого кардиального жгута с большим увеличением. Его средний диаметр на показанном участке составляет  $44 \pm 2$  мкм. Реконструкция аксиального сечения вдоль белой стрелки представлена на панели (д). Эти снимки показывают распределение актина (зелёный),

ядер, волокон и митохондрий в объёме микроткани. Стоит отметить высокое затухание сигнала актина из толщи образца, которое видно на панели (д). Для удаления этого артефакта визуализации была проведена коррекция затухания, алгоритм которой приведён в приложении А.1. В этом алгоритме предполагалось, что сигнал затухает как линейная функция начиная от поверхности жгута. Сечение жгута с коррекцией затухания приведено на панели (е).

Для описания формы сечения жгутов было введено понятие эксцентриситета, рассчитываемого по формуле для вычисления эксцентриситета эллипса:

$$e = \sqrt{1 - \frac{b^2}{a^2}} \quad (1.1)$$

где  $a$  соответствует большой полуоси сечения,  $b$  - малой полуоси сечения. В такой записи  $e = 0$  соответствует окружности, а  $e = 1$  соответствует прямой.

По оптическим срезам жгутов на Рисунках 1.20 (б, в) можно судить о форме сечения кардиальных жгутов. Сечения на панели (г) имеют эксцентриситеты 0,84, 0,76 и 0,67 соответственно. Сечение на панели (д) имеет эксцентриситет 0,32, что говорит о том, что его форма ближе к окружности.

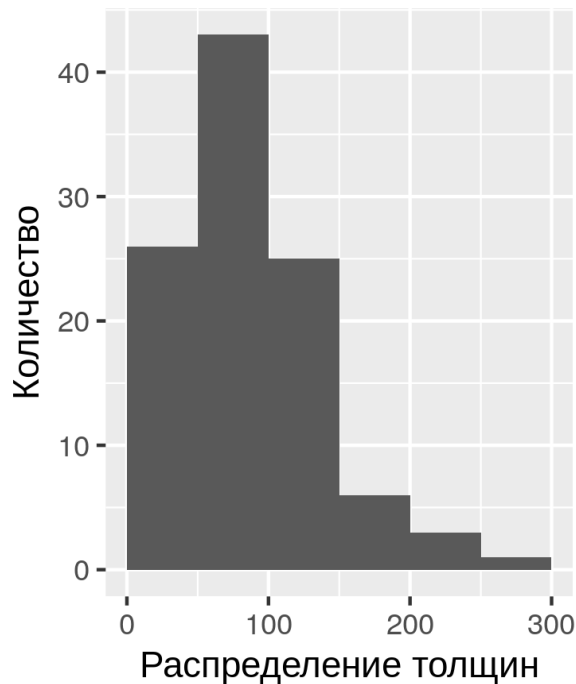


Рисунок 1.21 — Гистограмма, показывающая распределение диаметров сформированных кардиальных микротканей на 4 или 5 день культивации.

На начальном этапе формирования пучки представляют из себя плоскую сетку полимерных нановолокон. Ввиду её малой толщины форма сечения такой конструкции будет иметь максимальный эксцентриситет примерно равный «1».

На следующих этапах формирования происходит сближение отдельных волокон друг с другом, формирование и объединение первичных пучков, что сопровождается уменьшением ширины и увеличением толщины всей конструкции. Этот процесс идёт в сторону минимизации свободной энергии и максимизации контакта между клетками и с адгезивной подложкой [151]. Как при формировании сфероидов [152], когда за счёт межклеточных взаимодействий происходит формирование шара, форма сечения подобных микротканей стремится к окружности.

На Рисунке 1.22 показано иммуноцитохимическое окрашивание и трёхмерная реконструкция на конфокальном микроскопе трёх кардиальных пучков с Рисунка 1.19. На панели (а) показан снимок с малым увеличением сформированных жгутов. Увеличенная область, обозначенная белым квадратом показана на панели (б). Зелёным здесь обозначен F-актин, синим обозначены ядра клеток. Вдоль двух белых линий были проведены реконструкции поперечных срезов микротканей. Форма каждого кардиального жгута на этой панели является эллипсом.

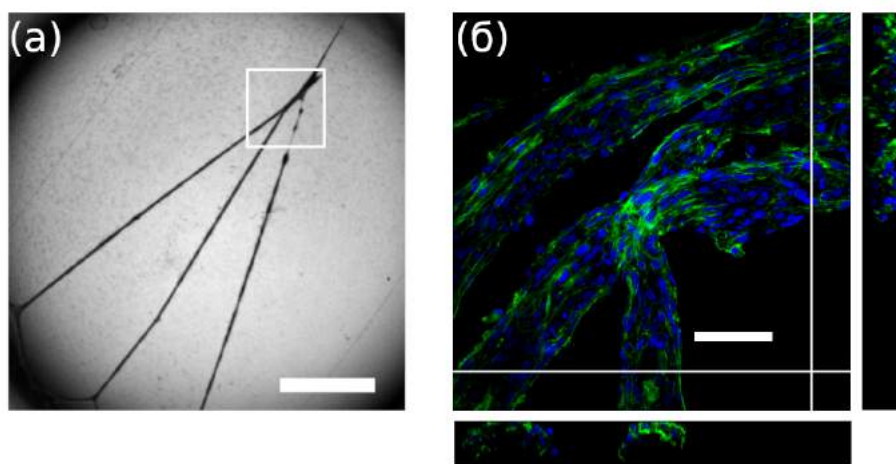


Рисунок 1.22 — Кардиальные микроткани в проходящем свете и при флуоресцентной визуализации. (а) Шкала 2 мм. (б) Шкала 50 мкм.

На Рисунке 1.23 представлен анализ распределения волокон внутри кардиальной микроткани, изображённой на Рисунке 1.20 (в). Волокна в данном образце были окрашены флуорофором Rhodamine 6G. Для этого красителя коррекция интенсивности не требовалась, так как его спектр испускания находится в более длинноволновой области и поэтому затухает слабее [153]. На

панели (а) показан оптический срез, демонстрирующий флуоресценцию только полимерных нановолокон. На этом изображении видны два плотных пучка нановолокон. Вдоль белых стрелок были реконструированы оптические срезы в плоскости XZ, которые показаны на панели (б). Полученные изображения были сегментированы вручную для локализации волокон. Результаты сегментирования показаны на панели (в). На этой схеме синим цветом обозначено расположение основной фракции волокон в представленном образце.

По этой схеме видно, что на каждом срезе волокна находятся на одной прямой. Трёхмерная реконструкция (панель (д)) позволила сделать вывод, что нановолокна на фрагменте единой поверхности. Из-за высокой степени переплетения между волокнами в изначальной сетке, их движение друг относительно друга было невозможно без нарушения механической целостности. Поэтому в результате волоконно-клеточных взаимодействий участок сетки в виде полосы изогнулся таким образом. По полученным снимкам можно оценить изначальную ширину полосы, которая составила  $440 \pm 50$  мкм (4 измерения). Ввиду того, нановолокна в объёме клетки представляют из себя неразрывную поверхность, можно предположить, что это первичный жгут, не объединявшийся с другими жгутами.

### 1.2.3 Электронно-микроскопическое и гистологическое исследование структуры кардиальных жгутов

В этом разделе представлено исследование структуры кардиальных жгутов методами гистологии, просвечивающей растровой электронной микроскопии (ПРЭМ) и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Для исследования этими методами зафиксированные образцы пропитывались эпоксидной смолой, после затвердевания которой выполнялись полутонкие и ультратонкие срезы. Протоколы подготовки образцов подробно описаны в Материалах и методах в разделах [0.8.5](#), [0.8.6](#), [0.8.7](#).

На Рисунке [1.24](#) (а) представлено ПРЭМ изображение полутонкого среза двух кардиальных жгутов, обозначенных цифрами «1» и «2». Тёмные, более электронно плотные, области отражают расположение клеток по образцу. Свет-



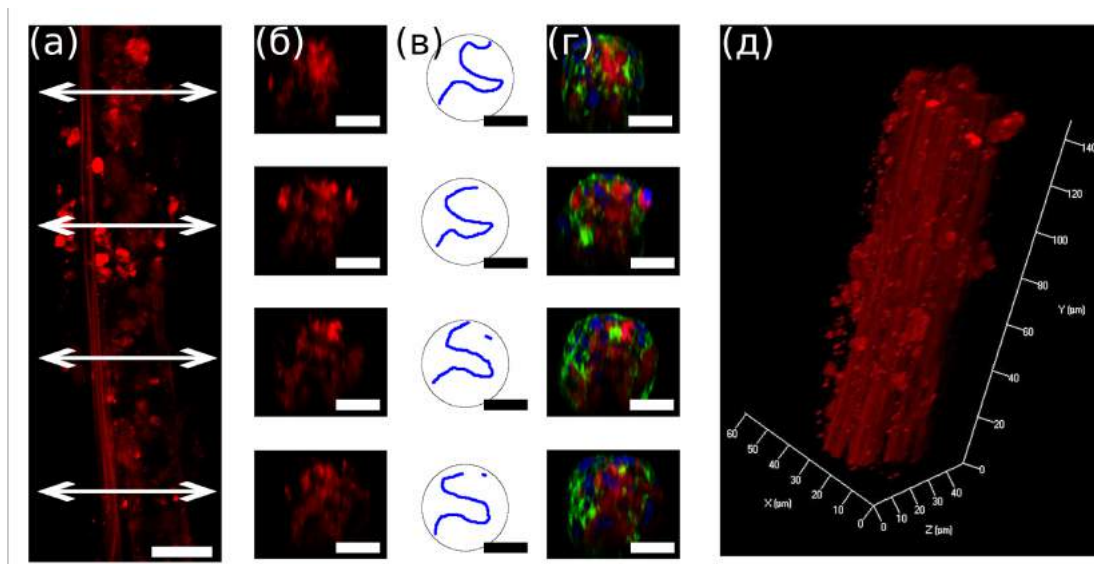


Рисунок 1.23 — Анализ расположения волокон в кардиальном жгуте, визуализированного на конфокальном микроскопе. Красным обозначен краситель Rhodamine 6G, окрасивший волокна и митохондрии. (а) - Оптический срез микроткани. Виден плотный пучок волокон. (б) - Реконструированные сечения вдоль белых стрелок. (в) - Схемы, показывающие расположения основной фракции волокон на (б). Видно, что волокна лежат на одной кривой. (г) - Оптические срезы, дополнительно показывающие распределение актина и ядер. (д) - Трёхмерная реконструкция расположения волокон в объёме микроткани.

Шкалы масштаба 15 мкм.

лые точки, обозначенные на изображениях стрелками, - полимерные волокна. В сечении пучки имеют вытянутую форму, их эксцентриситеты по формуле 1.1 равны 0.96 и 0.99 соответственно, что говорит об их нахождении на стадии формирования. На панели (б) показано увеличенное изображение микроткани, обозначенной цифрой «1». На этом снимке в верхней части представленного жгута видно скопление нановолокон в количестве 10 штук.

На панелях (в, г) Рисунка 1.24 показаны микрофотографии гистологического препарата кардиального жгута, обозначенного цифрой «1» на панели (а). Этот срез так же выполнен в аксиальной плоскости жгута. Стоит отметить, что для исследования методами гистологии и электронной микроскопии, микротомирование выполнялось на разных приборах, вследствие чего между соседними срезами образовывался зазор в пределах 1 мм. Поэтому изображения одних и тех же образцов, полученные разными методами соответствуют друг другу не полностью.

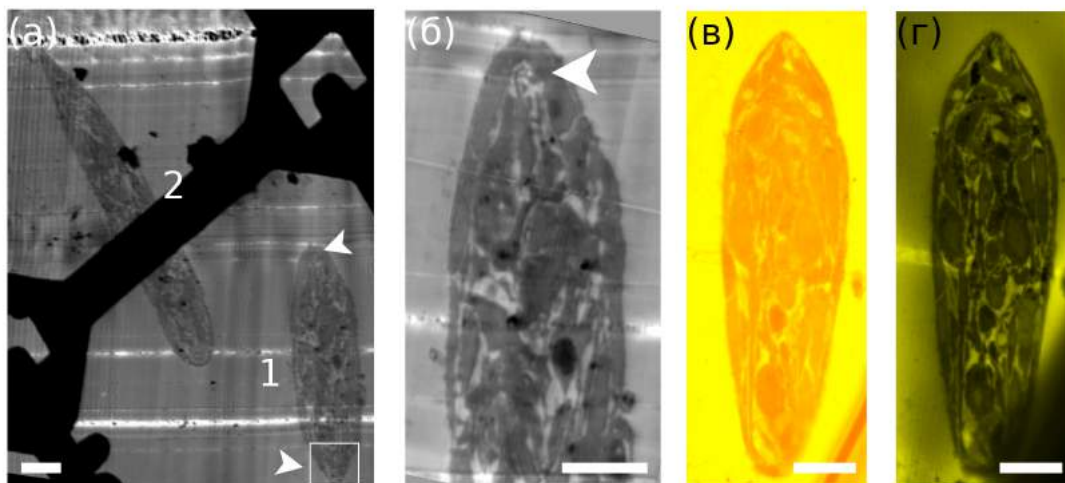


Рисунок 1.24 — Гистологическое и электронно микроскопическое исследование жгутов. (а, б) - ПРЭМ изображения полутонкого поперечного среза кариального жгута. Чёрным цветом на изображении показана медная сеточка для поддержки срезов. (в) - Оптический снимок в проходящем свете гистологического образца, окрашенного по Гимзе. (г) - Автофлуоресценция заливочной среды - эпоксидной смолы Епон 812. Шкала масштаба 10 мкм.

На Рисунке 1.24 (в) представлен результат окрашивания препарата фуксином, который маркирует мышечные волокна и коллаген красным цветом. На панели (г) показано КЛСМ изображение автофлуоресценции заливочной среды жгута - эпоксидной смолы Епон 812. По представленным изображениям можно оценить морфологию клеток в жгуте. Видны отличия в форме клеток во внутреннем и внешнем слоях. Клетки во внешнем слое имеют уплощённую форму, ровные границы, высокую степень анизотропии. Ядра большинства клеток деформированы - приплюснуты, что говорит о присутствии достаточного (повышенного) напряжения в цитоскелетах клеток, что характерно для распластаных по подложке клеток [144]. Во внутреннем слое наблюдается большой разброс по формам клеток, морфологии которых разнятся от сферических до уплощённых.

ПЭМ микрофотографии клетки, обозначенной на Рисунке 1.24 (а) цифрой «1», представлены на Рисунке 1.25. На панели (а) представлено увеличенное изображение области, обозначенной на Рисунке 1.24 (а) белым прямоугольником. В нижней части данного снимка можно различить кластер полимерных нановолокон, чей увеличенный снимок представлен на панели (б). На нём различимы 14 полимерных нанофиламентов. Так же на фото видно, что скрепление

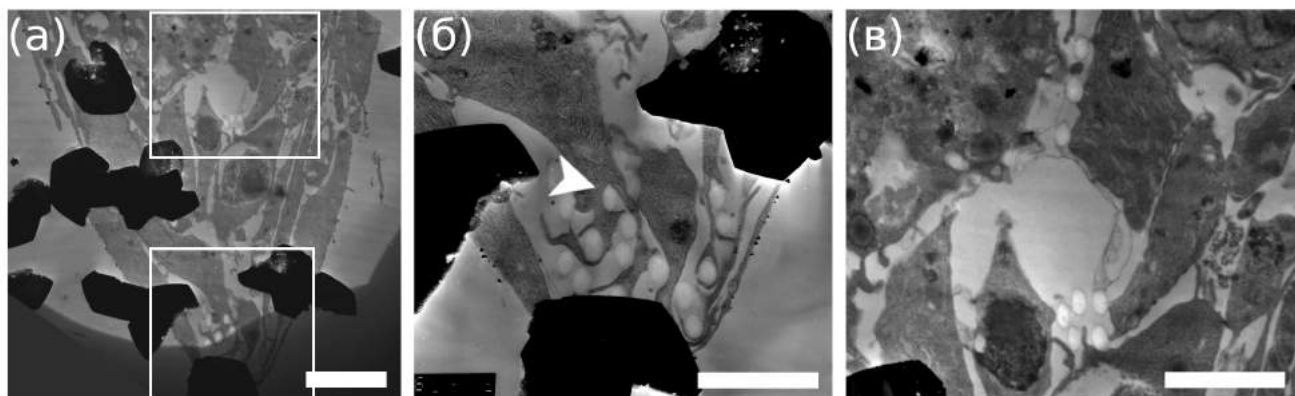


Рисунок 1.25 — ПЭМ микрофотографии кардиального жгута, имеющего в своём составе кластер полимерных нановолокон. (а) - снимок нижней оконечности жгута, обозначенного цифрой «1» на Рисунке 1.24. Шкала 5 мкм. (б) - Увеличенный снимок области, обозначенный на панели (а) белым прямоугольником снизу. Виден кластер из 14 полимерных волокон, скреплённый микровыростами фибробластов. Чёрные шестиугольники - отложения цитрата свинца. Шкала 3 мкм. (в) - Увеличенный снимок области, обозначенный на панели (а) белым прямоугольником сверху. Шкала 3 мкм.

волокон между собой произошло за счёт обвивания их микровыростами фибробластов.

Увеличенный снимок области, выделенной белым прямоугольником в верхней части изображения на панели (а), представлен на панели (в). На этом участке волокна находятся как в отдельном состоянии, так и в виде кластера из 5 волокон. Однако клетки имеют нетипичную морфологию, что может говорить об их поражении некротическими процессами.

Кластеры волокон в микроткани, обозначенной цифрой «1» на Рисунке 1.24 (а), расположены в двух противоположных максимально удалённых точках, обозначенных белыми стрелками. Такое асимметричное расположение кластеров говорит о формировании данной микроткани путём объединения двух первичных кардиальных пучков.

На Рисунке 1.26 представлены гистологические и электронно микроскопические снимки поперечного среза кардиального жгута, обозначенного на Рисунке 1.24 (а) цифрой «2». На панели (а) показан оптический снимок гистологического образца, окрашенного фуксином. Степень анизотропии формы клеток на срезе можно оценить в  $6 \pm 3$ . Средний угол направления клеток от-

носительно оси  $Y$  составляет  $0^\circ \pm 9^\circ$ . При этом в нижней части клетки более ориентированы, чем в верхней.

На Рисунке 1.26 (б) представлено ПРЭМ изображение того же кардиального жгута. На этом изображении полностью визуализирован поперечный срез изучаемого образца. Эксцентриситет этого жгута составляет 0,99, что выше эксцентриситета жгута, обозначенного цифрой «1» на Рисунке 1.24 (а). В трёхмерном пространстве форма такого жгута с высоким эксцентриситетом напоминает форму «ленты».

На панели (в) представлена ПЭМ микрофотография верхней оконечности жгута, обозначенная на (б) белым прямоугольником. В этой области есть как кластер полимерных нанофиламентов, состоящий из 6 нитей, так и отдельные волокна, выделенные белыми стрелками. На панели (г) представлена ПЭМ микрофотография нижней оконечности жгута, так же обозначенная на (б) белым прямоугольником. С этого края жгута в форме ленты располагаются два кластера нанофиламентов, состоящие из 6 и 4 филаментов. Так же на этом снимке можно видеть мёртвые клетки, обозначенные чёрными стрелками, которые выглядят как однородные серые области с круглым сечением.

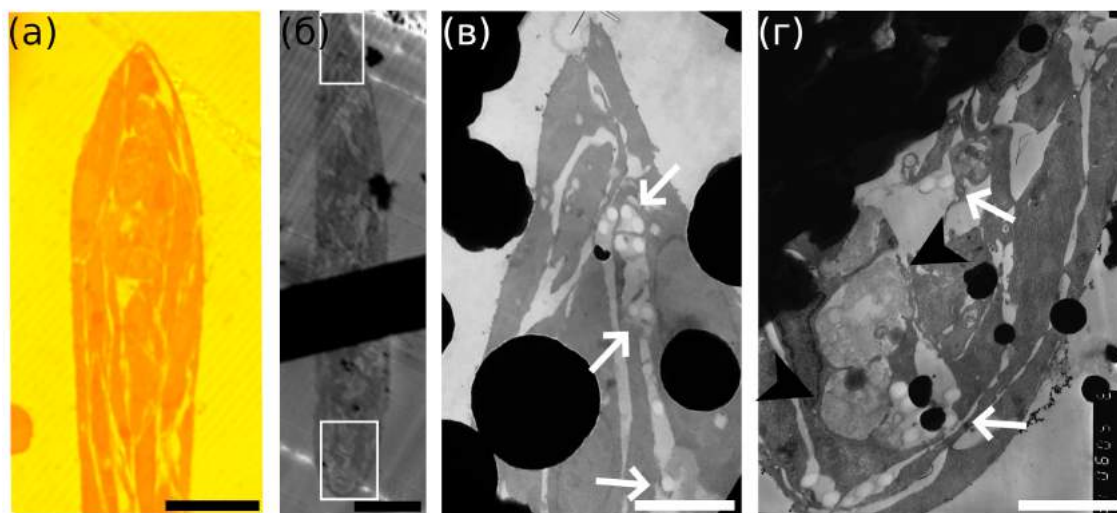


Рисунок 1.26 — Гистологическое и электронно микроскопическое исследование кардиального жгута. (а) - гистологический снимок полутонкого среза кардиального жгута, обозначенного цифрой «2» на Рисунке 1.24. (б) - ПРЭМ микрофотография этого среза. (в, г) - ПЭМ микрофотографии ультратонкого среза этого кардиального жгута. Чёрные области на изображениях - следы загрязнения среза цитратом свинца.

На Рисунке 1.27 представлена ПЭМ микрофотография средней области вытянутого жгута с Рисунка 1.26. Как видно на снимке, эта область не содержит полимерных нановолокон. На этом участке практически все клетки имеют нормальную ультраструктуру, присущую живым клетками. Можно обнаружить только одну клетку, поражённую некрозом. Она выделена чёрной стрелкой. Клетки на этом снимке образуют 8 слоёв. Их формы значительно анизотропны, что свидетельствует о высокой степени их ориентации. Направление выравнивания клеток говорит о направлении механического напряжения [154]. В данном случае эта сила направлена от одного заострённого конца микро-ткани к другому.

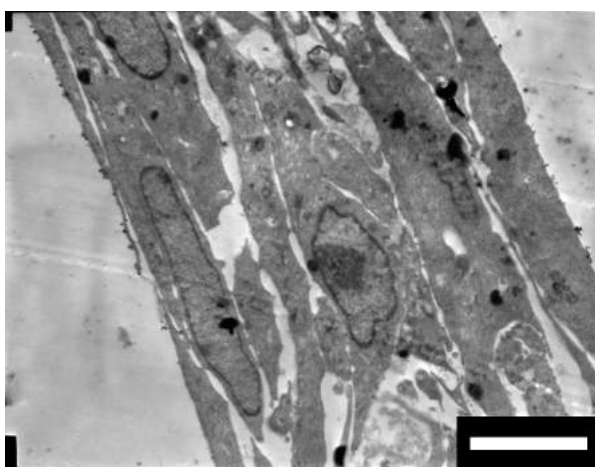


Рисунок 1.27 — ПЭМ микрофотография участка жгута без нановолокон. Высокая степень ориентации клеток говорит о наличии механического напряжения в этом образце. Шкала масштаба 5 мкм.

Гистологическое и электронно микроскопическое исследование жгута, чья форма сечения более приближена к окружности, представлено на Рисунке 1.28. На Рисунках 1.28 (а, б) представлен снимок полутонкого среза в проходящем свете, окрашенного фуксином, и КЛСМ снимок автофлуоресценции среды заливки. Эксцентриситет показанного жгута составляет 0.76, что меньше эксцентриситета жгутов с Рисунка 1.24 (а). Это говорит о том, что он находится на более поздней стадии формирования. У этого жгута так же различается морфология клеток во внешнем опоясывающем слое и внутри. Степень анизотропии клеток во внешнем для жгута на этом снимке составляет  $5.0 \pm 1.6$ . Степень анизотропии клеток внутри жгута составляет  $2.2 \pm 1.4$ . Клетки во внешнем слое ориентированы по касательной к поверхности, во внутреннем слое они направлены случайно, что не учитывалось при вычислении их анизотропии.

На представленных гистологических снимках хорошо различимы 14 клеток в состоянии некроза, которые имеют вид круглых светлых областей. Средний диаметр таких клеток составляет  $9.5 \pm 1.2$  мкм. Как видно на этом снимке, во время посадки мёртвые клетки также прикрепляются к волокнам, оказываясь в центре микроткани. На этом срезе они занимают 23 % площади сечения жгута. Стоит отметить, что такие клетки присутствовали в образце с момента посадки, и их наличие относится к недостаткам использования первичной культуры, а не процессам некроза внутри жгута. Использование первичных культур, например, на основе кардиомиоцитов дифференцированных из индуцированных плюрипотентных клеток, может устранить эту проблему.

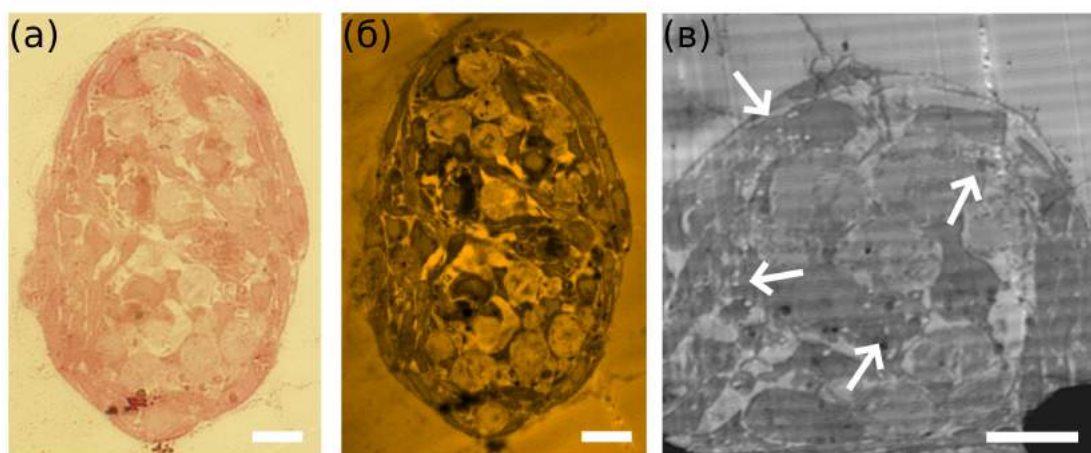


Рисунок 1.28 — Гистологическое и ПРЭМ микрофотографии кардиального жгута. Шкалы масштаба 10 мкм.

На Рисунке 1.28 (в) представлена ПРЭМ микрофотография неконтрастированного полутонкого среза того же кардиального жгута. На этом изображении различимы отдельные полимерные нановолокна, обозначенные белыми стрелками. Стоит отметить, что на этом снимке все полимерные нанофиламенты находятся не в виде кластеров, а отдельно друг от друга. Круглые, менее электронно плотные области, относятся к мертвым клеткам.

Для кардиальных микротканей, исследованных с помощью просвечивающей электронной микроскопии, были рассчитаны морфологические параметры, приведённые в Таблице 2. Распределение волокон в объёме кардиальных микротканей ( $N = 6$ ) на ПЭМ снимках показано на Рисунке 1.29.

Объединение первичных пучков во вторичный может быть рассмотрено с термодинамической точки зрения. С такой позиции агрегат клеток будет иметь наиболее стабильное состояние при минимизации свободной энергии. Это будет

Таблица 2 — Морфологические параметры микротканей, измеренные на ПЭМ снимках

Параметр	Размер выборки	Значение
Анизотропия во внешнем слое	6	$5.0 \pm 1.6$
Анизотропия во внутренних слоях	6	$2.2 \pm 1.4$
Пористость	6	$22 \pm 3 \%$
Диаметр нановолокон	6	$430 \pm 50$ нм

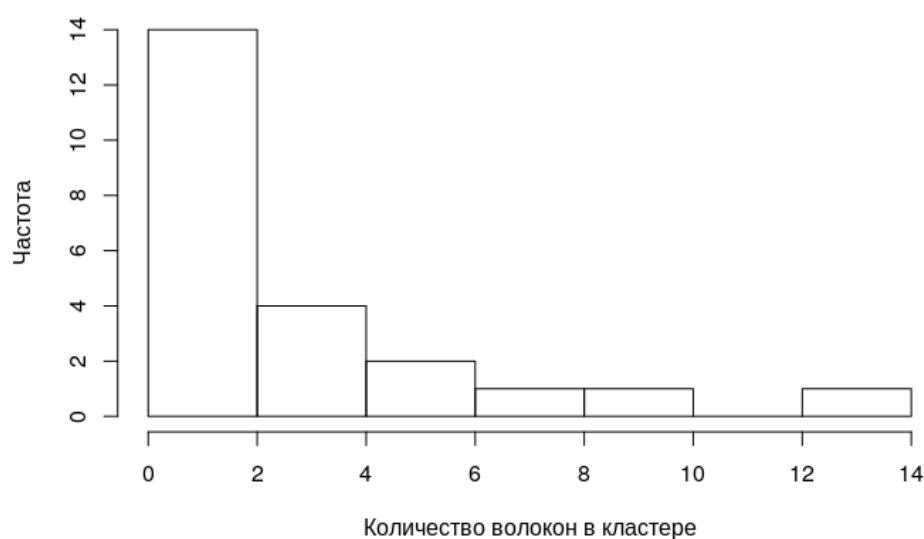


Рисунок 1.29 — Распределение волокон в объёме кардиальных микротканей на ПЭМ снимках. Преобладает одиночное расположение клеток.

достигаться при максимизации контакта между клетками и между клетками и адгезивной подложкой [151]. По такому принципу клеточные агрегаты без контакта с адгезивной подложкой формируют сфероиды [152]. Наличие выровненных адгезивных волокон приводит к формированию «цилиндрических сфероидов» или жгутов.

Схема формирования вторичного пучка из первичных по такому принципу, с помощью которого может быть объяснено формирование микротканей с Рисунка 1.24 (а), показана на Рисунке 1.30. Отдельные в начальный момент времени первичные каридальные пучки соприкасаются на каком-то участке. В результате межклеточной когезии происходит формирование клеточного «мостика», который запускает механизм минимизации свободной энергии и мак-

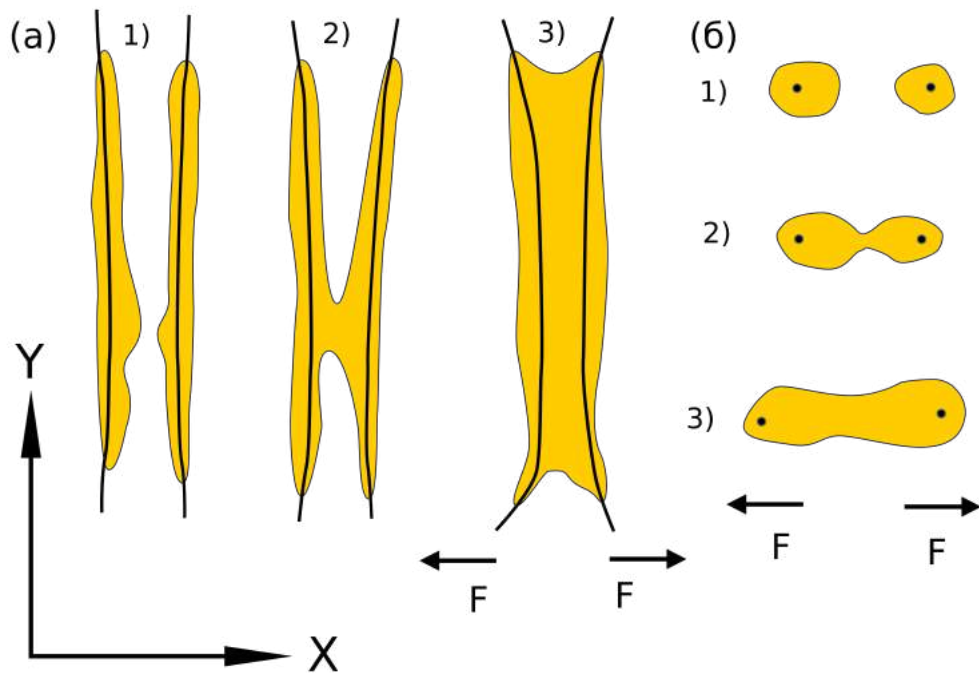


Рисунок 1.30 — (а) - Схема, поясняющая объединение первичных пучков и возникновение напряжения в кардиальной микроткани. Кардиальная микроткань во фронтальном и аксиальном сечениях показана оранжевыми овалами. Кластеры полимерных волокон показаны толстыми чёрными линиями. (1) - Два первично образовавшихся пучка волокон могут сблизиться друг с другом из-за деформации полимерной сетки или могут быть в соприкосновении изначально. (2) - При контакте двух пучков происходит образование «мостика», который расширяется со временем из-за межклеточных взаимодействий, стягивая пучки друг к другу. (3) - После завершения объединения образуется единый пучок. Однако в таком пучке полимерные волокна могут быть натянутыми, что вызывает напряжение в плоскости  $XZ$  и соответствующую ориентацию клеток. (б) - Схема этого процесса в перпендикулярной плоскости  $XZ$ .

симизации контакта между клетками. С течением времени площадь «мостика» растёт, при этом клетки сокращаются, стягивая пучки нановолокон друг к другу. Оказавшиеся по краям пучки полимерных волокон натягивают микроткань, вызывая ориентацию клеток вдоль вектора напряжения.



### 1.2.4 Оптическое картирование кардиальных жгутов

Для проверки функциональной активности жгутов была проведена их стимуляция с одновременной записью электрической активности сердечных клеток с помощью оптического картирования. Для этого сформированные кардиальные жгуты окрашивались  $Ca^{2+}$ -зависимым флуоресцентным красителем fluo-4, позволяющим визуализировать кальциевые волны, участвующие в формировании потенциала действия кардиомиоцитов.

На Рисунке 1.31 (а) показано флуоресцентное изображение сетки 4х дневных кардиальных жгутов. На представленном образце можно выделить 6 сформированных жгутов и одну область, в которой кардиальный пучок находится в стадии формирования. Картирование кардиальных жгутов для измерения скоростей распространения волн возбуждения выполнялось в области, выделенной белым прямоугольником. Увеличенное изображение этой области показано на панели (б). На ней присутствуют четыре жгута с разными диаметрами. На панели (в) представлены линии, вдоль которых проводилось измерение скорости волн с помощью пространственно-временных развёрток [155].

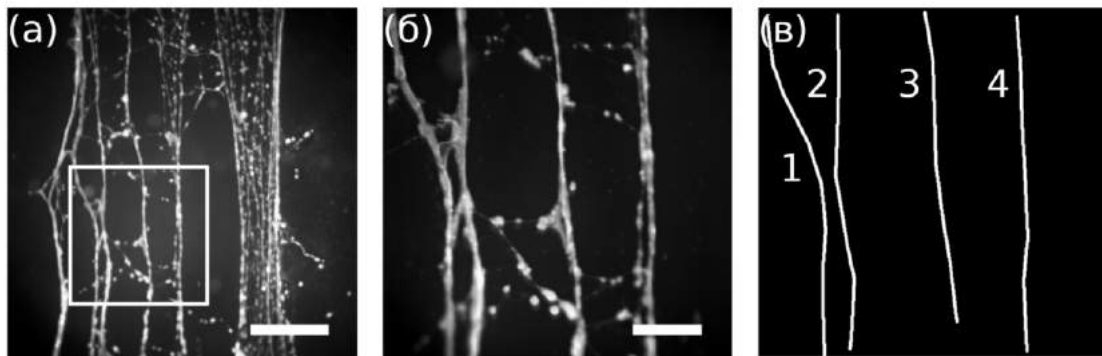


Рисунок 1.31 — Картирование кардиальных жгутов (а) - Флуоресцентный снимок сетки нановолокон с кардиальными жгутами на разных стадиях формирования. Белым квадратом выделена область картирования. Шкала масштаба 2,5 мм. (б) - Область картирования кардиальных жгутов, обозначенная на (а) белым квадратом. (в) - Схема, показывающая расположение прямых, вдоль которых измерялась скорость. Шкала масштаба 1 мм.

В Таблице 3 показаны скорости проведения волны возбуждения по сердечным пучкам, обозначенным цифрами 1 - 4 на Рисунке 1.31 (б). Наибольшая

скорость распространения в этом наборе составляет  $36 \pm 8$  мм/с, что находится в типичных пределах для скоростей проведения, наблюдаемых в монослоях сердечных кардиомиоцитов [156]. Однако, такая скорость свидетельствует о преобладании фибробластов в изучаемых сердечных культурах. Наименьшая скорость проведения в  $22 \pm 4$  мм/с наблюдалась в самом тонком кардиальном жгуте. В сердечной культуре со значительным содержанием фибробластов кардиомиоциты самоорганизуются в сетку [157] за счёт взаимодействия кадгеринов на их поверхности [158], что позволяет электрическим импульсам распространяться даже в культурах с низким количеством возбудимых клеток. Но при одинаковой фракции кардиомиоцитов в сердечной микроткани, в более толстой их абсолютное количество будет больше, что может быть причиной более быстрого распространения возбуждения по толстому жгуту.

Таблица 3 — Скорости проведения волн возбуждения в сердечных пучках и средние толщины этих пучков. (N = 14 - 16 измерений)

Номер жгута	1	2	3	4
Скорость проведения [ $\frac{mm}{s}$ ]	$36 \pm 8$	$32 \pm 8$	$22 \pm 4$	$24 \pm 6$
Толщина [мкм]	$98 \pm 8$	$86 \pm 18$	$55 \pm 16$	$72 \pm 14$

На Рисунке 1.32 показаны результаты картирования несформированного жгута. На панели (а) показано флуоресцентное изображение этого жгута, окрашенного флюо-4. Можно заметить, что он состоит из двух плотных первичных пучков по краям и разреженной сетки волокон в середине, состоящей из параллельных друг другу первичных сердечных пучков и соединений между ними. Средняя скорость проведения по толстым пучкам составляла  $35 \pm 5$  мм/с. Также электрический импульс проходил в направлении поперёк пучкам. Скорость такого распространения составляла  $2.5 \pm 0.7$  мм/с, что значительно ниже скорости вдоль пучков, но говорит о наличии связей в виде волокон и клеток между отдельными первичными пучками. Такие «мостики» продолжают стягивать находящиеся по краям пучки, что может привести к их объединению. На панели (б) представлена карта активации распространения волн возбуждения по несформированному кардиальному пучку. По этой карте видно, что на данном образце волна возбуждения имеет сложную форму, что говорит о неоднородном распределении связей между отдельными жгутами.

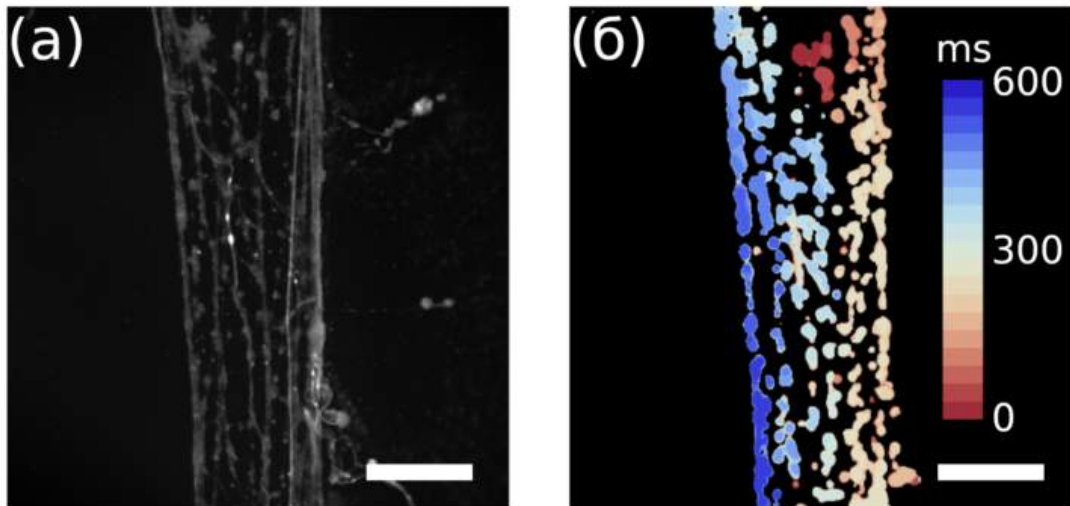


Рисунок 1.32 — Картирование кардиального жгута, находящегося на стадии формирования (а) - Флуоресцентный снимок. По краям видна два плотных кардиальных пучка. Плотность волокон в центре более низкая по сравнению с краями. (б) - Карта активации. Шкалы масштаба 1 мм.

### 1.2.5 Модельная васкуляризация кардиального жгута

На Рисунке 1.33 представлено иммунофлуоресцентное исследование размещение фибриллярных структур внутри кардиального жгута. Для этого к сердечной культуре, культивируемой на сетке полимерных нановолокон, спустя одни сутки культивации добавлялись адгезивные ворсинки с толщиной порядка 10 мкм. По мере развития они оказывались внутри сердечной микроткани. Такие ворсинки могут быть заменены на структуры, позволяющие улучшить питание микроткани, например, на полые волокна, получаемые с помощью электроспиннинга [159]. Поэтому такой эксперимент можно рассматривать как модельную васкуляризацию кардиального жгута.

На панели (а) показано оптическое изображение в проходящем свете кардиального жгута с адгезивной ворсинкой внутри, обозначенной белой стрелкой. На панели (б) показано конфокальное иммуноцитохимическое изображение кардиального жгута с толстым полимерным филаментом внутри. Длина филамента в этом случае составила  $271 \pm 4$  мкм. Вдоль белых стрелок из стека последовательных оптических срезов в плоскости XY были реконструированы оптические срезы в плоскости XZ, показанные на панелях (в, г, д). Для

зелёного канала данного стека изображений была применена процедура коррекции затухания флуоресценции в толще образца, описанная в приложении А.1. У толстого полимерного филамента, показанного на данном рисунке, средняя площадь сечения составляет  $166 \pm 13$  мкм<sup>2</sup>, средний диаметр в XY плоскости составляет  $18.7 \pm 1.2$  мкм.

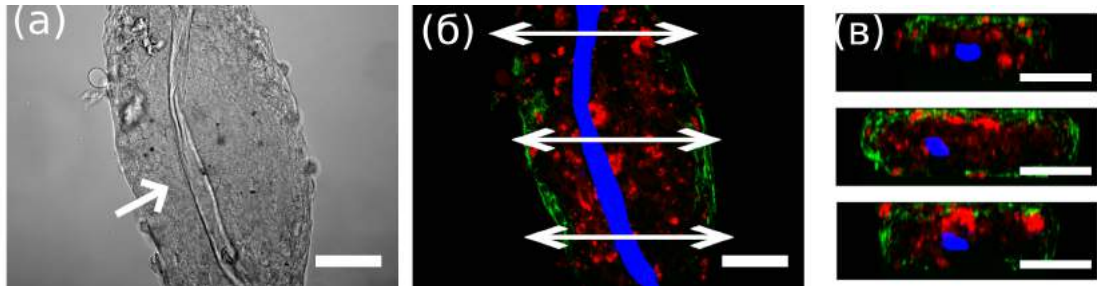


Рисунок 1.33 — Модельная васкуляризация кардиального жгута. (а) - Оптический снимок в проходящем свете кардиального жгута с толстым полимерных филаментов внутри. Филамент выровнен по оси микроткани. (б) - Иммуноцитохимический конфокальный снимок кардиального жгута с толстым полимерным филаментом внутри, представляющим модель капилляра. Актиновый цитоскелет обозначен зелёным, нановолокна и мёртвые клетки обозначены красным, толстое микроволокно обозначено синим. Это доказывает возможность размещения в объёме полых полимерных структур, позволяющих улучшить питание областей жгута, удалённых от поверхности. Вдоль белых стрелок реконструированы флуоресцентные оптические срезы в плоскости XZ. (в - д) - Оптические срезы в плоскости XZ кардиального жгута с толстым полимерным филаментом внутри. Видно, что волокно, обозначенное синим цветом, находится внутри жгута, в окрестности его центра. Шкалы масштаба - 50 мкм.

Рисунок 1.34 представляет модельную васкуляризацию другого кардиального жгута. В этом случае внутрь микроткани удалось поместить более длинный толстый полимерный филамент, чем на Рисунке 1.33. Длина филамента составляла  $742 \pm 9$  мкм. Насколько можно судить по этому изображению, этот филамент выровнен вдоль главной оси микроткани и на всём своём протяжении находится у неё внутри.

При анализе 7 сердечных микротканей, выращиваемых в присутствии адгезивных ворсинок, в 6 из них ворсинки располагались внутри жгутов и были выровнены вдоль главной оси.

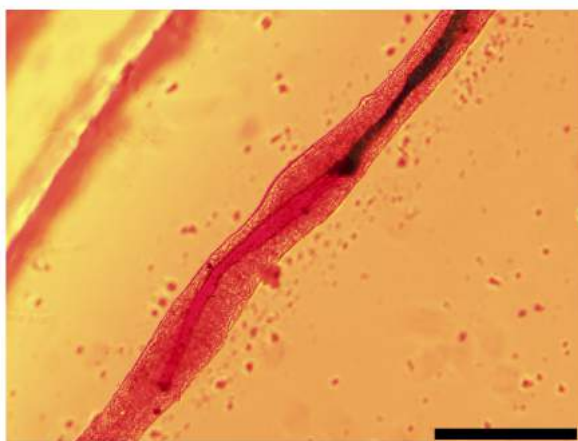


Рисунок 1.34 — Сердечная микроткань, с полимерным филаментом толщиной 20 мкм внутри. Длина микрофиламента составляет  $742 \pm 9$  мкм. Он выровнен по главной оси жгута. Шкала масштаба 100 мкм.

**Обсуждение результатов раздела** В данной главе описано получение трёхмерных тканеподобных клеточных структур *in vitro* новым способом - за счёт ремоделирования сетки полимерных нановолокон кардиомиоцитами и фибробластами.

Было показано, что микроткани формируются за счёт волоконно-клеточных взаимодействий. Как фибробласты так и кардиомиоциты при культивации на нановолоконных подложках стягивают полимерные филаменты. При высадке этих типов клеток на достаточно плотные сетки нановолокон, происходит сближение отдельных элементов системы. Вначале формируются переплетённые между собой первичные клеточные пучки, которые со временем объединяются во вторичные. Во время этого процесса ширина сетки уменьшается, но происходит утолщение всей конструкции. Форма её сечения стремится к окружности. На процесс образования микротканей влияют степень ориентированности волокон в сетке, среднее расстояние между волокнами, ширина фрагмента сетки. В данном разделе приведены основные особенности формирования кардиальных пучков, но для более детального их описания нужны дополнительные исследования с использованием методов трёхмерной микроскопии высокого разрешения, например, сканирующей зондовой нанотомографии [132].

Оптическое картирование волн возбуждения показало, что сформированные кардиальные жгуты функционально активны, т.е. они проводят электрические импульсы и сокращаются в ответ на электрическую стимуляцию. Функциональная активность важна для использования в качестве модели сер-

дечной ткани при изучении физиологии сердца *in vitro* или исследования действия лекарств. Однако, для такого использования необходимо разработать методы повышения фракции кардиомиоцитов в микроткани и методы увеличения её размеров. Подходом к увеличению объёма кардиальных жгутов может стать постепенное сведение закреплённых концов волокон друг к другу. Так же интересно было бы создать внеклеточный матрикс из волокон и гидрогеля. Такой внеклеточный матрикс может улучшить питание ткани за счёт диффузии веществ с её поверхности. С другой стороны, его структура более приближена к естественной, в которой коллагеновые нановолокна сопротивляются растяжению ткани, а гидрогель их полисахаридов сопротивляется её сжатию.

В данной главе был разработан метод размещения в микротканях объёмных фибриллярных структур, который может быть использован для модельной васкуляризации кардиальных жгутов. В качестве модельных сосудов использовались адгезивные ворсинки диаметром порядка 10 мкм. Однако для полноценной демонстрации возможности васкуляризации надо использовать другие материалы, позволяющие организовать циркуляцию питательной среды. Можно использовать, например, полые нановолокна, получаемые электроформованием [160].

## Глава 2. Определение оптимальных условий имплантации сердечных клеток

### 2.1 Определение оптимальных условий имплантации пейсмекерных клеток в тканеинженерной модели сердечной ткани *in vitro*

Одной из распространённых патологий, вызывающих сердечную недостаточность, является повреждение проводящей системы сердца, ответственной за регулярность его сокращений. В настоящее время золотым стандартом терапии данной группы заболеваний является имплантация электронных кардиостимуляторов. Однако данный подход обладает целым рядом недостатков и ограничений: недостаточная связь с состоянием вегетативной нервной системы (при сильных эмоциональных переживаниях и физической нагрузке); нужда в техническом обслуживании, замене электродов и батареи устройства; риск заражения оборудования; отсутствие адаптации к росту педиатрических пациентов.

Генная и клеточная терапии открывают новые возможности в лечении брадиаритмий. В настоящее время исследования направлены на создание в миокарде группы клеток с пейсмекерной активностью, способных обеспечивать стабильный физиологичный ритм в течение всей жизни, без проаритмогенных эффектов и потребности в замене. Такие участки миокарда, имитирующие работу сердечного водителя ритма, могут быть созданы как трансплантацией аутогенных дифференцированных стволовых клеток [10; 161], так и прямым редактированием генома клеток на участке миокарда для придания им пейсмекерных свойств [162].

Способность клеток к периодической генерации потенциала действия может быть обеспечена путём их сенсibilизации к свету внедрением в плазмолемму канального родопсина 2 [163; 164]. Также пейсмекерная активность может быть основана на мембранных белках, обеспечивающих периодическую диастолическую реполяризацию и ритмичные возбуждения [161]. Но при трансплантации атипичных кардиомиоцитов с пейсмекерной активностью в миокард, 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. Поэтому в настоящей главе были проведены тканево-инженерные эксперименты по исследованию оптимального паттерна имплантации.

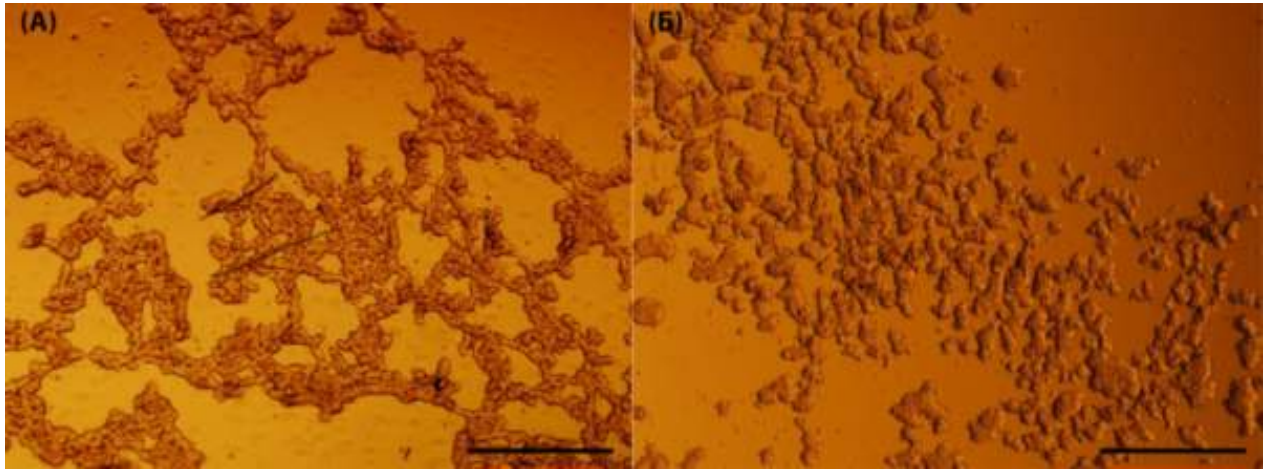


Рисунок 2.1 — Кластеры из светочувствительных клеток линии ChR2-HL1. (А) Сетка, которую образуют ChR2-HL1 на агарозном геле. (Б) Малые кластеры, получаемые на поверхности плоской неадгезивной подложки. Косое освещение.

Шкалы масштаба 200 мкм.

С целью определения условий, при которых возникают электрические связи между основными и подсаженными клетками был проведён ряд тканеинженерных экспериментов. В этих экспериментах роль пейсмекерных клеток выполняли светочувствительные клетки культуры ChR2-HL1 с трансфицированным канальным родопсином 2, демонстрирующие возбуждение на раздражение светом. Они вносились в виде отдельных клеток и в виде сфероидов (см. Рисунок 2.1). Для моделирования сердечной ткани органа-реципиента использовались монослои неонатальных кардиомиоцитов с различной структурой. В таком качестве использовались обычные изотропные монослои с 75% (субконфлюэнтные) и 100% конфлюэнтностью, анизотропные ориентированные культуры и полу-заселённые субстраты. Монослои с 75% и 100% конфлюэнтностью получались культивацией культуры на адгезивной подложке в течение 6 часов и 48 часов соответственно. Таким образом, на менее плотных монослоях около 25% адгезивного субстрата было открыто для взаимодействия, а на более плотных монослоях всю поверхность подложки закрывала сердечная культура. Анизотропные культуры получались формированием на субстрате ориентированных полимерных нановолокон [36]. Полузаселённые субстраты приготавливались посадкой клеток только на половину стекла, покрытого адгезивными белками.



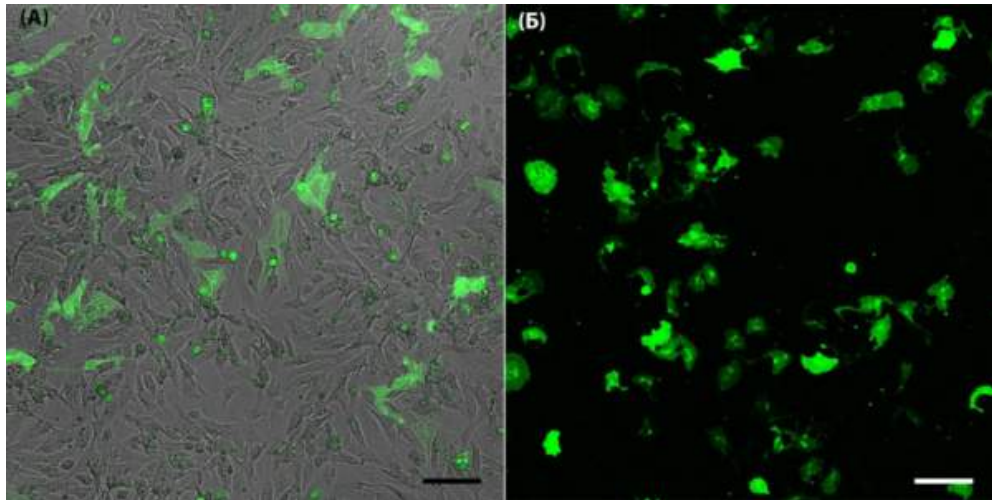


Рисунок 2.2 — Подсадка клеток линии ChR2-HL1 на культуру кардиомиоцитов и на адгезивный субстрат. (А) Первичная культура с подсаженными клетками ChR2-HL1. Светлое поле. Зеленым показана флуоресценция белка eYFP в клетках линии ChR2-HL1, встроенных в монослой первичной культуры желудочковых кардиомиоцитов крысы. (Б) Флуоресценция белка eYFP в отдельных кардиомиоцитах линии ChR2-HL1 (зеленый), выращенных на покровном стекле. Шкалы масштаба 100 мкм.

В первой серии экспериментов клетки ChR2-HL1 вносились на культуры крысиных неонатальных кардиомиоцитов с разным возрастом и разной конfluenceнтностью в виде отдельных клеток в суспензии или в виде кластеров (Рисунок 2.1) по 100 - 300 клеток. После совместной культивации сердечных монослоёв со светочувствительными клетками в течение 24 часов, с помощью флуоресцентных методов и иммуноцитохимии оценивалась структурная интеграция клеток ChR2-HL1 в монослой кардиомиоцитов, а с помощью оптического картирования оценивалось формирование с подсаженными клетками функционального синцития. Его образование определялось вероятностью оптической стимуляции данных образцов и максимальными критическими частотами, усваемыми ими при стимуляции светом.

Одиночные клетки подсаживаемой культуры ChR2-HL1 успешно интегрировались на монослой первичной культуры с 75 % и 100 % конfluenceнтностью (см. Рисунок 2.2). На Рисунке 2.3 представлена культура неонатальных желудочковых кардиомиоцитов с подсаженными в неё светочувствительными клетками ChR2-HL1 (см. Рисунок 2.3а) и контрольный образец светочувствительных клеток (см. Рисунок 2.3б).

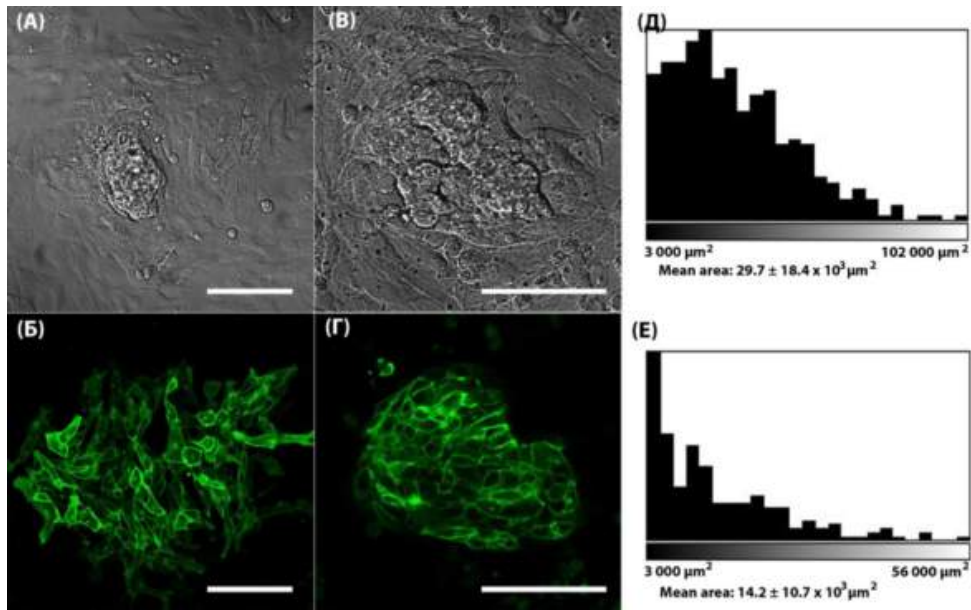


Рисунок 2.3 — Встраивание кластеров клеток линии ChR2-HL1 в первичную культуру крысиных кардиомиоцитов. Время совместного культивирования 24 часа. (А) Распластанный кластер, подсаженный на субконфлюэнтную первичную культуру желудочковых кардиомиоцитов крысы. Освещение по методу светлого поля. (Б) Флуоресценция химерного белка eYFP с каналом родопсином 2, встроенного в мембраны клеток линии ChR2-HL1. Клетки располагаются менее плотно и мигрируют из кластера в культуру. (В, Г) Кластер клеток ChR2-HL1 в светлом поле и при флуоресценции, подсаженный в полностью конфлюэнтной первичной культуре. Клетки в кластере располагаются плотно, миграция менее выражена, о чём говорит чёткий контур кластера. (Д, Е) Распределение по размерам подсаженных кластеров спустя 24 часа совместного культивирования при посадке суб- и конфлюэнтные монослои первичных культур соответственно. Под графиками указаны диапазоны размеров кластеров. Шкалы масштаба 100 мкм.

Кластеры, подсаженные на суб- и конфлюэнтные монослои клеток сердца, успешно прикреплялись к нему, но проявляли различное взаимодействие с культурой. На субконфлюэнтной культуре кластеры значительно распластывались, площадь их проекции увеличивалась примерно в 3 раза и лежала в диапазоне  $30 \pm 18 \times 10^3 \text{ мкм}^2$  (см. Рисунок 2.4е). Спустя 24ч после посадки кластеров на 100% конфлюэнтную культуру их средняя площадь составляла  $14 \pm 11 \times 10^3 \text{ мкм}^2$  (см. Рисунок 2.4д), что ближе к площади нераспластанных кластеров, составляющей  $11 \pm 7 \times 10^3 \text{ мкм}^2$ . Большая площадь кластеров на субконфлюэнтных культурах говорит о миграции клеток их них в окружающий

монослой (см. Рисунок 2.4 (а,б)). Напротив, кластеры на плотных монослоях имеют чёткую границу, что говорит о низкой миграции клеток (см. Рисунок 2.4 (в,г)). Иммуноцитохимическое исследование встраивания кластеров в такие культуры показало, что на субконфлюэнтных культурах происходит взаимопроникновение светочувствительных клеток кластера и основных клеток монослоя (см. Рисунок 2.4 (а, б, в, г)). При этом кластер значительно расплывается и его максимальная толщина составляет 3-4 слоя клеток. Напротив, кластер ChR2-HL1 на конфлюэнтном монослое имеет чёткий контур (см. Рисунок 2.4г), на трёхмерных реконструкциях видно, что слои кардиомиоцитов и светочувствительных клеток чётко различимы, а взаимопроникновения между двумя этими культурами не происходит.

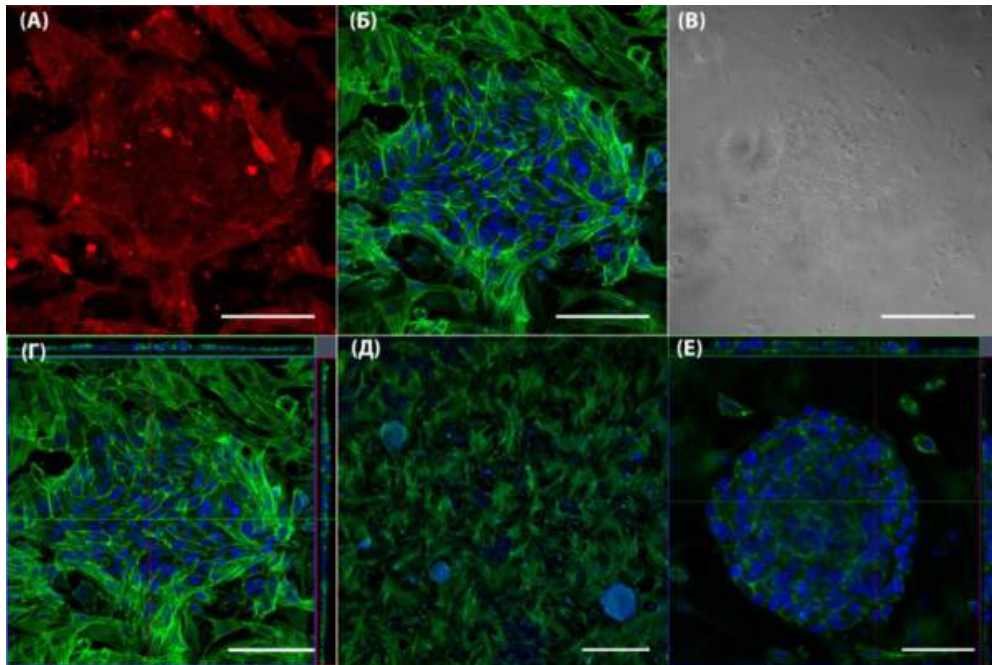


Рисунок 2.4 — 3D КЛСМ изображения кластеров из светочувствительных клеток, подсаженные на первичные культуры кардиомиоцитов. (А, Б, В, Г) Кластеры, подсаженные на субконфлюэнтные культуры неонатальных кардиомиоцитов. Красным обозначен  $\alpha$ -актинин, зелёным - F-актин, синим – ядра (DAPI). Шкалы масштаба 100 мкм. (Д) Кластеры, подсаженные на плотные культуры неонатальных кардиомиоцитов. Шкала 300 мкм. (Е) Трёхмерная реконструкция одного из кластеров. Видно прикрепление кластера к нижележащему монослою. Шкала масштаба 50 мкм.

Для оценки функционального объединения светочувствительных клеток и монослоя первичных кардиомиоцитов производилась стимуляция светом образцов с последующим оптическим картированием. На Рисунке 2.5 (а) показана

инициация и распространение в разные моменты времени волны возбуждения в культуре сердечной ткани, вызванной раздражением светом кластера клеток ChR2-НL1. За исключением способа стимуляции, скорость и форма фронта волны соответствуют стимуляции ткани током. На Рисунке 2.5 (б) показана пространственно-временная развёртка распространения волны возбуждения вдоль стрелки на панели (а). Белые вертикальные полосы соответствуют точечной засветке светочувствительного кластера излучением 470 нм. По этому изображению можно отметить инициацию волны возбуждения в нижней части образца после раздражения находящегося там кластера светом.

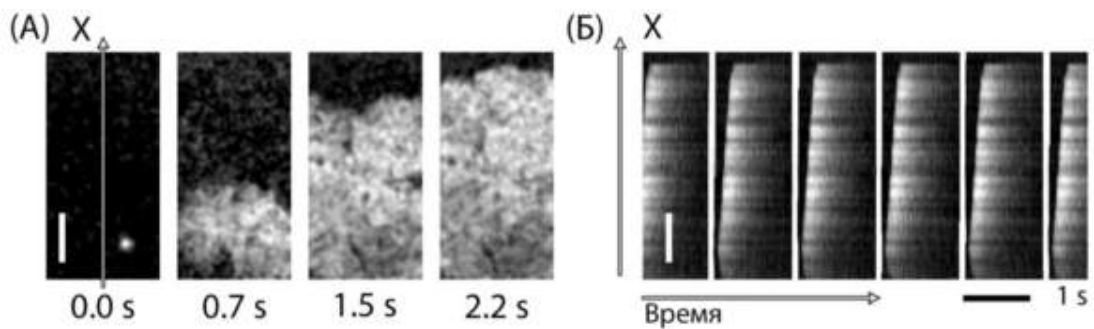


Рисунок 2.5 — Волны возбуждения на сердечной культуре, инициированные в ответ на стимуляцию кластера световыми импульсами. (А) Распространение волны возбуждения по культуре неонатальных кардиомиоцитов с подсаженным кластером ChR2-НL1 в разные промежутки времени. Шкала масштаба 3 мм; (Б) Пространственно - временная развёртка распространения волны вдоль оси, обозначенной “X” на рис. (А). Толстые вертикальные белые линии – световой импульс (10 мс). Показан ответ культуры на каждый световой стимул. Период стимуляции 1300 мс. Шкала масштаба 3 мм обозначена короткой белой вертикальной линией.

Для количественной оценки эффективности оптического возбуждения применялась одновременная засветка всего образца и точечная стимуляция излучением 470 нм через оптоволокно. По результатам экспериментов было выяснено, что отдельные светочувствительные клетки на культурах разной плотности вели себя схожим образом. При общей засветке образца с клетками ChR2-НL1, подсаженными на субконфлюэнтную культуру, ответ на раздражение наблюдался на 21 из 24 образцов. При засветке образца с клетками ChR2-НL1 на плотной культуре, ответ на раздражение наблюдался на 9 из 13 образцов (см. Рисунок 2.6а). При этом на монослое возникало 1 - 2 источника

волн возбуждения. При одновременной стимуляции светом суб- и конфлюэнтной культур с подсаженными кластерами ChR2-HL1 между ними проявились различия. Все образцы первого типа отвечали на засветку, при этом на них появлялось 5 - 9 источников волн возбуждения. В то время как только 6 из 9 образцов второго типа отвечали на оптическую стимуляцию, и на них появлялось 1 - 3 источника волн (см. Рисунок 2.6(а)). Пример волны возбуждения, инициированной на сердечной культуре светом, показан на Рисунке 2.5(а).

Критические (максимально усваиваемые) частоты стимуляции обнаруженных источников измерялись посредством их точечной засветки световыми импульсами длиной 50 мс. Они зависели от структуры субстрата и количества клеток ChR2-HL1. При точечной стимуляции отдельных светочувствительных клеток, подсаженных на суб- и конфлюэнтные образцы, медианные частоты стимуляции составляли 0.4 - 0.37 Гц соответственно (см. Рисунок 2.6(б)), что значительно ниже физиологически релевантных частот (1 Гц).

На субконфлюэнтных монослоях все внесённые кластеры реагировали на стимуляцию светом, но критические частоты такой стимуляции значительно варьировались в зависимости от конкретного кластера в пределах 0.4 - 2 Гц (см. Рисунок 2.6(б)). При точечной стимуляции плотных, конфлюэнтных культур, менее 10 % кластеров отвечали на засветку. Диапазон критических частот для них составлял 0.38 - 1.1 Гц, что показано на Рисунке 2.6(б). Таким образом, было обнаружено статистически значимое отличие между критическими частотами стимуляции светом кластеров, внесённых на менее субконфлюэнтные культуры, и остальными образцами.

В качестве контроля использовались монослои неонатальных кардиомиоцитов без светочувствительных клеток, которые стимулировались током посредством электрода. Их критические частоты находились в пределах 2.5 - 3.3 Гц. Низкие частоты стимуляции светом всей культуры объясняются низкими частотами стимуляции, воспринимаемыми клетками ChR2-HL1.

Для выяснения влияния блокаторов каналов на сердечные монослои с интегрированными светочувствительными клетками производилась их обработка лидокаином в концентрации 0.86 mM в течение 5 мин. При этом проявилось статистически значимое снижение количества возникающих источников возбуждения в ответ на одновременную засветку всего образца и снижение усваиваемых критических частот. А на многих образцах произошло полное ингибирование ответа на световое раздражение. В частности, при засветке образца

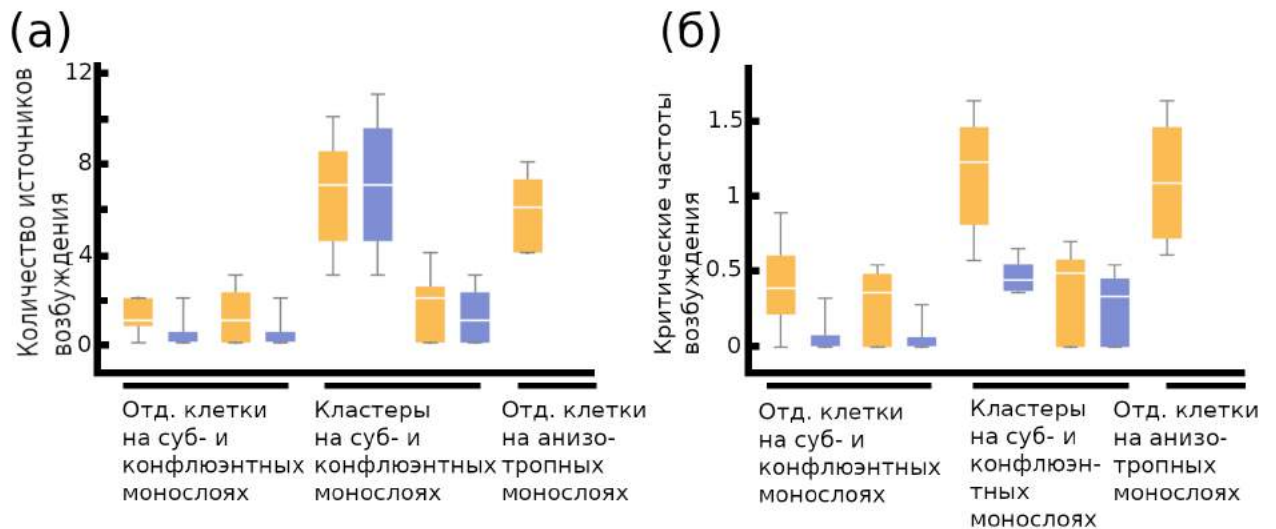


Рисунок 2.6 — Характеристики ответа на световой импульс отдельных светочувствительных ChR2-HL1 клеток и их кластеров, посаженных на суб- и конфлюэнтные монослои неонатальных крысиных кардиомиоцитов. Закрашенные прямоугольники показывают медиану, а также нижний и верхний квартили распределения в соответствующих выборках. Нижние и верхние «усы» показывают 5 и 95 процентиля. Оранжевые и фиолетовые солбцы показывают распределения до и после воздействия 0.86 мМ лидокаином. (А) Количество источников волн возбуждения, появляющихся на сердечных культурах в ответ на засветку образца сразу по всей площади. Наибольшее количество источников волн возбуждения наблюдалось для светочувствительных кластеров на субконфлюэнтных монослоях и для отдельных клеток на анизотропных культурах. (Б) Критические частоты, воспринимаемые сердечными монослоями из разных групп в ответ на точечный световой импульс. В этом случае кластеры HL1, посаженные на субконфлюэнтные 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 отдельными клетками ChR2-HL1, внесенными на субконфлюэнтную культуру, ответ на раздражение наблюдался только в 6 из 24 образцов. При общей засветке образца с клетками ChR2-HL1, внесенными на плотную культуру, ответ на раздражение наблюдался в 3 из 13 случаев (см. Рисунок 2.6).

При снижении возбудимости лидокаином (0,860 мМ, 5 мин) сердечной культуры с внесёнными светочувствительными кластерами полного подавления передачи возбуждения между группами светочувствительных клеток и культурой кардиомиоцитов не наблюдалось, однако происходило заметное падение критических частот стимуляции светом. На контрольных образцах при стимуляции электродом критические частоты находились в пределах  $0,9 \pm 0,2$  Гц. Квартили распределения критических частот оптической стимуляции субконфлюэнтных образцов с внесёнными светочувствительными кластерами через равнялись 0,4; 0,47; 0,53 Гц (см. Рисунок 2.6(б)). Квартили критических частот стимуляции светом плотных, конфлюэнтных образцов с подсаженными светочувствительными кластерами были заметно ниже и равнялись 0; 0,34; 0,46 Гц (см. Рисунок 2.6).

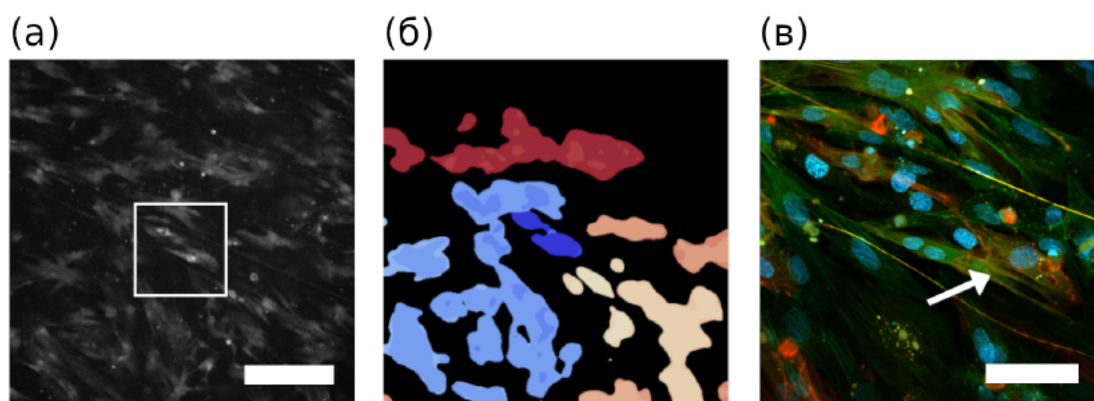


Рисунок 2.7 — Стимуляция светом анизотропной сердечной культуры с отдельными клетками ChR2-HL1 (а) - Флуоресценция  $\text{Ca}^{2+}$  - зависимого красителя fluo-4 во время картирования. Белым квадратом выделена область, показанная на КЛСМ снимке на панели (в). Шкала 200 мкм. (б) - Карта активации этого участка сердечной культуры. Темно-синим цветом показано место инициации волны возбуждения (в) - Иммуноцитохимический КЛСМ снимок области, где произошла инициация волны возбуждения в ответ на раздражение цветом. Стрелкой показана клетка HL1. Зелёный цвет - F-актин. Красный -  $\alpha$ -актинин и полимерные волокна. Синий - ядра. Шкала 50 мкм.

Отдельные светочувствительные клетки ChR2-HL1 так же вносились на ориентированные сердечные монослои. В такой конфигурации наблюдались статистически значимые отличия по сравнению с отдельными клетками на изотропных монослоях разных плотностей. В частности, были определены отличия в количестве источников возбуждения при одновременной засветке образца

и в критических частотах стимуляции между этими группами, что можно увидеть на Рисунке 2.6. На Рисунке 2.7 представлена стимуляция модели миокарда единственной светочувствительной клеткой. На панели (а) представлена максимальная флуоресценция  $\text{Ca}^{2+}$  - зависимого красителя fluo-4 во время картирования. На панели (б) показана карта активации этого участка культуры после точечной стимуляции его светом. Синим цветом показано место инициации возбуждения. На панели (в) показан участок, где было иницировано возбуждение, выделенный на панели (а) белым квадратом. Стрелкой обозначена клетка с морфологией HL1, иницировавшая возбуждение на этом участке. Она выровнена по направлению волокон и имеет контакт с соседними ориентированными кардиомиоцитами.

Для выяснения влияния взаимодействия возбудимых клеток с субстратом на формирование электрических контактов между ними был проведён следующий эксперимент (см. Рисунок 2.8(а)). Культура первичных кардиомиоцитов высаживалась только на половину покровного стекла, благодаря чему формировалась прямая граница монослоя, проходящая через центр образца. Спустя 48 ч его культивации, выполнялась посадка светочувствительных кластеров ChR2-HL1 и дополнительная культивация ещё в течение 24 часов. В результате часть кластеров попадала на заселённую часть образца и интегрировалась в монослой так же, как при их внесении на плотные изотропные монослои. Часть светочувствительных кластеров попадала на пустую часть стекла вдали от границы монослоя, значительно расплывалась и образовывала небольшие однородные участки культуры ChR2-HL1. А часть таких кластеров попадала на стекло рядом с границей монослоя сердечных кардиомиоцитов. Во время расплывания кластера по субстрату, происходила миграция клеток, в результате чего часть этих клеток приходила в соприкосновение с неонатальными кардиомиоцитами.

Засветка таких образцов сразу по всей площади показала, что 100 % источников стимуляции культуры в таких экспериментах ( $N = 5$ ) находились на границах монослоя. На Рисунке 2.8(б) показан один из образцов, наполовину заселённых клетками с подсаженными светочувствительными кластерами. На Рисунке 2.8в показана карта активации, полученная при одномоментной засветке всей площади образца. На этом образце возникло 6 источников волн возбуждения, все из которых находились на границе культуры. Эксперименты с точечной стимуляцией показали, что только 11 % обнаруженных источников



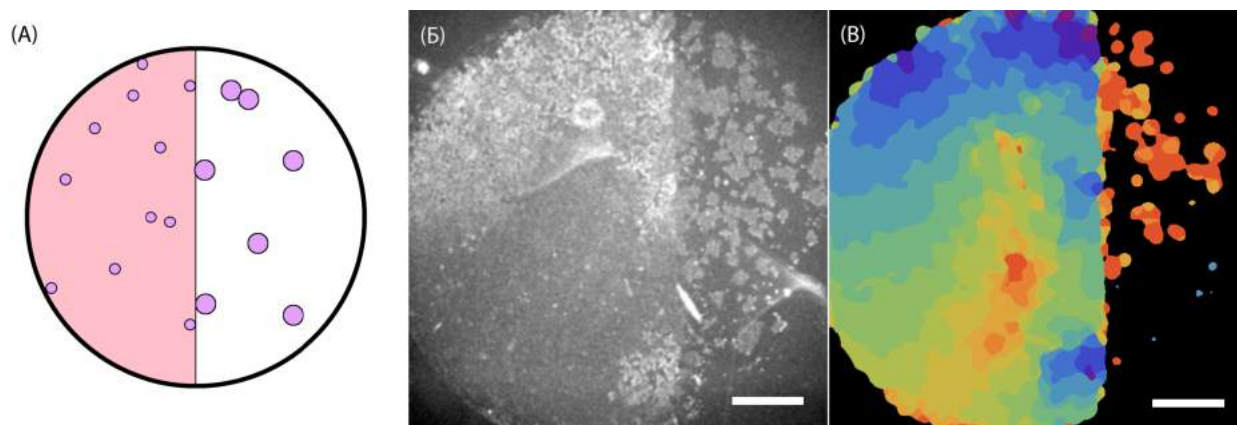


Рисунок 2.8 — Влияние взаимодействия с субстратом на возникновение электрической связи между кластерами светочувствительных клеток ChR2-HL1 и монослоем неонатальных крысиных кардиомиоцитов. (А) Схематичное изображение полужаселённой культуры. Розовым обозначена часть стекла, заселённая неонатальными первичными кардиомиоцитами. Белым – незаселённая. Маленькие фиолетовые кружки обозначают посаженные кластеры ChR2-HL1. Разный размер кружков обозначает разную степень их распластывания на заселённой и незаселённой частях образца. (Б) Один из кадров оптического картирования волн возбуждения с помощью  $\text{Ca}^{2+}$ -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.

оптической стимуляции приходились на внутреннюю часть культуры. 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-HL1 и культуры первичных кардиомиоцитов возникала преимущественно по краям монослоя, где кластеры имели возможность расти по подложке. Там, где кластеры попадали на монослой без доступа к субстрату, менее 10 % кластеров могли стимулировать всю сердечную культуру в ответ на раздражение светом. Таким образом удалось показать, что взаимодействие с субстратом способствует образованию электрической связи между клетками ChR2-HL1 и первичными кардиомиоцитами.

## Обсуждение результатов раздела

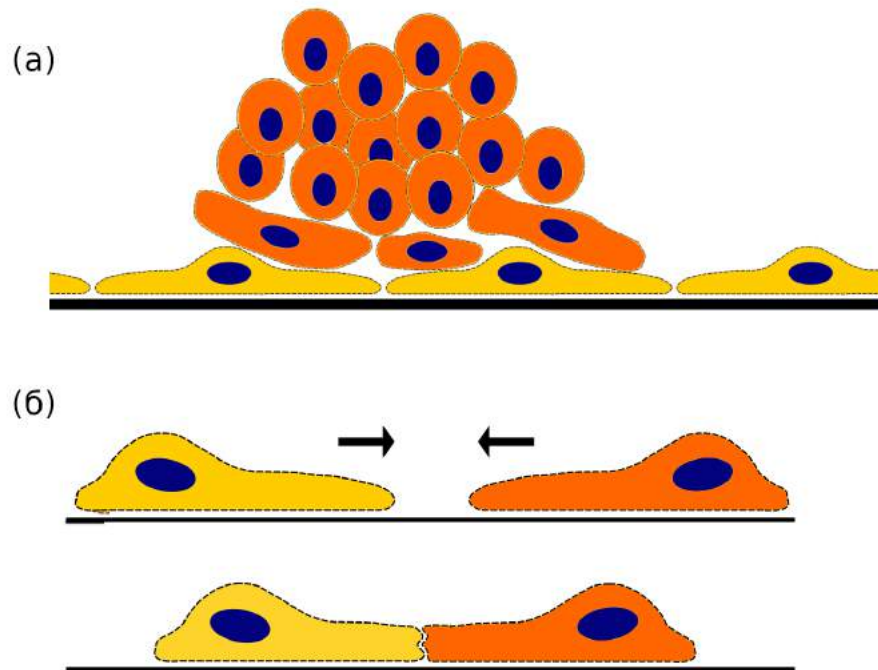


Рисунок 2.9 — Иллюстрация возможного механизма влияния совместного роста клеток на одном субстрате на эффективность образования электрической связи. (а) Схема взаимного расположения клеток подсаживаемого сфероида и культуры реципиента. Связь между этими типами клеток образуется за счёт действия силы тяжести. (б) Образование связи между клетками, мигрирующими во взаимном направлении по единому субстрату. Во время этого процесса в лидирующем крае клетки за счёт полимеризации актиновых филаментов образуется толкающая сила, которая может обеспечить давление в месте контакта, более чем на два порядка превышающее давление при взаимодействии под действием силы тяжести.

Приведённые в данном разделе эксперименты были проведены для определения оптимальных условий образования электрической связи при модельной имплантации светочувствительных клеток в сердечную ткань *in vitro*. Для этого отдельные светочувствительные клетки ChR2-HL1 и их кластеры вносились на монослой неонатальных сердечных кардиомиоцитов с разной структурой, в зависимости от которой электрическая связь образовывалась с разной вероятностью. По их результатам оказалось, что наилучшее образование электрической связи наблюдалось при внесении отдельных светочувствительных клеток ChR2-HL1 на анизотропные сердечные культуры и внесении кластеров светочувствительных клеток на монослой с низкой степенью конфлюэнтности и полужаселённые монослой. Напротив, при внесении отдельных светочувствительных клеток на изотропные монослой и кластеров таких клеток на плотные,

конфлюэнтные монослои электрическая связь образовывалась с низкой вероятностью. Общей особенностью случаев с большей эффективностью образования электрической связи является совместный направленный рост подсаживаемых клеток и культуры реципиента на одном субстрате.

На основании этих данных можно предположить механизм формирования электрической связи между подсаживаемыми клетками ChR2-HL1 и неонатальными крысиными кардиомиоцитами. Схематично он изображён на Рисунке 2.9. При распластывании светочувствительного кластера по подложке происходит миграция его клеток по направлению из центра кластера. У мигрирующих клеток происходит полимеризация актина на плюс-концах разветвляющихся филаментов по направлению движения, что генерирует толкающую силу и приводит к выпячиванию цитоплазматической мембраны. При встрече мигрирующей и статичной клетки в месте контакта происходит усиленное давление плазмолемм клеток друг на друга, что приводит к образованию плотного контакта. При посадке кластера светочувствительных клеток на конфлюэнтный монослой «сверху», сближение кластера и культуры-реципиента происходит под действием силы тяжести.

Можно оценить порядок сил, действующих при сближении клеток под действием силы тяжести и при их миграции по субстрату на встречу друг другу. На типичную клетку HL1 объёмом  $2000 \text{ мкм}^3$  будет действовать сила тяжести порядка 20 пН. При действии такой силы на площадь  $200 \text{ мкм}^2$  возникает давление 0,1 Па. При миграции клетки HL1 на её лидирующем крае происходит полимеризация актина, генерирующего толкающую силу, приложенную к плазмолемме. В соответствии с [165] сила возникающая в этом процессе составляет сотен пН на мкм. Если принять её за 100 пН/мкм, и толщину клетки в месте контакта за 2 мкм, то давление цитоплазматических мембран клеток друг на друга в месте контакта будет около 50 Па, что минимум на два порядка больше, чем в случае их взаимодействия под действием силы тяжести. То есть взаимодействие клеток, опосредованное контактом с субстратом приводит к формированию более плотных контактов. Это важно в связи с тем, что близкое расположение мембран нужно для образования целевых контактов между ними [166]. К тому же, электрическое возбуждение может переходить с клетки на клетку в местах тесного контакта их мембран напрямую [167].

Таким образом, были получены свидетельства о том, что эффективность образования электрической связи между имплантируемыми клетками

и клетками ткани реципиента повышается при их прикреплении к подложке. Полученные данные нужно принимать во внимание при разработке методик, основанных на имплантации возбудимых клеток в миокард. Например, при инъекции кардиомиоцитов в область миокарда, поражённую инфарктом, или при создании так называемого биологического пейсмекера.

## **2.2 Микроносители для отдельных клеток в виде фрагментов нановолокон**

Клинические применения подходов тканевой инженерии миокарда предполагают имплантацию кардиомиоцитов разных типов (проводящих, сократительных, секреторных) в нуждающийся в регенерации участок сердечной ткани. При такой имплантации важны выживаемость клеток, их функциональная интеграция с окружающей сердечной тканью, формирование зрелого фенотипа клеток, отсутствие иммунных реакций [41]. Решение этих проблем может позволить использовать методы тканевой инженерии сердца в клинической практике.

В этом разделе описана разработка нового вида полимерных дискретных подложек, представляющих из себя фрагменты волокон длиной десятки или сотни микрометров. Такие подложки являются, по сути, наноносителями и нужны для повышения выживаемости опорно-зависимых клеток и их приживаемости при трансплантации в орган-мишень посредством инъекций. Наноподложки могут быть получены нарезкой волокон, приготовленных с помощью электроспиннинга или имеющих природный источник, такой как кокон тутового шелкопряда *Bombyx mori*. В зависимости от размера микро- и наноподложки могут нести от одной до тысяч клеток.

Материалами для их производства могут использоваться биосовместимые полимеры, имеющие подходящие механические свойства и пригодные для получения нановолокон. В данной главе наноподложки были получены из полилактида с добавлением желатина в соотношении полимеров 10:1. Такие материалы были выбраны ввиду того, что оба этих полимера являются биоразлагаемыми и биосовместимыми, полилактид придаёт волокнам прочность, а коллаген делает волокна адгезивными для клеток.

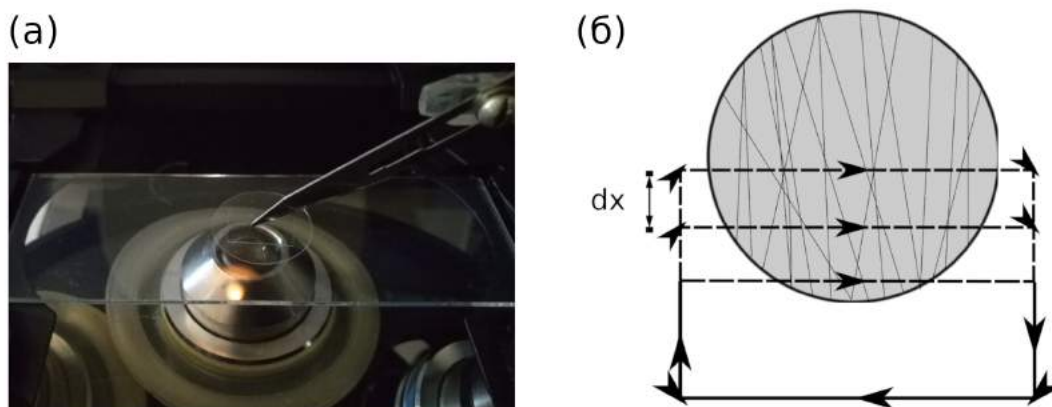


Рисунок 2.10 — Схема приготовления наноподложек нарезанием ориентированных полимерных нановолокон, полученных с помощью электроспиннинга. (а) - Нарезка ориентированных полимерных нановолокон на покровном стекле, прикреплённом к ХУ столику моторизованного микроскопа Carl Zeiss Axio Observer. (б) - Схема резки полимерных нановолокон. Стрелками показано направления движения ножа. Шаг резки  $dx$  задаётся в управляющей программе.

Для получения фрагментов нановолокон была разработана специальная методика. Первый этап предполагал нанесение на покровное стекло слоя агарозного геля для предотвращения адгезии клеток и сахарозы, играющей роль водорастворимого жертвенного слоя. После этого поверх слоя агарозы наносились выровненные полимерные нановолокна, полученные электроспиннингом с катодом в виде параллельных электродов [36; 89; 168].

Второй этап предполагал нарезку волокон на фрагменты требуемой длины (см. Рисунок 2.10). Для этого стекла с полимерными волокнами закреплялись на программируемом моторизованном ХУ столике. После этого на манипуляторе устанавливалось лезвие на минимальную высоту, достаточную для резки волокон. Управление ХУ столиком производилось с помощью собственноручно написанного плагина на языке Java для программного комплекса  $\mu$ Manager [127], предназначенного для управления моторизованными микроскопами и являющегося расширением программы для обработки изображений ImageJ. Исходный код приведён в приложениях А.4 и А.5. Входящими данными для алгоритма являются шаг резки, диаметр стекла и координаты центра образца. Перемещения ножа относительно образца, обеспечиваемые написанным плагином, показаны на Рисунке 2.10 (б). Благодаря возможности программно задавать шаг резки, такой подход позволяет получать микроподложки в

достаточно узком диапазоне длин. После нарезки образцы стерилизовались ультрафиолетом и были готовы для использования.

При посадке клеток на подложки, приготовленные по вышеописанному протоколу, под действием водной фазы слой из сахарозы растворялся, открепляя тем самым фрагменты нановолокон от субстрата. В результате этого искомые адгезивные наноподложки оказывались достаточно равномерно распределёнными по неадгезивному субстрату, покрытому слоем агарозы. После этого в течение нескольких десятков минут происходила седиментация высаживаемых клеток. Ввиду того, что фрагменты нановолокон содержали коллаген и лежали на неадгезивном субстрате, происходило преимущественное прикрепление кардиомиоцитов к наноподложкам, что показано на Рисунке 2.11 (а). После культивации в течение 12 часов возможно было снимать клетки аккуратным ресуспензированием и переносить их на другие образцы.

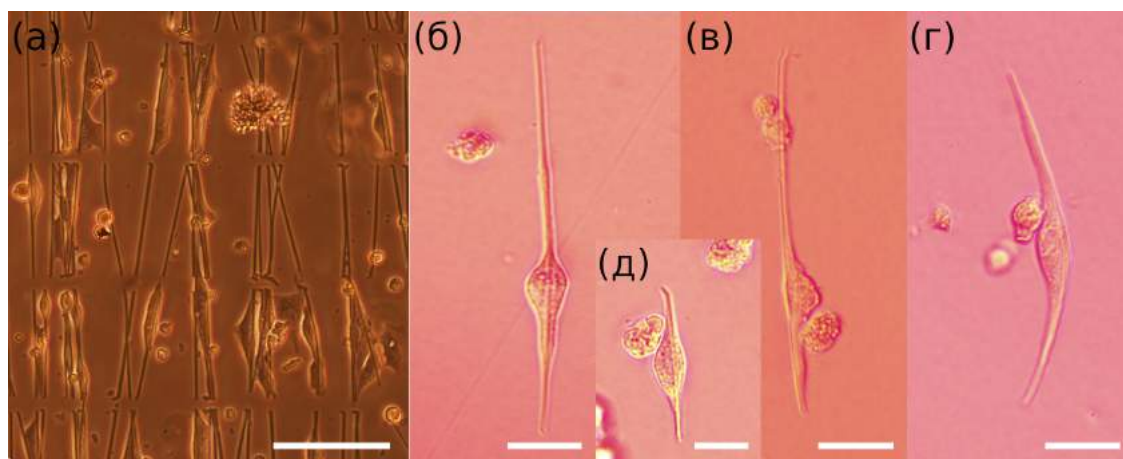


Рисунок 2.11 — Прикрепление кардиомиоцитов к наноподложкам. (а) Клетки, во время подсадки на образцы с наноподложками. Шкала 100 мкм. (б, в, г, д) Отдельные кардиомиоциты на наноподложках после открепления от покровного стекла. (б, в, г) Шкала 20 мкм. (д) Шкала 10 мкм. (е, ж)

В данной работе проводилось пилотное исследование взаимодействия клеток с наноподложками, заключающееся в оценке поведения, выживаемости неонатальных сердечных кардиомиоцитов и возможности манипуляции с клетками на таких субстратах. Для этого, сердечные клетки высаживались на образцы с нарезанными адгезивными волокнами из полилактида с коллагеном и культивировались в течение 12 часов. Толщина волокон составляла  $720 \pm 110$  нм. Длина в 100 мкм задавалась программно.

На Рисунках 2.11 (б, в, г, д) представлены микрофотографии типичных кардиомиоцитов на фрагментах волокон. При взаимодействии с наноподлож-

ками происходит вытягивание сердечных клеток по волокнам и приобретение клетками веретенообразной морфологии. Панель (д) демонстрирует, что неонатальный крысиный кардиомиоцит может развиваться и на коротком волокне, длиной 32 мкм, которая сравнима с толщиной клетки в свободном состоянии.

Использование наноподложек позволило преодолеть короткое время жизни кардиомиоцитов в свободном состоянии [169], что является одним из основных ограничивающих факторов при инъекции клеток в миокард. В проведённых экспериментах кардиомиоциты, растущие на наноподложках, поддерживали жизнедеятельность более трёх суток.

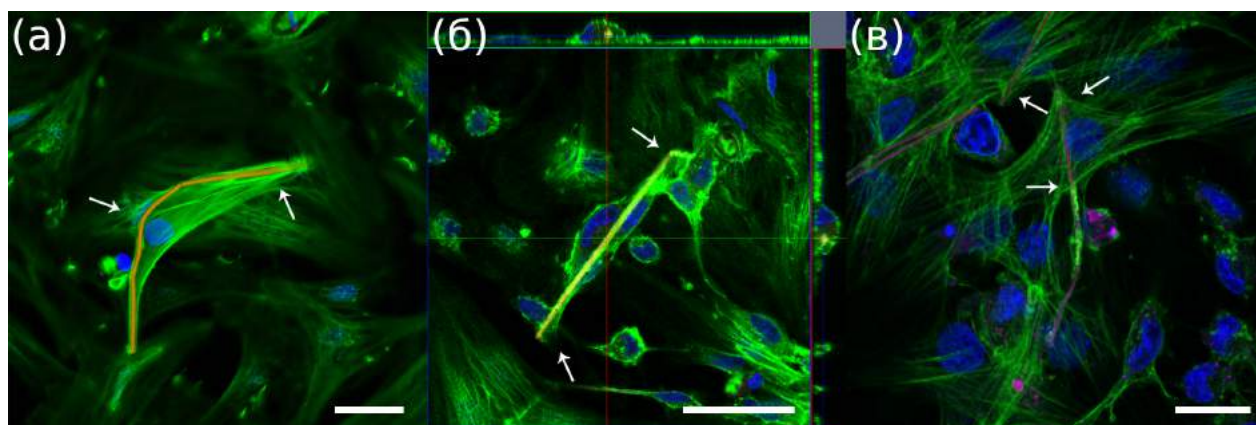


Рисунок 2.12 — Кардиомиоциты на наноподложках, подсаженные на монослой неонатальных крысиных кардиомиоцитов. Стрелками показаны места образования связей с монослоями. Иммуноцитохимическое окрашивание. Зелёное – F-актин. Синее – ядра. Красное – наноподложки. (а) Шкала 20 мкм. (б) Шкала 50 мкм. (в) Взаимодействие культуры кардиомиоцитов с адгезивными волокнами без клеток. Стрелками показаны изменения в строении цитоскелета, вызванные присутствием наноподложек. Шкала 20 мкм.

Была показана возможность манипуляции кардиомиоцитами на наноподложках. Медленное пипетирование не являлось серьёзным повреждающим фактором для клеток в таком состоянии, что давало возможность переносить их на другие сердечные культуры. На Рисунках 2.12(а, б) показана интеграция кардиомиоцитов на наноподложках в монослой крысиных первичных сердечных культур. На Рисунке 2.12 (а) показан кардиомиоцит, культивированный на фрагменте волокна в течение 36 часов, после чего подсаженный на монослой неонатальных кардиомиоцитов. На изображении обозначены области, где посаженный кардиомиоцит образовал связи с нижележащими клетками. На Рисунке 2.12 (б) показана трёхмерная реконструкция другой клетки, культивированной

в течение 60 часов на наноподложке и внесённой на монослой кардиомиоцитов. Она так же образовала структурные связи с клетками культуры-реципиента, что на изображении обозначено белыми стрелками.

Другой интересной особенностью использования наноподложек для суспензионной культивации клеток является взаимодействие и прикрепление фрагментов волокон к клеткам культуры-реципиента. На Рисунке 2.12в показано взаимодействие монослоя неонатальных кардиомиоцитов и наноподложек. В присутствии адгезивных волокон изменяется форма сердечных клеток, которые образуют дополнительные выросты для прикрепления, показанные на панели (в) белыми стрелками.

### Обсуждение результатов раздела

Технология культивации клеток на наноподложках может быть полезна при инъекционной доставке опорно-зависимых клеток в ткань какого-либо органа, например в миокард. Наиболее явным преимуществом этого метода является увеличение времени культивации клеток в суспензии, что расширяет временное окно, в течение которого имплантированные клетки могут взаимодействовать с окружающей тканью и интегрироваться. Использование именно фрагментов волокон в качестве носителей может повышать адгезию клеток к ним по механизму, описанному в Разделе 1.1.1. Высокая плотность покрытия фрагментов волокон адгезионными молекулами может ускорять взаимодействие подсаженных клеток и таргетной культуры путём её более быстрого взаимодействия с полимерными наноподложками. Такие субстраты могут решить проблему вымывания инъектированных клеток с кровотоком, ввиду невозможности прохождения клеток на волокнах по окружающим место инъекции сосудам.

Потенциально, использование нановолокон может приводить к улучшенной электрической интеграции кардиомиоцитов в миокард 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 соприкоснуться, в результате чего будет образовываться плотный контакт их мембран, стимулирующий образование электрической связи между ними. Другим преимуществом таких наноносителей в виде фрагментов волокон является возможность дополнительной их функционализации для выделения биологически активных



веществ, которые могут снижать воспаление и стимулировать ангиогенез в месте инъекции [170].

Но для успешного применения этой технологии необходимо дополнительное исследование и оптимизация ряда параметров этого процесса. Нужно оптимизировать концентрации наноподложек и культивируемых клеток для достижения максимальной доли занятых наноподложек и севших на субстрат клеток. Так же встаёт вопрос оптимальной длины нановолокна для эффективной электромеханической интеграции. Короткие волокна обеспечивают наилучшее отношение объёма клеток к объёму всей инъектируемой массы, в то время как длинные волокна могут ускорить взаимодействие с целевой культурой и служить якорем для клеток в месте инъекции. Другим не раскрытым вопросом является влияние степени развитости цитоскелета на интеграцию кардиомиоцитов при имплантации в миокард. По сравнению с подвешенными волокнами, у фрагментов волокон отсутствует натяжение, что может влиять на фенотип растущих на них клеток. Этот вопрос так же нужно дополнительно исследовать. Но наиболее информативным будет эксперимент с оценкой эффективности имплантации клеток на наноносителях *in vivo*.

### Глава 3. Разработка метода картирования сердечных монослоёв без красителя на основе эластичных мембран

Волны возбуждения в сердце человека координируют синхронные сокращения его отделов и их различных областей, необходимые для нормальной физиологической перекачки крови [171]. Нарушения распространения волн возбуждения могут вызывать нарушения ритма сердца, фибрилляцию и внезапную сердечную смерть [12; 13]. В частности, было показано, что развитие так называемых спиральных волн объясняет возникновение наиболее опасных желудочковых аритмий сердца [172; 173]. Именно поэтому изучение особенностей распространения волн возбуждения в сердечной ткани имеет большое значение [174].

В настоящее время для визуализации распространения возбуждения в сердечной ткани наиболее часто используются два типа методов: многоэлектродные матрицы (МЭА) [14; 175] и флуоресцентное оптическое картирование [15; 16]. 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 недостатком флуоресцентных красителей является токсичность для тканей [18; 19]. В этой главе впервые исследован новый метод, который позволяет контролировать распространение возбуждения в клеточных культурах без использования красителей. Метод основан на оптической регистрации 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.

#### 3.0.1 Схема приготовления образцов

Подложка для роста клеток, необходимая 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 диаметром 10 или 13 мм, в результате чего получалась конструкция в виде барабана (см. Рисунок 3.1). Для повышения адгезии кардиомиоцитов, сторона эластичной плёнки, к которой не было приклеено кольцо, покрывалась белком внеклеточного матрикса - фибронектином. После чего на подготовленную поверхность образца 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).

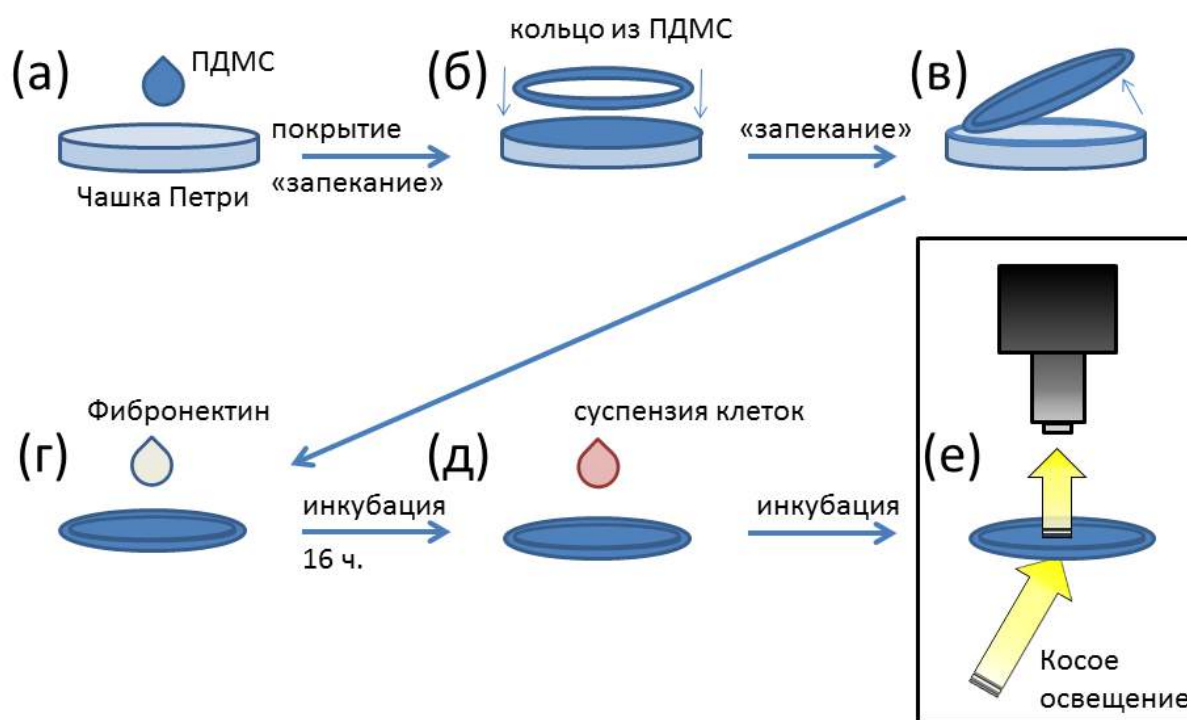


Рисунок 3.1 — Изготовление МТП для мониторинга волн возбуждения по методу на основе эластичных мембран без использования красителей. (а) - Полимер ПДМС наносился на крышку чашки Петри и центрифугировался до образования тонкой плёнки, после чего запекался; (б) - кольцо из ПДМС приклеивалось к поверхности плёнки для обеспечения её механической стабильности; (в) - кольцо с плёнкой отсоединялось от крышки чашки Петри; (г) - конструкция в виде «барабана» покрывалась фибронектином для улучшения адгезии клеток; (д) - на подготовленную поверхность «барабана» высаживалась суспензия клеток; (е) - сокращения кардиомиоцитов и последующие изгибы поверхности МТП детектировались камерой с ПЗС матрицей в косом освещении.

### 3.0.2 Детектирование распространения возбуждения в МТП без использования красителей

При косом освещении изгибы ПДМС мембраны вызывают отклонение проходящего света в соответствии с законом Снелла. На Рисунке 3.2а показан расчёт прохождения лучей через тонкую изогнутую мембрану, лежащую на границе раздела фаз вода/воздух. Расчёт был выполнен в программном комплексе Wolfram Mathematica. Исходный код приведён в приложении А.3.

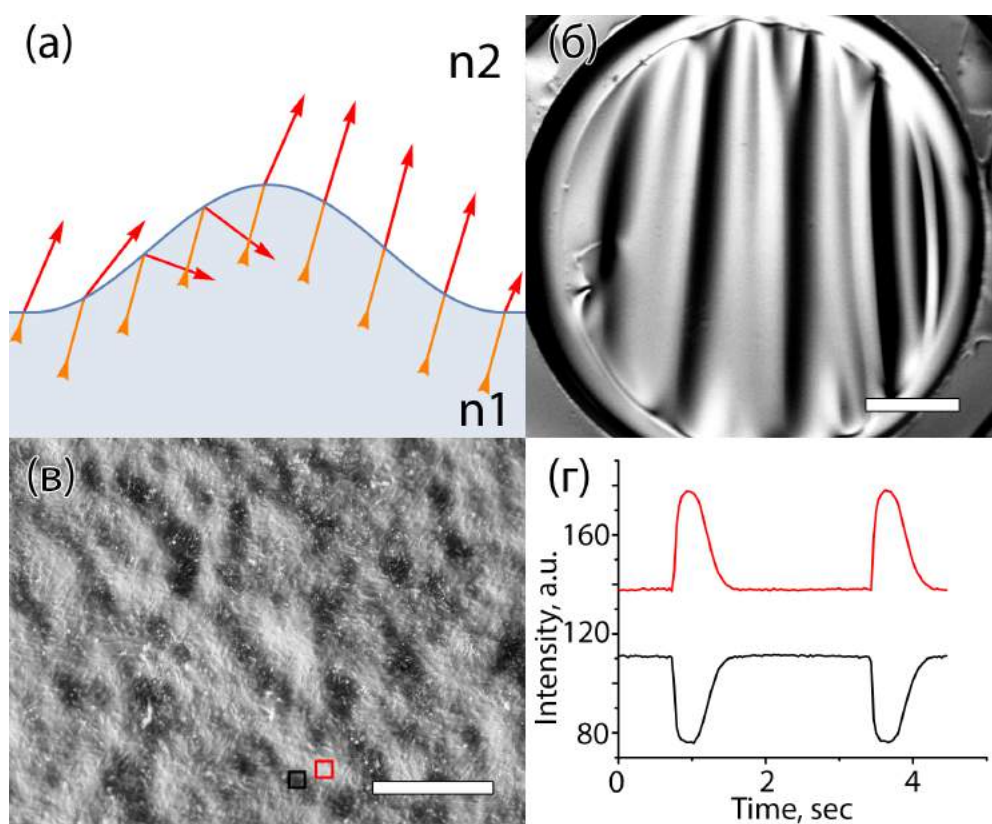


Рисунок 3.2 — Визуализация изгибов Мышечной Тонкой Плёнки (МТП) при косом освещении. (а) - расчёт отклонения света при его переходе через изгиб мембраны ПДМС, лежащей на границе раздела вода/воздух. (б) - деформированная мембрана слегка сжатого ПДМС барабана, визуализированная в косом освещении. Шкала масштаба - 2 мм. (в) - участок ПДМС мембраны, деформированной сократившимися кардиомиоцитами, в косом освещении. Шкала масштаба - 200 мкм. (г) - Временная зависимость средней яркости двух квадратных областей от времени, указанных в (в).

Лучи двигались из более оптически плотной в менее оптически плотную среду. Показатели преломления сред  $n_1$  и  $n_2$  приравнивались к 1 и 1.4 соответственно. Изначальный угол наклона лучей к вертикали составлял  $15^\circ$ . Но после отклонения лучей на изгибе мембраны, углы их наклона сильно изменились. В то время как углы преломления лучей с одной стороны мембраны уменьшились, углы преломления лучей с другой стороны мембраны увеличились. А для некоторых комбинаций угла падения луча и угла касательной к поверхности мембраны наблюдалось полное внутреннее отражение.

Этот эффект можно ярко проиллюстрировать, сжав кольцо с мембраной из ПДМС в косом освещении (см. Рисунок 3.2b). Видно, что каждый «горб» мембраны состоит из тёмной и светлой областей. Таким же образом сокращение кардиомиоцитов приводит к изгибам тонкой, эластичной ПДМС мембраны, что может быть обнаружено с помощью описываемой здесь техники. Это принцип позволяет обнаруживать волны возбуждения в МТП без использования флуоресцентных красителей. Снимок поверхности МТП с сокращёнными кардиомиоцитами, визуализированной при косом освещении, представлен на Рисунке 3.2c. При этом на Рисунке 3.2d показаны графики временной зависимости яркости проходящего через участки мембраны света. Красным цветом показано изменение яркости в красном квадрате на Рисунке 3.2c. Чёрным цветом показано изменение яркости в чёрном квадрате на Рисунке 3.2c. Как можно заметить, на одной стороне изгиба мембраны во время сокращения яркость проходящего света увеличивается, а на другой - уменьшается.

Раскадровка видеозаписи распространения возбуждения, визуализированной методом без красителя, представлена на Рисунке 3.3 (а). На этой панели показаны три изображения распространения волны по образцу, снятые в последовательные моменты времени с интервалом 0,22 с. Визуальное представление скорости волн возбуждения можно получить с помощью методики так называемых пространственно-временных развёрток, широко используемых для анализа распространения возбуждения в сердечной ткани [36; 88]. На таких графиках представляется зависимость яркости от пространственной координаты и времени вдоль выбранной прямой. Таким образом по оси абсцисс откладывается время, а по оси ординат откладывается пространственная координата. Пространственно-временная развёртка для видео из панели (а) представлена на Рисунке 3.3 (б). По ней может быть определена скорость распространения воз-

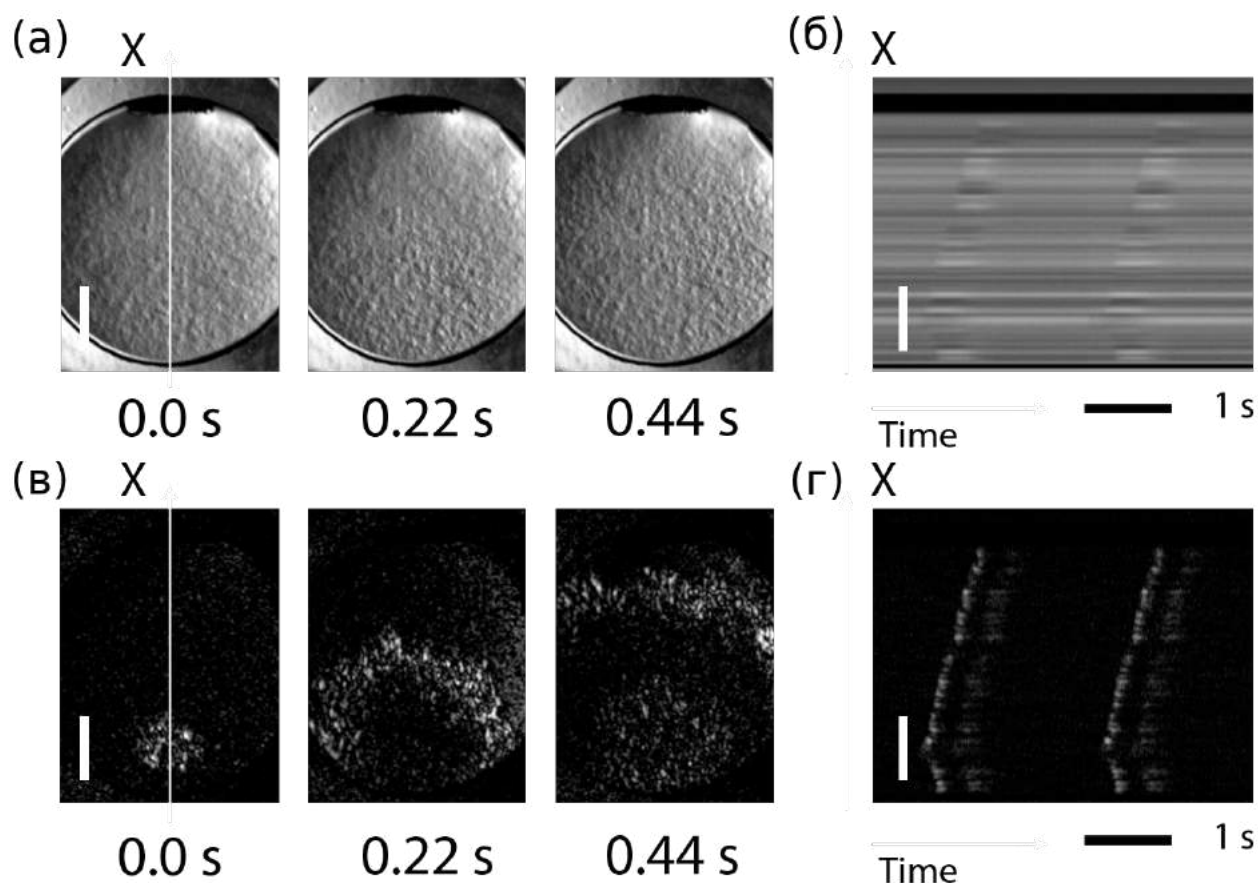


Рисунок 3.3 — Визуализация распространения волны возбуждения на мышечной тонкой плёнке (МТП) с помощью метода без красителя. (а) - последовательность кадров, показывающая распространение волны возбуждения, записанной методом без красителя; (б) - пространственно-временная развёртка, построенная вдоль линии, показанной на панели (а) стрелкой; (в) и (г) - те же изображения после обработки для повышения контрастности. Шкала масштаба - 3 мм. Шкала времени - 1 с.

буждения как наклон периодических ярких полос. Например, в этом видео скорость равна  $16 \pm 1$  мм / с.

Распространение волны возбуждения можно сделать более отчетливым после обработки для повышения контраста (см. Рисунок 3.3 (в) и 3.3 (г)). В данном случае это достигалось с помощью вычисления разницы между двумя соседними кадрами со смещением в 60 мс.

Следует отметить, что в видеозаписях, улучшенных последовательным вычитанием кадров для каждой волны возбуждения, можно наблюдать два её фронта: первый соответствует сокращению сердечных клеток, а второй - их расслаблению (см. Рисунок 3.3 (в, г)). Это позволяет нам оценить продол-

жительность сокращения клеток в приблизительно 400 мс для эксперимента, представленного на Рисунке 3.3.

Метод оптического картирования возбуждения без использования красителей позволяет визуализировать не только простые волны с круглой формой фронта. На Рисунке 3.11 (а) показана карта активации спиральной волны в изотропной культуре кардиомиоцитов, визуализированная методом без химических меток. На этом рисунке видно взаимодействие двух спиральных волн, изучение которых, в том числе и *in vitro*, важно для изучения аритмий.

### 3.0.3 Сравнение метода картирования без красителя с $Ca^{2+}$ - зависимым оптическим картированием

Для сравнения предложенного метода без красителей с обычным оптическим флуоресцентным картированием волны возбуждения детектировали в нескольких экспериментах обоими методами сначала последовательно, потом одновременно. Все данные флуоресцентного картирования и картирования без красителей, представленные в этом разделе, улучшались с помощью размытия по Гауссу (с радиусом 0,6 пикселя) и вычитания фона.

В первой серии экспериментов сердечные культуры, выращенные на барабанах из ПДМС, окрашивали  $Ca^{2+}$  - чувствительным красителем Fluo-4 и последовательно изучали с помощью обычного флуоресцентного картирования и метода без химических меток. Пример визуализации волн возбуждения, полученной двумя разными методами детектирования для одного и того же образца, представлен на Рисунке 3.4 (а, б). Несмотря на сложный паттерн распространения возбуждения на представленном образце, сравнение формы фронтов волн показало их качественное сходство. Стоит отметить, что в этом эксперименте только одна половина плёнки была засеяна клетками, а другая половина была оставлена пустой в качестве контроля. Распространение волны возбуждения через клеточную область барабана не вызвало никаких артефактов в области без клеток во время детектирования волн методом без красителей. Это наблюдение показывает, что при сокращении клеток изгиб ПДМС мембраны происходит ло-

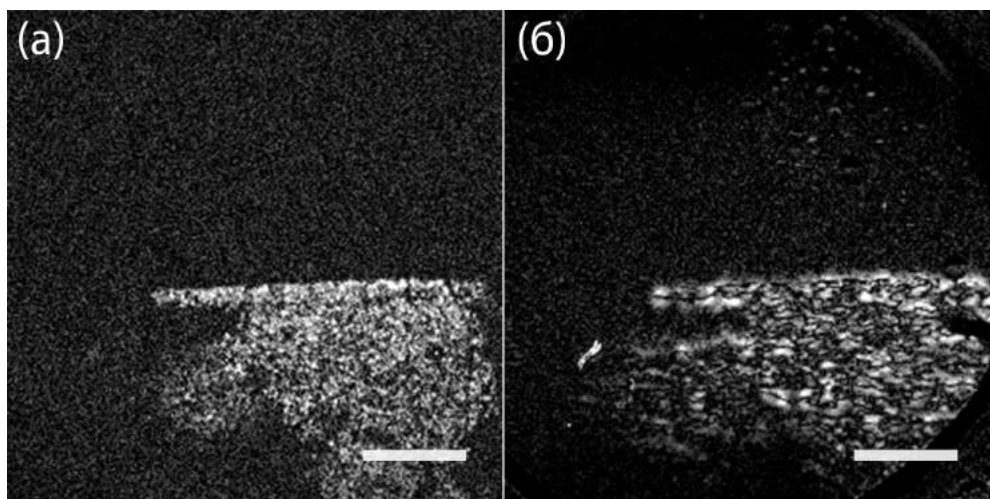


Рисунок 3.4 — Сравнение двух методов картирования возбуждения: оптическое картирование с использованием  $Ca^{2+}$  - чувствительного красителя Fluo-4 и оптическое картирование без красителей на основе МТП. (а) - видеокادر из записи флуоресцентного оптического картирования  $Ca^{2+}$  полужаселённой культурой кардиомиоцитов ПДМС мембраны. (б) - видеокادر из записи оптического картирования без химических меток того же образца. Шкалы масштаба - 3 мм.

кально, что позволяет использовать предложенный метод без химических меток для картирования возбуждения.

Во второй серии экспериментов возбуждение детектировалось параллельно флуоресцентным методом и методом без красителей в разных частях одного и того же образца МТП. В этих экспериментах половина образца, окрашенного Fluo-4, была прикрыта непрозрачным фильтром от проходящего света для регистрации флуоресцентного сигнала, в то время как другая половина образца наблюдалась в косом освещении. Стимулирующий электрод был помещён на границу между этими двумя половинами образца. Таким образом инициировались волны, распространяющиеся в направлении, совпадающем с этой границей. В результате стало возможным одновременно записывать сигналы, полученные обоими методами картирования с одного и того же волнового фронта, распространяющегося вдоль образца. Кадр из видеозаписи этого эксперимента представлен на Рисунке 3.5 (б). Правая часть изображения соответствует области, детектируемой методом без красителей; левая часть соответствует области, прикрытой непрозрачным фильтром, где было выполнено  $Ca^{2+}$  - чувствительное оптическое картирование. В этом эксперименте волна распространяется вдоль границы между областями, что соответствует направлению снизу вверх на приведённом изображении.



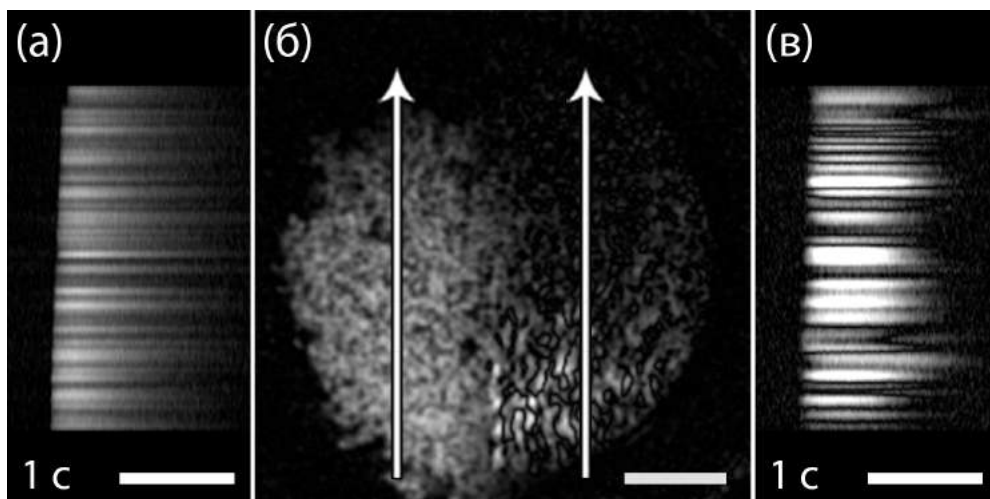


Рисунок 3.5 — Сравнение двух методов картирования возбуждения: оптическое картирование с использованием  $Ca^{2+}$  - чувствительного красителя Fluo-4 и оптическое картирование без красителей на основе МТП. (б) - кадр из видеозаписи эксперимента с параллельным картированием (подробности см. в тексте). Левая часть изображения представляет визуализацию флуоресцентного сигнала от части образца, закрытой от проходящего света непрозрачным фильтром. Правая часть изображения представляет визуализацию деформаций мембраны, детектированных в косом освещении. Волны возбуждения распространяются по образцу снизу вверх. (а, в) - пространственно-временные развёртки, построенные вдоль белых стрелок на изображении (б). Шкалы масштаба - 3 мм.

Оба метода позволяют обнаруживать волны возбуждения и измерять их скорость. На Рисунке 3.5 (а, в) представлены пространственно - временные графики, построенные вдоль стрелок, указанных на Рисунке 3.5 (б). Скорость проведения возбуждения, измеренная флуоресцентным методом, была равна  $86 \pm 5$  мм/с. Скорость проведения возбуждения, измеренная методом без химических меток, составила  $87 \pm 7$  мм/с. Нормализованные сигналы, детектированные двумя разными способами из двух одновременно возбуждённых областей образца, представлены на Рисунке 3.6. Можно заметить, что сокращение, обнаруженное методом без меток, следует за высвобождением  $Ca^{2+}$ , обнаруженным флуоресцентным методом, с некоторой задержкой. Задержку между электрическим возбуждением клетки и её механическим сокращением можно определить как задержку между достижением половины максимума соответствующими сигналами. В этом случае её можно оценить как  $75 \pm 15$  мс.

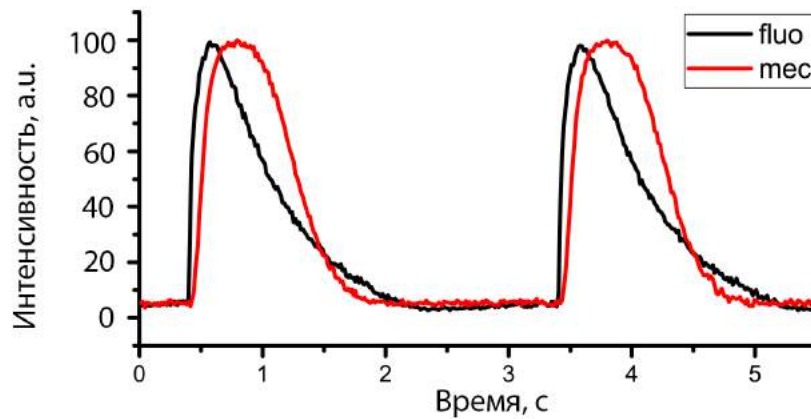


Рисунок 3.6 — Нормализованные сигналы, записанные флуоресцентным картированием и картированием без красителя из одновременно возбуждённых областей образца.

### 3.0.4 Зависимость контрастности метода без красителей от жёсткости субстрата

Одним из важнейших параметров, влияющих на контрастность волн возбуждения, является способность кардиомиоцитов деформировать ПДМС мембрану. Эта способность напрямую зависит от жесткости плёнки, определяющейся её толщиной и составом. Для изучения влияния этих параметров на видимость волн сокращения, картированных методом без химических меток, культуры кардиомиоцитов новорожденных крыс выращивали на мембранах различной толщины и состава. В этой серии экспериментов использовали пять групп различных мембран: 4 группы были изготовлены из стандартного полимера ПДМС (Sylgard 184) и имели толщину  $213 \pm 15$  мкм,  $114 \pm 2$  мкм,  $40 \pm 2$  мкм и  $14 \pm 1$  мкм; одна группа мембран состояла из более мягкого ПДМС (смесь Sylgard 527 и Sylgard 184 в соотношении 2: 1) и имела толщину  $21 \pm 2$  мкм. В качестве контроля использовались культуры ткани, выращенные на твердых стеклянных подложках. Поперечные сечения мембран показаны на Рисунке 3.7 (а).

Для всех образцов рассчитывали контрастность изображений, обнаруженных методом без меток. Подробнее про контрастность из материалов и методов

Зависимость контраста волн сокращения после обработки от толщины мембраны показана на Рисунке 3.7 (б). Как и ожидалось, контраст оказал-

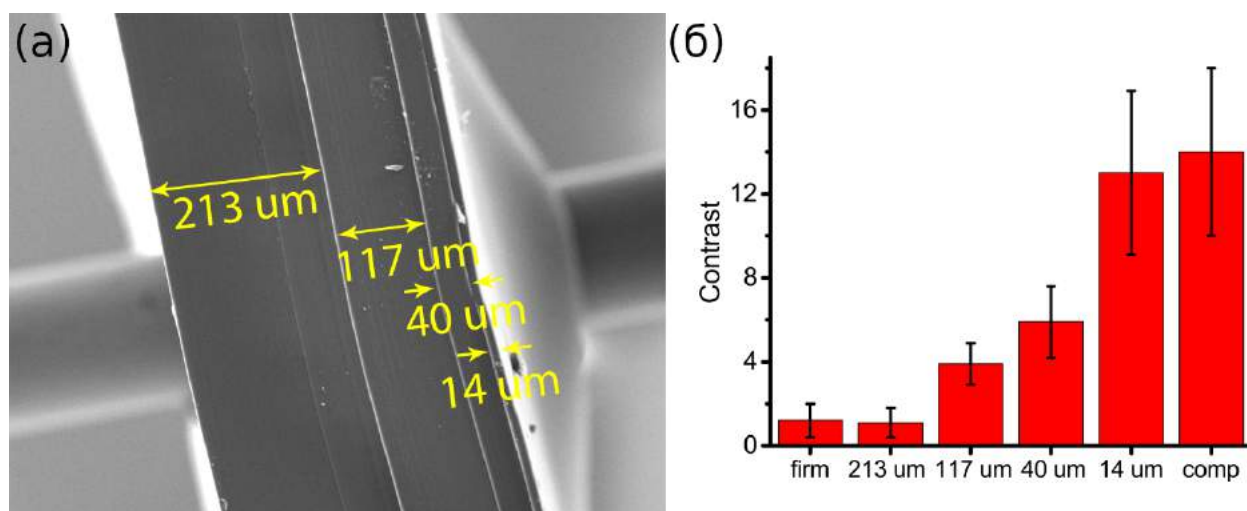


Рисунок 3.7 — Зависимость контраста волн возбуждения, визуализированных методом картирования без красителей, от толщины ПДМС мембраны. (а) - СЭМ микрофотография среза мембран, использованных в исследовании. (б) - зависимость контраста метода от субстрата клеточной культуры. По оси абсцисс отложены следующие категории: firm - твёрдые стеклянные подложки; мембраны из стандартного ПДМС, толщиной 213 мкм, 117 мкм, 40 мкм, 14 мкм ; comp - мембрана из более мягкого ПДМС толщиной 24 мкм.  $N = 5$  в каждой группе образцов.

ся обратно пропорционален толщине мембраны. Самый высокий контраст наблюдался на тонкой мембране толщиной 14 мкм и мембране из более мягкого ПДМС, толщиной 21 мкм. Не было статистически значимого различия в контрасте между этими двумя группами эластичных плёнок. Увеличение толщины мембраны вызвало соответствующее уменьшение контраста. Однако на образцах с самыми толстыми мембранами и твердыми подложками контраст оказался не нулевым, хотя был слабым и недостаточным для надежной регистрации волн возбуждения. Поскольку кардиомиоциты не могли деформировать субстраты этих образцов, это, по-видимому, является результатом регистрации изменений контуров клеток при их сокращении.

### 3.0.5 Оптическое картирование волн возбуждения бытовой видеокамерой

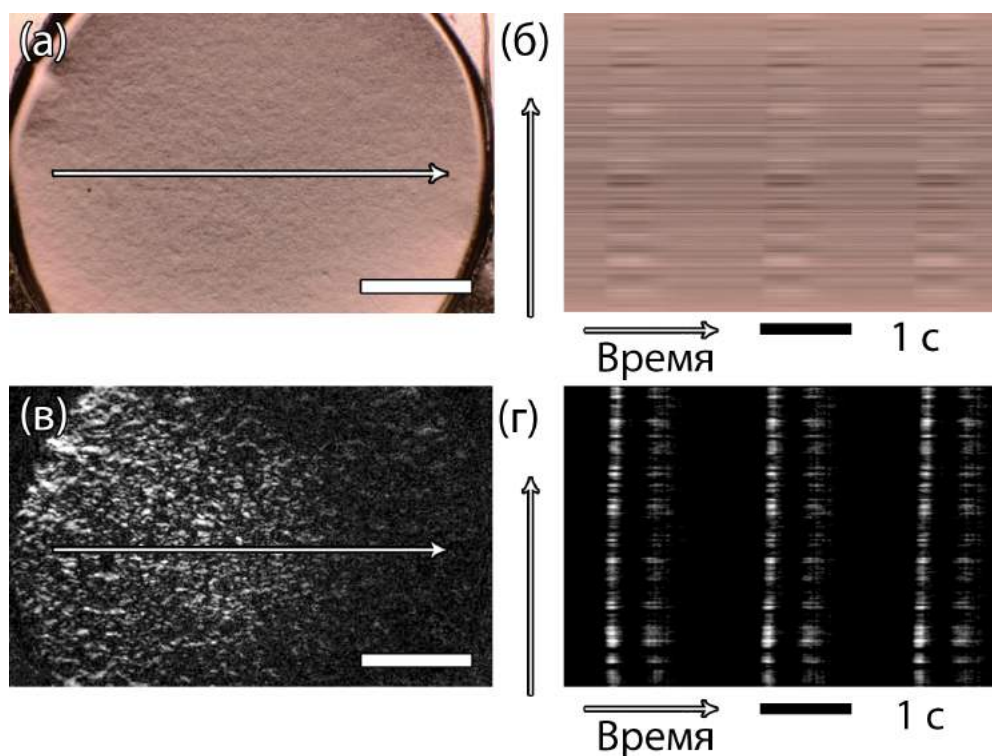


Рисунок 3.8 — Оптическое картирование возбуждения методом без красителей, выполненное с помощью недорогой бытовой камеры. (а) - кадр из необработанного видео, который показывает бегущую волну сокращения на ПДМС мембране. (б) - пространственно-временная развёртка, построенная вдоль линии сканирования, обозначенной на панели (а) стрелкой. (в) и (г) - изображения тех же моментов времени после повышения контрастности. Шкала масштаба - 3 мм. Шкала времени - 1 сек.

Одним из недостатков существующих методов оптического картирования возбуждения является высокая стоимость необходимого оборудования. Требуются флуоресцентные модели бинокулярных микроскопов, а также высокочувствительные камеры, способные обнаруживать сигналы низкой интенсивности флуоресцентных красителей. Наш метод механического картирования без красителей позволяет использовать более простое и дешевое оборудование. В качестве детектора можно использовать широко доступные экшн-камеры, обладающие достаточной частотой кадров - от 120 кадров в секунду. Для метода без химических меток чувствительность камеры не так важна, как в случае флуоресцентных измерений, поскольку детекция в проходящем свете позволяет увеличить интенсивность света до желаемого уровня.

Чтобы продемонстрировать такую возможность, была проведена дополнительная серия экспериментов с использованием обычной экшн-камеры. В этом

эксперименте камера GoPro Hero 3+ Silver Edition использовалась в качестве детектора для записи с разрешением 720x1280 пикселей и частотой записи 120 кадров в секунду. Кадр из видеозаписи волн возбуждения, обнаруженных недорогой камерой методом без красителей, представлен на Рисунке 3.8 (а). На этой панели показан кадр из необработанного видео, запечатлевший бегущую волну сокращения на ПДМС мембране. На Рисунке 3.8 (в) показан тот же кадр после обработки для усиления контраста. На Рисунке 3.8 (б, г) представлены пространственно-временные развёртки вдоль стрелок, показанных на Рисунке 3.8 (а, в) соответственно. Можно заметить, что как по обработанному, так и необработанному видео возможно измерить скорость распространения волны возбуждения. В этом конкретном эксперименте скорость распространения волны возбуждения была равна  $230 \pm 30$  мм / с.

### 3.0.6 Модуляция скорости распространения возбуждения с помощью лидокаина

Чтобы продемонстрировать эффективность предлагаемого метода без красителей, с помощью него была измерена зависимость скорости волн возбуждения в культуре ткани сердца от концентрации блокатора натриевых каналов лидокаина (см. Рисунок 3.9 (а)). 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 (см. Рисунок 3.9 (б)). 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.

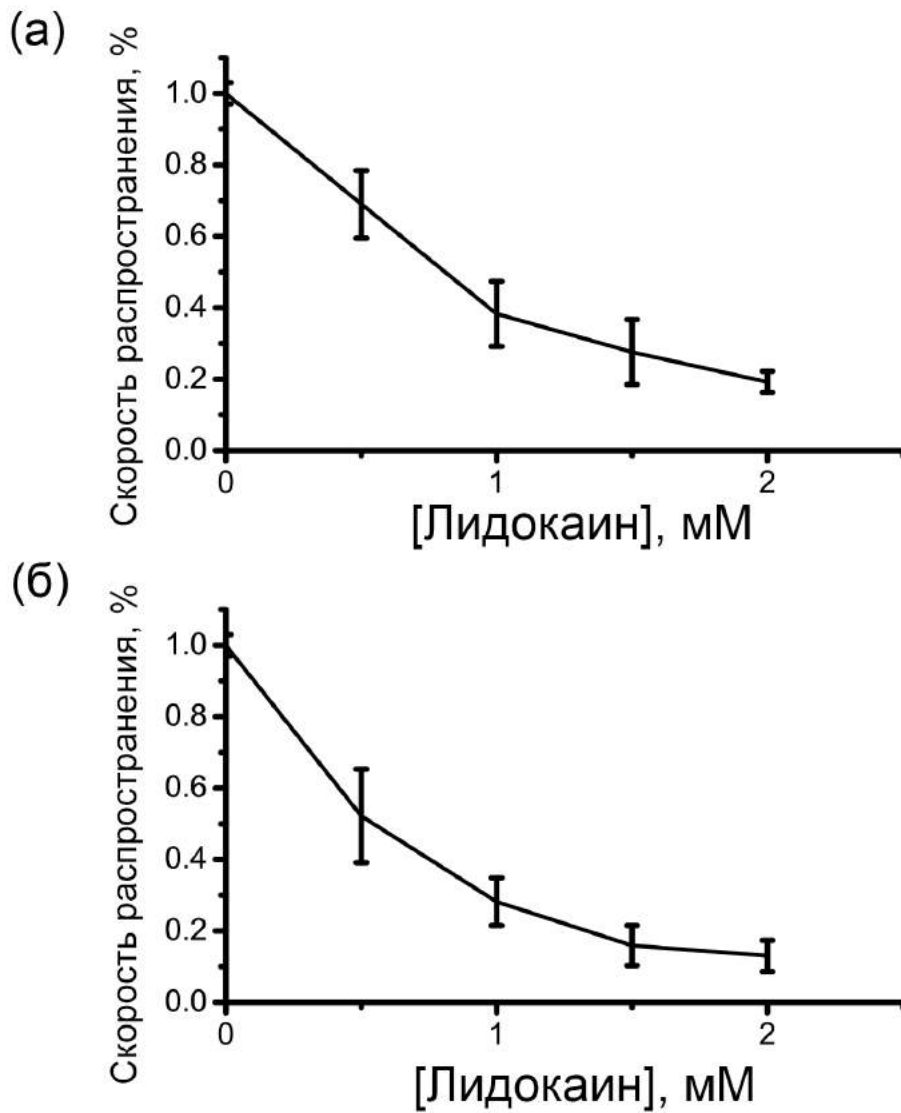


Рисунок 3.9 — Зависимость скорости распространения волн возбуждения от концентрации лидокаина. (а) - картирование оптическим методом без красителей; (б) - картирование с помощью оптического  $Ca^{2+}$  - зависимого флуоресцентного метода.

### 3.0.7 Картирование без красителей в анизотропных клеточных культурах

Метод оптического картирования без красителей также можно использовать для измерения скорости волн возбуждения и наблюдения за их формой в анизотропных клеточных сердечных культурах. Чтобы продемонстрировать эту возможность, использовались микротекстурированные плёнки из ПДМС. АСМ-изображение топологии такой мембраны и ее профиль показаны на

Рисунке 3.10 (а, б). В этих экспериментах использовались мембраны с периодическими гребнями высотой 1 мкм и шириной 2 мкм. Расстояние между гребнями составляло 6 мкм. На Рисунке 3.10 (в, г) показаны конфокальные иммуноцитохимические изображения неонатальных кардиомиоцитов, выращенных на плоской и микротекстурированной мембранах соответственно. Невооружённым глазом можно заметить, что на простой мембране клетки не имеют преимущественного направления роста, в то время как на микротекстурированных субстратах кардиомиоциты значительно выровнены в одном направлении. На Рисунке 3.10 (д, е) показаны карты активации волн возбуждения в изотропных и анизотропных клеточных сердечных культурах, построенные с использованием метода оптического картирования без красителей. На Рисунке 3.10 (д) фронт волны возбуждения имеет круглую форму; на Рисунке 3.10 (е) чётко видна анизотропия волн возбуждения, проявляющаяся в разных скоростях по вертикальной и горизонтальной осям.

Также была продемонстрирована возможность наблюдать спиральные волны в анизотропных сердечных культурах, выращенных на микротекстурированных мембранах. На Рисунке 3.11(б) показана карта активации волны возбуждения в ориентированной культуре кардиомиоцитов. По этой карте можно сделать вывод, что на ней изображен примечательный объект физики возбудимых сред - автоволновой ревербератор. Его можно сравнить с ревербератором на Рисунке 3.11(а). Периоды обращения волн в изотропном и анизотропном монослоях составляют 0,9 с и 0,5 с соответственно. Также есть заметные отличия и в форме фронтов этих волн. В то время как фронт волны в изотропной культуре имеет форму, приближенную к кругу, то форма волны в анизотропном монослое более соответствует прямой.

### Обсуждение результатов раздела

Со времени изобретения мышечных тонких плёнок (МТП) [176] они уже нашли множество применений для исследования сократимости сердечной ткани и для тестирования лекарств [119; 177; 178]. В настоящей работе показано новое применение МТП для исследования сердца - их использование для картирования волн возбуждения без красителей в культурах сердечной ткани. Картирование возбуждения широко используется для исследования влияния различных химических агентов и лекарств на сердечную ткань [179; 180]. Это

также полезный инструмент для исследования основных механизмов сердечной аритмии [15; 156].

В настоящей главе был предложен новый безметочный метод для мониторинга возбуждения в культуре ткани сердца. Этот метод менее требователен к реагентам и оборудованию по сравнению с методами флуоресцентного оптического картирования, широко используемыми сегодня для этой цели [14]. Отсутствие токсичности красителя делает метод применимым для долгосрочного мониторинга активности возбуждения. Более того, предлагаемый способ неинвазивен в том смысле, что позволяет выполнять картирование возбуждения в закрытых чашках Петри. В отличие от методов флуоресцентного картирования, для картирования возбуждения 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. В то же время вопрос об оптимальной толщине подложки и жесткости для использования этого метода для конкретных применений остается открытым. В настоящей работе мы продемонстрировали, что более мягкие мембраны обеспечивают более высокую контрастность. В ряде более ранних исследований [94–96] было показано, что жесткость субстрата влияет на многие другие параметры, такие как экспрессия коннексина 43 и созревание кардиомиоцитов. Выбор подложки с оптимальной жесткостью, необходимой для конкретной исследовательской цели, представляется очень важным, но он выходит за рамки настоящего исследования и определенно потребует дополнительных исследований в будущем.

Предложенный метод картирования без красителей является непрямым: он визуализирует не саму волну возбуждения, а сокращение, которое в нормальных условиях следует за возбуждением. Этот факт ограничивает его применимость. Например, невозможно использовать этот метод для изучения влияния веществ, которые ограничивают сократительную способность кардиомиоцитов (например, 2,3-бутандион-монооксим). Также в случаях, когда исследуются точные изменения возбуждения (например, изменения формы кри-



вой потенциала действия), следует рассмотреть возможность применения более точных методов, таких как использование потенциал-зависимых красителей. С другой стороны, в различных ситуациях изменения в топологии волн возбуждения или их скорости являются предметом исследования [15; 156]. В этих ситуациях наш метод без меток может быть успешно применен.

Ранее было предложено множество методов для мониторинга сократимости сердца в различных пространственных масштабах от одиночной клетки [110–112; 122] до культуры ткани [113–119; 123; 125; 126] и препарата всего сердца [120; 121]. В последнее время такие методы мониторинга стали предметом особого интереса в контексте созревания и развития сердечной ткани, полученной из ИПСК [109; 111; 114; 117; 122–124]. Среди основных подходов, используемых для мониторинга сократимости, так называемый векторный анализ движения микроскопических изображений высокого разрешения [109; 117; 122; 123; 125], различные варианты методов косого освещения [114; 126] и голографическая микроскопия [112; 115; 116].

Ранее уже предлагалось несколько вариантов метода без меток для картирования возбуждения, основанного на мониторинге сокращений [115; 116; 118; 125; 126]. Как и в более ранней работе [115], мы использовали внеосевое освещение для визуализации клеточных сокращений, но принципиальной новинкой нашего подхода является применение гибкой пленки в качестве субстрата для клеточной культуры. Использование такой гибкой пленки способствует большему смещению клеток во время их сокращения по сравнению с культурами, выращенными на жестких субстратах, что усиливает контрастность волн сокращения. Кроме того, в описанной технологии поверхность пленки расположена на границе раздела воздух-жидкость, в результате чего достигается значительное изменение показателя преломления на её перегибах, что повышает контрастность метода. Предложенный метод без меток на основе МТП действительно прост и удобен в использовании. Он не требует сложного оптического оборудования и сложных математических процедур для обработки изображений. Именно поэтому предложенный метод может найти ряд применений в исследованиях распространения волн возбуждения по сердечной ткани.

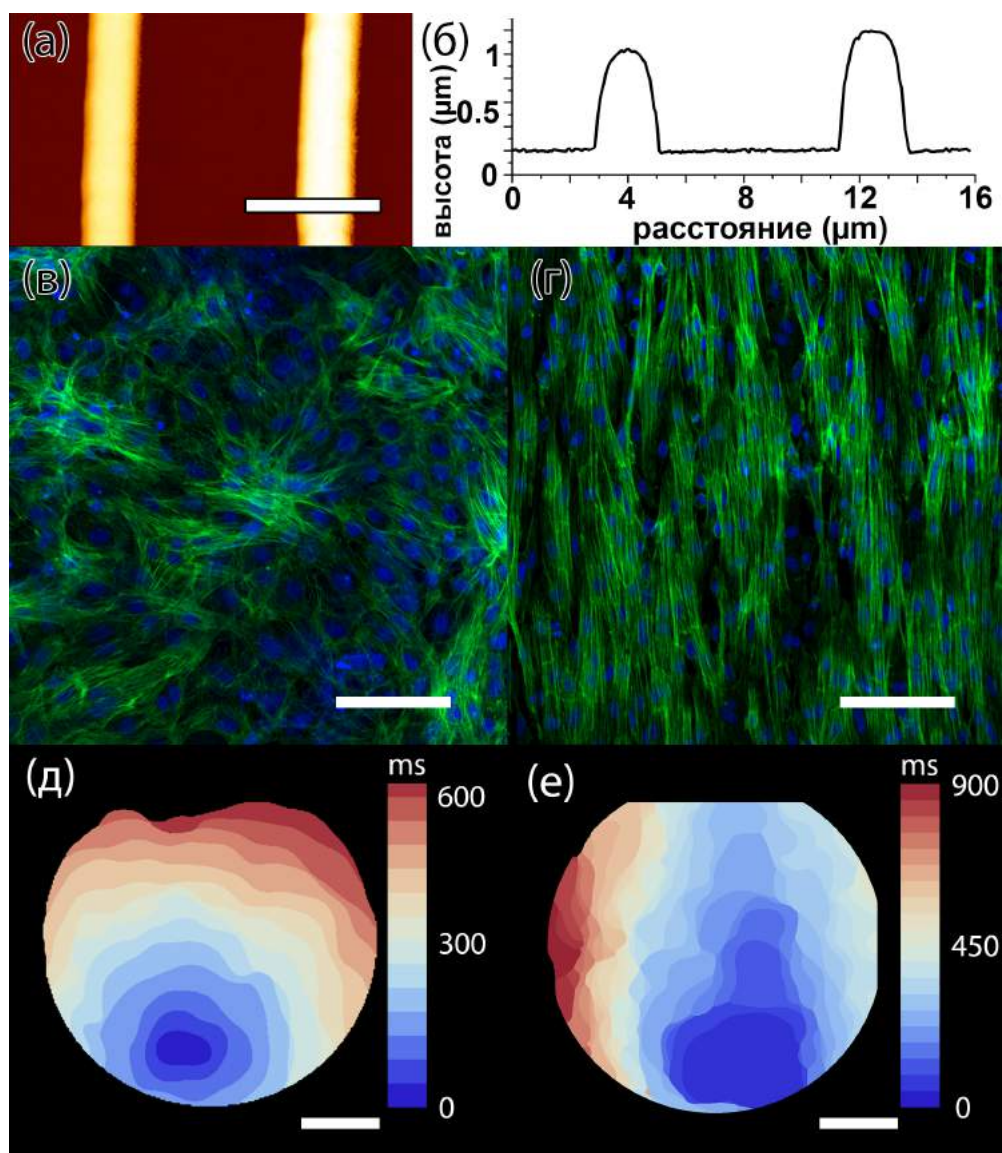


Рисунок 3.10 — Изотропные и анизотропные клеточные культуры, выращенные на плоских и микротекстурированных мембранах. (а, б) - АСМ топография поверхности микротекстурированной мембраны и форма её поперечного сечения. Шкала масштаба - 5 мкм. (в, г) - иммуноцитохимические конфокальные изображения культур клеток сердца, выращенных на плоских и микропаттернированных мембранах соответственно. Актиновые филаменты окрашены Alexa 488 Phalloidin (зеленый); ядра окрашены DAPI (синий). Шкалы масштаба 100 мкм. (д, е) - карты активации для сердечных монослоев, выращенных на плоской и микропаттернированной ПДМС мембранах соответственно. Шкалы масштаба - 3 мм.

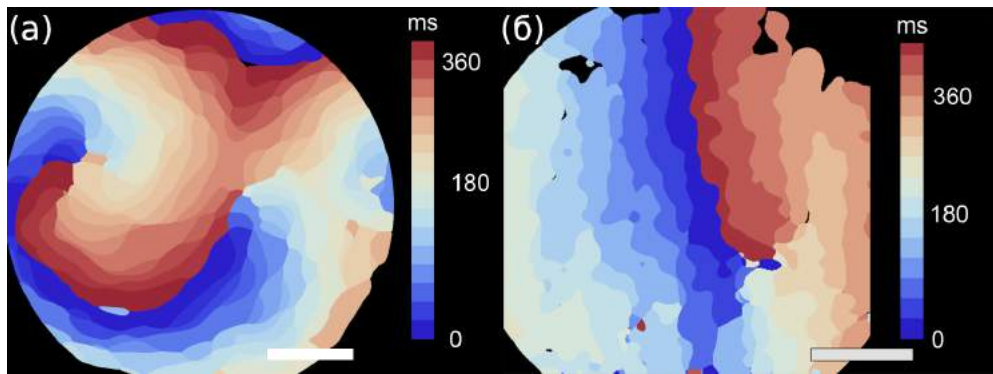


Рисунок 3.11 — Карты активации спиральных волн, наблюдаемых с помощью оптического картирования без красителей. (а) Карта активации спиральной волны в культуре изотропных кардиомиоцитов, взаимодействующей с круговой волной. (б) - Карта активации спиральной волны в анизотропном монослое кардиомиоцитов, выращенном на тонкой микротекстурированной ПДМС мембране. Шкала масштаба - 3 мм.

## Заключение

**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* ряд особенностей морфологии натурального миокарда. 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, прикреплённые 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.

В заключение автор выражает благодарность и большую признательность научному руководителю Агладзе К. И. за помощь, обсуждение результатов и научное руководство. Также автор благодарит Погорелова А. Г. за помощь и обучение электронной микроскопии. Автор благодарит Гурию К., Цвелую В., Фролову Ш., Шутко А., Подгурскую А., Слотвицкого М., Гайко О. и других сотрудников лаборатории биофизики возбудимых систем МФТИ за помощь в работе. Автор также благодарит своих друзей и всех, кто сделал настоящую работу автора возможной.

**Список сокращений и условных обозначений**

<b>MEM</b>	минимальная питательная среда (minimal essential medium)
<b>DMEM</b>	минимальная питательная среда, модифицированная Дульбекко (Dulbecco's modified Eagle's medium)
<b>FBS</b>	сыворотка крови эмбрионов коров (fetal bovine serum)
<b>ChR2-HL1</b>	клетки линии HL1 с трансфицированным канальным родопсином 2
<b>ФК</b>	фокальный контакт
<b>ВКМ</b>	внеклеточный матрикс
<b>ФН</b>	фибронектин
<b>PCL</b>	полимер поликапролактон
<b>PLA</b>	полимер полилактид
<b>КЛСМ</b>	конфокальная лазерная сканирующая микроскопия
<b>ПЭМ</b>	просвечивающая электронная микроскопия
<b>ПРЭМ</b>	просвечивающая растровая электронная микроскопия
<b>СЭМ</b>	сканирующая электронная микроскопия
<b>АСМ</b>	атомно-силовая микроскопия
<b>СЗНТ</b>	сканирующая зондовая нанотомография
<b>ПДМС</b>	полидиметилсилоксан
<b>МТП</b>	мышечная тонкая плёнка

## Список литературы

1. *Langer Robert, Vacanti Joseph.* Tissue Engineering // *Science*. — 1993. — Vol. 260, no. 1. — Pp. 920–926.
2. *Goyena Rodrigo, Fallis A. G.* Principles of tissue engineering. — 2019. — Vol. 53. — Pp. 1689–1699.
3. *Leon Benjamin M.* Diabetes and cardiovascular disease: Epidemiology, biological mechanisms, treatment recommendations and future research // *World Journal of Diabetes*. — 2015. — Vol. 6, no. 13. — P. 1246.
4. Current research trends and challenges in tissue engineering for mending broken hearts / Muhammad Qasim, Pala Arunkumar, Heather M. Powell, Mahmood Khan // *Life Sciences*. — 2019. — Vol. 229, no. March. — Pp. 233–250. — URL: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.05.012>.
5. *Takahashi Kazutoshi, Yamanaka Shinya.* Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors // *Cell*. — 2006. — Vol. 126, no. 4. — Pp. 663–676.
6. The importance of biophysical and biochemical stimuli in dynamic skeletal muscle models / Babette Maleiner, Janine Tomasch, Philipp Heher et al. // *Frontiers in Physiology*. — 2018. — Vol. 9, no. AUG. — Pp. 1–24.
7. *Tong Ho-Wang, Wang Min.* Electrospinning of Poly(Hydroxybutyrate- co -hydroxyvalerate) Fibrous Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Effects of Electrospinning Parameters and Solution Properties // *Journal of Macromolecular Science, Part B*. — 2011. — aug. — Vol. 50, no. 8. — Pp. 1535–1558. — URL: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00222348.2010.541008>.
8. *Buehler Markus J.* Nature designs tough collagen: Explaining the nanostructure of collagen fibrils // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2006. — Vol. 103, no. 33. — Pp. 12285–12290.
9. Electrospun fibrous scaffolds for tissue engineering: Viewpoints on architecture and fabrication / Indong Jun, Hyung Seop Han, James R. Edwards,

- Hojeong Jeon // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2018. — Vol. 19, no. 3.
10. Meyers Jason D., Jay Patrick Y., Rentschler Stacey. Reprogramming the conduction system: Onward toward a biological pacemaker // *Trends in Cardiovascular Medicine*. — 2016. — Vol. 26, no. 1. — Pp. 14–20. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcm.2015.03.015>.
  11. Kanda Pushpinder, Davis Darryl R. Cellular mechanisms underlying cardiac engraftment of stem cells. — 2017.
  12. Cherry E. M., Fenton F. H. Visualization of spiral and scroll waves in simulated and experimental cardiac tissue // *New Journal of Physics*. — 2008. — Vol. 10.
  13. Winfree Arthur T., Tyson John J. When Time Breaks Down: The Three-Dimensional Dynamics of Electrochemical Waves and Cardiac Arrhythmias // *Physics Today*. — 1988. — Vol. 41. — P. 107.
  14. Light-induced termination of spiral wave arrhythmias by optogenetic engineering of atrial cardiomyocytes / Brian O. Bingen, Marc C. Engels, Martin J. Schalij et al. // *Cardiovascular Research*. — 2014. — Vol. 104, no. 1. — Pp. 194–205.
  15. Development of a reentrant arrhythmia model in human pluripotent stem cell-derived cardiac cell sheets / Shin Kadota, Itsunari Minami, Nobuhiro Morone et al. // *European Heart Journal*. — 2013. — apr. — Vol. 34, no. 15. — Pp. 1147–1156. — URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23201623>.
  16. Herron Todd J., Lee Peter, Jalife José. Optical imaging of voltage and calcium in cardiac cells and tissues // *Circulation Research*. — 2012. — Vol. 110, no. 4. — Pp. 609–623.
  17. Curvature-dependent excitation propagation in cultured cardiac tissue / S. Kadota, M. W. Kay, N. Magome, K. Agladze // *JETP Letters*. — 2012. — feb. — Vol. 94, no. 11. — Pp. 824–830. — URL: <http://link.springer.com/10.1134/S0021364011230044>.
  18. Can optical recordings of membrane potential be used to screen for drug-induced action potential prolongation in single cardiac myocytes? /



- M. E.L. Hardy, C. L. Lawrence, N. B. Standen, G. C. Rodrigo // *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. — 2006. — Vol. 54, no. 2. — Pp. 173–182.
19. Di-4-ANEPPS causes photodynamic damage to isolated cardiomyocytes / P. Schaffer, H. Ahammer, W. Müller et al. // *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. — 1994. — Vol. 426, no. 6. — Pp. 548–551.
20. *Mason Chris, Dunnill Peter*. A brief definition of regenerative medicine // *Regenerative Medicine*. — 2008. — Vol. 3, no. 1. — Pp. 1–5.
21. A tissue engineering strategy for the treatment of avascular necrosis of the femoral head / A. Aarvold, J. O. Smith, E. R. Tayton et al. // *Surgeon*. — 2013. — Vol. 11, no. 6. — Pp. 319–325. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.surge.2013.02.008>.
22. Ageing in Russia: a Regional Appraisal / Stuart Gietel-Basten, Vladimir Mau, Warren Sanderson et al. // *Journal of Population Ageing*. — 2020. — Vol. 13, no. 1. — Pp. 63–80.
23. *Wolf Steven H*. The meaning of translational research and why it matters // *JAMA - Journal of the American Medical Association*. — 2008. — Vol. 299, no. 2. — Pp. 211–213.
24. *Wnorowski A., Yang Huaxiao, Wu Joseph C*. Progress, obstacles, and limitations in the use of stem cells in organ-on-a-chip models // *Advanced Drug Delivery Reviews*. — 2019. — Vol. 140. — Pp. 3–11. — URL: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.06.001>.
25. *Mao Angelo S., Mooney David J*. Regenerative medicine: Current therapies and future directions // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2015. — Vol. 112, no. 47. — Pp. 14452–14459.
26. I-Wire Heart-on-a-Chip I: Three-dimensional cardiac tissue constructs for physiology and pharmacology / Veniamin Y. Sidorov, Philip C. Samson, Tatiana N. Sidorova et al. // *Acta Biomaterialia*. — 2017. — Vol. 48. — Pp. 68–78. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2016.11.009>.

27. Reconstituting organ-level lung functions on a chip / Dongeun Huh, Benjamin D. Matthews, Akiko Mammoto et al. // *Science*. — 2010. — Vol. 328, no. 5986. — Pp. 1662–1668.
28. Engineering Stem Cell Self-organization to Build Better Organoids / Verena Schwach, Robert Passier, Muhammad Qasim et al. // *Lab on a Chip*. — 2019. — Vol. 10, no. 1. — Pp. 1–12. — URL: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-018-0016-3><https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.05.005><http://dx.doi.org/10.1007/s11886-019-1171-3><http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.10.009><https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.07.010><https://doi.org/10.1016/j.actbio.2>.
29. Human organoids: A new dimension in cell biology / Ruth Lehmann, Connie M. Lee, Erika C. Shugart et al. // *Molecular Biology of the Cell*. — 2019. — Vol. 30, no. 10. — Pp. 1129–1137.
30. *Zuppinger Christian*. 3D Cardiac Cell Culture: A Critical Review of Current Technologies and Applications // *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. — 2019. — Vol. 6, no. June. — Pp. 1–9.
31. A four-organ-chip for interconnected long-term co-culture of human intestine, liver, skin and kidney equivalents / Ilka Maschmeyer, Alexandra K. Lorenz, Katharina Schimek et al. // *Lab on a Chip*. — 2015. — Vol. 15, no. 12. — Pp. 2688–2699.
32. Progress and Future Perspectives in Skin-on-Chip Development with Emphasis on the use of Different Cell Types and Technical Challenges / Lenie J. van den Broek, Lambert I.J.C. Bergers, Christianne M.A. Reijnders, Susan Gibbs // *Stem Cell Reviews and Reports*. — 2017. — Vol. 13, no. 3. — Pp. 418–429.
33. Future prospects for scaffolding methods and biomaterials in skin tissue engineering: A review / Atul A. Chaudhari, Komal Vig, Dieudonné Radé Baganizi et al. // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2016. — Vol. 17, no. 12.
34. Skin-on-a-chip model simulating inflammation, edema and drug-based treatment / Maierdanjiang Wufuer, Geon Hui Lee, Woojune Hur et al. // *Scientific Reports*. — 2016. — Vol. 6, no. August. — Pp. 1–12.

35. Wave-front curvature as a cause of slow conduction and block in isolated cardiac muscle / C. Cabo, a. M. Pertsov, W. T. Baxter et al. // *Circulation Research*. — 1994. — dec. — Vol. 75, no. 6. — Pp. 1014–1028. — URL: <http://circres.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.RES.75.6.1014>.
36. Electrospun nanofibers as a tool for architecture control in engineered cardiac tissue / Yuliya Orlova, Nobuyuki Magome, Li Liu et al. // *Biomaterials*. — 2011. — aug. — Vol. 32, no. 24. — Pp. 5615–5624. — URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21600646><http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.04.042>.
37. Advanced maturation of human cardiac tissue grown from pluripotent stem cells / Kacey Ronaldson-Bouchard, Stephen P. Ma, Keith Yeager et al. // *Nature*. — 2018. — Vol. 556, no. 7700. — Pp. 239–243. — URL: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-018-0016-3>.
38. Vascular Tissue Engineering: Progress, Challenges, and Clinical Promise / H. H. Greco Song, Rowza T. Rumma, C. Keith Ozaki et al. // *Cell Stem Cell*. — 2018. — Vol. 22, no. 3. — Pp. 340–354. — URL: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.02.009>.
39. Human blood vessel organoids as a model of diabetic vasculopathy / Rein-er A. Wimmer, Alexandra Leopoldi, Martin Aichinger et al. // *Nature*. — 2019. — Vol. 565, no. 7740. — Pp. 505–510. — URL: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-018-0858-8>.
40. Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells / To-bias Hirsch, Tobias Rothoef, Norbert Teig et al. // *Nature*. — 2017. — Vol. 551, no. 7680. — Pp. 327–332.
41. Big bottlenecks in cardiovascular tissue engineering / Ngan F. Huang, Vahid Serpooshan, Viola B. Morris et al. // *Communications Biology*. — 2018. — Vol. 1, no. 1. — Pp. 8–11. — URL: <http://dx.doi.org/10.1038/s42003-018-0202-8>.
42. *Wu Sean M., Hochedlinger Konrad.* Harnessing the potential of induced pluripotent stem cells for regenerative medicine // *Nature Cell Biology*. — 2011. — Vol. 13, no. 5. — Pp. 497–505. — URL: <http://dx.doi.org/10.1038/ncb0511-497>.

43. *Nadlacki Bora, Suuronen Erik J.* Biomaterial strategies to improve the efficacy of bone marrow cell therapy for myocardial infarction. — 2016. — Vol. 16. — Pp. 1501–1516.
44. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A review / Brahatheeswaran Dhandayuthapani, Yasuhiko Yoshida, Toru Maekawa, D. Sakthi Kumar // *International Journal of Polymer Science*. — 2011. — Vol. 2011, no. ii.
45. *Hubbell Jeffrey A.* Biomaterials in Tissue Engineering // *Nature Biotechnology*. — 1995. — jun. — Vol. 13, no. 6. — Pp. 565–576. — URL: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nbt0695-565>.
46. Stem cells and injectable hydrogels: Synergistic therapeutics in myocardial repair / Mohammadmajid Sepantafar, Reihan Maheronnaghsh, Hossein Mohammadi et al. // *Biotechnology Advances*. — 2016. — Vol. 34, no. 4. — Pp. 362–379. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.03.003>.
47. *Drury Jeanie L., Mooney David J.* Hydrogels for tissue engineering: Scaffold design variables and applications // *Biomaterials*. — 2003. — Vol. 24, no. 24. — Pp. 4337–4351.
48. Controlling the porosity and microarchitecture of hydrogels for tissue engineering / Nasim Annabi, Jason W. Nichol, Xia Zhong et al. // *Tissue Engineering - Part B: Reviews*. — 2010. — Vol. 16, no. 4. — Pp. 371–383.
49. *Hussey George S., Dziki Jenna L., Badylak Stephen F.* Extracellular matrix-based materials for regenerative medicine // *Nature Reviews Materials*. — 2018. — Vol. 3, no. 7. — Pp. 159–173. — URL: <http://dx.doi.org/10.1038/s41578-018-0023-x>.
50. *Zhu Junmin, Marchant Roger E.* Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds // *Expert Review of Medical Devices*. — 2011. — Vol. 8, no. 5. — Pp. 607–626.
51. Synthetic polymer scaffolds for tissue engineering / Elsie S. Place, Julian H. George, Charlotte K. Williams, Molly M. Stevens // *Chemical Society Reviews*. — 2009. — Vol. 38, no. 4. — Pp. 1139–1151.

52. Synthesis, characterization and therapeutic efficacy of a biodegradable, thermoresponsive hydrogel designed for application in chronic infarcted myocardium / Kazuro L. Fujimoto, Zuwei Ma, Devin M. Nelson et al. // *Biomaterials*. — 2009. — Vol. 30, no. 26. — Pp. 4357–4368. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.04.055>.
53. *Bryant Stephanie J., Anseth Kristi S.* The effects of scaffold thickness on tissue engineered cartilage in photocrosslinked poly(ethylene oxide) hydrogels // *Biomaterials*. — 2001. — Vol. 22, no. 6. — Pp. 619–626.
54. *Lakshmanan Rajesh, Krishnan Uma Maheswari, Sethuraman Swaminathan.* Polymeric scaffold aided stem cell therapeutics for cardiac muscle repair and regeneration // *Macromolecular Bioscience*. — 2013. — Vol. 13, no. 9. — Pp. 1119–1134.
55. *Velde K Van De, Kiekens P.* Ein Jahrhundert Bahnelektroindustrie // *eb - Elektrische Bahnen*. — 2001. — Vol. 99, no. 12. — P. 483.
56. *Farah Shady, Anderson Daniel G., Langer Robert.* Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — A comprehensive review // *Advanced Drug Delivery Reviews*. — 2016. — Vol. 107. — Pp. 367–392. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.012>.
57. A review of injectable polymeric hydrogel systems for application in bone tissue engineering / Pariksha J. Kondiah, Yahya E. Choonara, Pierre P.D. Kondiah et al. // *Molecules*. — 2016. — Vol. 21, no. 11.
58. *Bhardwaj Nandana, Kundu Subhas C.* Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique // *Biotechnology Advances*. — 2010. — Vol. 28, no. 3. — Pp. 325–347.
59. Molecular biology of the cell / Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis et al. — 2015. — Vol. 40. — P. 1464.
60. *Zander Nicole E.* Hierarchically structured electrospun fibers // *Polymers*. — 2013. — Vol. 5, no. 1. — Pp. 19–44.
61. Fibers for hearts: A critical review on electrospinning for cardiac tissue engineering / Maria Kitsara, Onnik Agbulut, Dimitrios Kontziampasis et al. //

- Acta Biomaterialia*. — 2017. — Vol. 48. — Pp. 20–40. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2016.11.014>.
62. 2D and 3D electrospinning technologies for the fabrication of nanofibrous scaffolds for skin tissue engineering: A review / Antonios Keirouz, Michael Chung, Jaehoon Kwon et al. // *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*. — 2020. — jul. — Vol. 12, no. 4. — URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/wnan.1626>.
63. Stem cell-loaded nanofibrous patch promotes the regeneration of infarcted myocardium with functional improvement in rat model / Dan Kai, Qiang Li Wang, Hai Jie Wang et al. // *Acta Biomaterialia*. — 2014. — Vol. 10, no. 6. — Pp. 2727–2738. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2014.02.030>.
64. Mesenchymal stem cell-loaded cardiac patch promotes epicardial activation and repair of the infarcted myocardium / Qiang Li Wang, Hai Jie Wang, Zhi Hua Li et al. // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. — 2017. — Vol. 21, no. 9. — Pp. 1751–1766.
65. *Jackman Christopher P., Carlson Aaron L., Bursac Nenad*. Dynamic culture yields engineered myocardium with near-adult functional output // *Biomaterials*. — 2016. — Vol. 111. — Pp. 66–79. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.09.024>.
66. *Dias J. R., Granja P. L., Bártolo P. J.* Advances in electrospun skin substitutes // *Progress in Materials Science*. — 2016. — Vol. 84. — Pp. 314–334. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmatsci.2016.09.006>.
67. *Brandenberg Nathalie, Lutolf Matthias P.* In Situ Patterning of Microfluidic Networks in 3D Cell-Laden Hydrogels // *Advanced Materials*. — 2016. — Vol. 28, no. 34. — Pp. 7450–7456.
68. *Ahearne M, Yang Y, Liu K-k.* Mechanical Characterisation of Hydrogels for Tissue Engineering Applications // *Tissue Engineering*. — 2008. — Vol. 4. — Pp. 1–16. — URL: [http://www.oulu.fi/spareparts/ebook\\_topics\\_in\\_t\\_e\\_vol4/abstracts/ahearne.pdf](http://www.oulu.fi/spareparts/ebook_topics_in_t_e_vol4/abstracts/ahearne.pdf).
69. *Butcher Annabel L., Offeddu Giovanni S., Oyen Michelle L.* Nanofibrous hydrogel composites as mechanically robust tissue engineering scaffolds // *Trends*

- in Biotechnology*. — 2014. — Vol. 32, no. 11. — Pp. 564–570. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.09.001>.
70. Organ printing: Computer-aided jet-based 3D tissue engineering / Vladimir Mironov, Thomas Boland, Thomas Trusk et al. // *Trends in Biotechnology*. — 2003. — Vol. 21, no. 4. — Pp. 157–161.
71. Organ printing: Tissue spheroids as building blocks / Vladimir Mironov, Richard P. Visconti, Vladimir Kasyanov et al. // *Biomaterials*. — 2009. — Vol. 30, no. 12. — Pp. 2164–2174. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.12.084>.
72. The adoption of three-dimensional additive manufacturing from biomedical material design to 3D organ printing / Ajay Vikram Singh, Mohammad Hasan Dad Ansari, Shuo Wang et al. // *Applied Sciences (Switzerland)*. — 2019. — Vol. 9, no. 4.
73. 3D Printing of Personalized Thick and Perfusable Cardiac Patches and Hearts / Nadav Noor, Assaf Shapira, Reuven Edri et al. // *Advanced Science*. — 2019. — Vol. 6, no. 11.
74. Tissue-engineered grafts from human decellularized extracellular matrices: A systematic review and future perspectives / Andrea Porzionato, Elena Stocco, Silvia Barbon et al. // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2018. — Vol. 19, no. 12.
75. *Dzobo Kevin, Motaung Keolebogile Shirley Caroline M., Adesida Adetola*. Recent trends in decellularized extracellular matrix bioinks for 3D printing: An updated review // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2019. — Vol. 20, no. 18. — Pp. 1–28.
76. A review of key challenges of electrospun scaffolds for tissue-engineering applications / Sajedeh Khorshidi, Atefeh Solouk, Hamid Mirzadeh et al. // *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. — 2016. — sep. — Vol. 10, no. 9. — Pp. 715–738. — URL: <https://doi.org/10.1002/term.1978><http://doi.wiley.com/10.1002/term.1978>.
77. *Kishan Alysha P., Cosgriff-Hernandez Elizabeth M.* Recent advancements in electrospinning design for tissue engineering applications: A review // *Journal*

- of Biomedical Materials Research - Part A.* — 2017. — Vol. 105, no. 10. — Pp. 2892–2905.
78. *Hu Jerry C., Athanasiou Kyriacos A.* A self-assembling process in articular cartilage tissue engineering // *Tissue Engineering.* — 2006. — Vol. 12, no. 4. — Pp. 969–979.
79. Tension stimulation drives tissue formation in scaffold-free systems / Jennifer K. Lee, Le W. Huwe, Nikolaos Paschos et al. // *Nature Materials.* — 2017. — Vol. 16, no. 8. — Pp. 864–873.
80. *Sackmann Erich, Smith Ana Sunčana.* Physics of cell adhesion: Some lessons from cell-mimetic systems // *Soft Matter.* — 2014. — Vol. 10, no. 11. — Pp. 1644–1659.
81. *Harunaga Jill S., Yamada Kenneth M.* Cell-matrix adhesions in 3D // *Matrix Biology.* — 2011. — Vol. 30, no. 7-8. — Pp. 363–368. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matbio.2011.06.001>.
82. Focal adhesion regulation of cell behavior / Michele A. Wozniak, Katarzyna Modzelewska, Lina Kwong, Patricia J. Keely // *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research.* — 2004. — Vol. 1692, no. 2-3. — Pp. 103–119.
83. *Chen Christopher S.* Mechanotransduction - A field pulling together? // *Journal of Cell Science.* — 2008. — Vol. 121, no. 20. — Pp. 3285–3292.
84. *Tanaka Motomu, Sackmann Erich.* Polymer-supported membranes as models of the cell surface // *Nature.* — 2005. — sep. — Vol. 437, no. 7059. — Pp. 656–663. — URL: <http://www.nature.com/articles/nature04164>.
85. *Takada Yoshikazu, Ye Xiaojing, Simon Scott.* The integrins // *Genome Biology.* — 2007. — Vol. 8, no. 5.
86. *Ehmsen Jeffrey, Poon Ellen, Davies Kay.* The dystrophin-associated protein complex. // *Journal of cell science.* — 2002. — jul. — Vol. 115, no. Pt 14. — Pp. 2801–3. — URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12082140>.
87. *Dabiri Bornha E., Lee Hyungsuk, Parker Kevin Kit.* A potential role for integrin signaling in mechano-electrical feedback // *Progress in Biophysics and*



- Molecular Biology*. — 2012. — Vol. 110, no. 2-3. — Pp. 196–203. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2012.07.002>.
88. Functional analysis of the engineered cardiac tissue grown on recombinant spidroin fiber meshes / Alexander Teplenin, Anna Krasheninnikova, Nadezhda Agladze et al. // *PLoS ONE*. — 2015. — Vol. 10, no. 3. — Pp. 1–14.
89. High resolution 3D microscopy study of cardiomyocytes on polymer scaffold nanofibers reveals formation of unusual sheathed structure / Victor Balashov, Anton Efimov, Olga Agapova et al. // *Acta Biomaterialia*. — 2018. — Vol. 68. — Pp. 214–222.
90. Shape-dependent cell migration and focal adhesion organization on suspended and aligned nanofiber scaffolds / Kevin Sheets, Stephen Wunsch, Colin Ng, Amrinder S Nain // *Acta Biomaterialia*. — 2013. — Vol. 9, no. 7. — Pp. 7169–7177. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.03.042>.
91. Cardiomyocyte Cultures With Controlled Macroscopic Anisotropy: A Model for Functional Electrophysiological Studies of Cardiac Muscle / N. Bursac, K.K. Parker, S. Iravanian, L. Tung // *Circulation Research*. — 2002. — Vol. 91, no. 12. — Pp. e45–e54. — URL: <http://circres.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.RES.0000047530.88338.EB>.
92. The role of feature curvature in contact guidance / Anurag Mathur, Simon W. Moore, Michael P. Sheetz, James Hone // *Acta Biomaterialia*. — 2012. — Vol. 8, no. 7. — Pp. 2595–2601. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2012.03.025>.
93. *Dikovsky Daniel, Bianco-Peled Havazelet, Seliktar Dror*. Defining the role of matrix compliance and proteolysis in three-dimensional cell spreading and remodeling // *Biophysical Journal*. — 2008. — Vol. 94, no. 7. — Pp. 2914–2925. — URL: <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.107.105841>.
94. *Jacot Jeffrey G., McCulloch Andrew D., Omens Jeffrey H*. Substrate stiffness affects the functional maturation of neonatal rat ventricular myocytes // *Biophysical Journal*. — 2008. — Vol. 95, no. 7. — Pp. 3479–3487. — URL: <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.107.124545>.

95. Extracellular matrix-mediated maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiac monolayer structure and electrophysiological function / Todd J. Herron, Andre Monteiro Da Rocha, Katherine F. Campbell et al. // *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*. — 2016. — Vol. 9, no. 4. — Pp. 1–12.
96. Spatiotemporal stability of neonatal rat cardiomyocyte monolayers spontaneous activity is dependent on the culture substrate / Jonathan Boudreau-Béland, James Elber Duverger, Estelle Petitjean et al. // *PLoS ONE*. — 2015. — Vol. 10, no. 6. — Pp. 1–25.
97. Crosslinking of discrete self-assembled collagen threads: Effects on mechanical strength and cell–matrix interactions / Kevin G. Cornwell, Pedro Lei, Stelios T. Andreadis, George D. Pins // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. — 2007. — feb. — Vol. 80A, no. 2. — Pp. 362–371. — URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16948146><http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.30893>.
98. Micromechanics of fibroblast contraction of a collagen-GAG matrix / T. M. Freyman, I. V. Yannas, Y. S. Pek et al. // *Experimental Cell Research*. — 2001. — Vol. 269, no. 1. — Pp. 140–153.
99. Biomaterial surface energy-driven ligand assembly strongly regulates stem cell mechanosensitivity and fate on very soft substrates / Tojo Razafiarison, Claude N. Holenstein, Tino Stauber et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2018. — Vol. 115, no. 18. — Pp. 4631–4636.
100. Traction force microscopy with optimized regularization and automated Bayesian parameter selection for comparing cells / Yunfei Huang, Christoph Schell, Tobias B. Huber et al. // *Scientific Reports*. — 2019. — Vol. 9, no. 1. — Pp. 1–16.
101. Fibroblast contraction of a collagen-GAG matrix / T. M. Freyman, I. V. Yannas, R. Yokoo, L. J. Gibson // *Biomaterials*. — 2001. — Vol. 22, no. 21. — Pp. 2883–2891.

102. Nanonet Force Microscopy for Measuring Cell Forces / Kevin Sheets, Ji Wang, Wei Zhao et al. // *Biophysical Journal*. — 2016. — Vol. 111, no. 1. — Pp. 197–207. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2016.05.031>.
103. *Josephson M. E., Horowitz L. N., Farshidi A.* Continuous local electrical activity. A mechanism of recurrent ventricular tachycardia // *Circulation*. — 1978. — Vol. 57, no. 4. — Pp. 659–665.
104. An Extracellular microelectrode Array for monitoring electrogenic cells in culture / P. Connolly, P. Clark, A. S.G. Curtis et al. // *Biosensors and Bioelectronics*. — 1990. — Vol. 5, no. 3. — Pp. 223–234.
105. A very large-scale microelectrode array for cellular-resolution electrophysiology / David Tsai, Daniel Sawyer, Adrian Bradd et al. // *Nature Communications*. — 2017. — Vol. 8, no. 1. — URL: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-02009-x>.
106. *Haws C. W., Lux R. L.* Correlation between in vivo transmembrane action potential durations and activation-recovery intervals from electrograms. Effects of interventions that alter repolarization time // *Circulation*. — 1990. — Vol. 81, no. 1. — Pp. 281–288.
107. *Berenfeld Omer, Efimov Igor.* Optical Mapping // *Cardiac Electrophysiology Clinics*. — 2019. — Vol. 11, no. 3. — Pp. 495–510. — URL: <https://doi.org/10.1016/j.ccep.2019.04.004>.
108. *Salama G, Morad M.* Merocyanine 540 as an optical probe of transmembrane electrical activity in the heart // *Science*. — 1976. — feb. — Vol. 191, no. 4226. — Pp. 485–487. — URL: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.191.4226.485>.
109. Simultaneous Measurement of Contraction and Calcium Transients in Stem Cell Derived Cardiomyocytes / A. Ahola, R. P. Pölönen, K. Aalto-Setälä, J. Hyttinen // *Annals of Biomedical Engineering*. — 2018. — Vol. 46, no. 1. — Pp. 148–158.
110. Quantification of cardiomyocyte contraction based on image correlation analysis / A. Kamgoué, J. Ohayon, Y. Usson et al. // *Cytometry Part A*. — 2009. — Vol. 75, no. 4. — Pp. 298–308.

111. Integrated Analysis of Contractile Kinetics, Force Generation, and Electrical Activity in Single Human Stem Cell-Derived Cardiomyocytes / Jan David Kijlstra, Dongjian Hu, Nikhil Mittal et al. // *Stem Cell Reports*. — 2015. — Vol. 5, no. 6. — Pp. 1226–1238. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.10.017>.
112. Whole-cell-analysis of live cardiomyocytes using wide-field interferometric phase microscopy / Natan T. Shaked, Lisa L. Satterwhite, Nenad Bursac, Adam Wax // *Biomedical Optics Express*. — 2010. — Vol. 1, no. 2. — P. 706.
113. A cell-based biosensor for real-time detection of cardiotoxicity using lensfree imaging / Sang Bok Kim, Hojae Bae, Jae Min Cha et al. // *Lab on a Chip*. — 2011. — Vol. 11, no. 10. — Pp. 1801–1807.
114. Automated quantification study of human cardiomyocyte synchronization using holographic imaging / InKyu Moon, Ezat Ahmadzadeh, Keyvan Jaferzadeh, Namgon Kim // *Biomedical Optics Express*. — 2019. — Vol. 10, no. 2. — P. 610.
115. Label-free cardiac contractility monitoring for drug screening applications based on compact high-speed lens-free imaging / Thomas Pauwelyn, Veerle Reumers, Geert Vanmeerbeeck et al. // *Imaging, Manipulation, and Analysis of Biomolecules, Cells, and Tissues XIII*. — 2015. — Vol. 9328, no. March 2015. — P. 932818.
116. Reflective lens-free imaging on high-density silicon microelectrode arrays for monitoring and evaluation of in vitro cardiac contractility / Thomas Pauwelyn, Richard Stahl, Lakyn Mayo et al. // *Biomedical Optics Express*. — 2018. — Vol. 9, no. 4. — P. 1827.
117. Automated video-based analysis of contractility and calcium flux in human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes cultured over different spatial scales / Nathaniel Huebsch, Peter Loskill, Mohammad A. Mandegar et al. // *Tissue Engineering - Part C: Methods*. — 2015. — Vol. 21, no. 5. — Pp. 467–479.
118. *Hwang Seong Min, Yea Kwon Hae, Lee Kyoung J.* Regular and alternant spiral waves of contractile motion on rat ventricle cell cultures // *Physical Review Letters*. — 2004. — Vol. 92, no. 19. — Pp. 1–4.

119. Biohybrid thin films for measuring contractility in engineered cardiovascular muscle / Patrick W. Alford, Adam W. Feinberg, Sean P. Sheehy, Kevin K. Parker // *Biomaterials*. — 2010. — Vol. 31, no. 13. — Pp. 3613–3621. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.079>.
120. *Christoph J., Schröder-Schetelig J., Luther S.* Electromechanical optical mapping // *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. — 2017. — Vol. 130. — Pp. 150–169.
121. *Christoph Jan, Luther Stefan.* Marker-free tracking for motion artifact compensation and deformation measurements in optical mapping videos of contracting hearts // *Frontiers in Physiology*. — 2018. — Vol. 9, no. NOV.
122. Video image-based analysis of single human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocyte beating dynamics using digital image correlation / Antti Ahola, Anna L. Kiviahho, Kim Larsson et al. // *BioMedical Engineering Online*. — 2014. — Vol. 13, no. 1. — Pp. 1–18.
123. High throughput physiological screening of iPSC-derived cardiomyocytes for drug development / Juan C. del Álamo, Derek Lemons, Ricardo Serrano et al. // *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. — 2016. — Vol. 1863, no. 7. — Pp. 1717–1727. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.03.003>.
124. Methods for in vitro functional analysis of iPSC derived cardiomyocytes - Special focus on analyzing the mechanical beating behavior / Eeva Laurila, Antti Ahola, Jari Hyttinen, Katriina Aalto-Setälä // *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. — 2016. — Vol. 1863, no. 7. — Pp. 1864–1872. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.12.013>.
125. Noninvasive evaluation of contractile behavior of cardiomyocyte monolayers based on motion vector analysis / Tomohiro Hayakawa, Takeshi Kunihiro, Suguru Dowaki et al. // *Tissue Engineering - Part C: Methods*. — 2012. — Vol. 18, no. 1. — Pp. 21–32.
126. Optical control of excitation waves in cardiac tissue / Rebecca A.B. Burton, Aleksandra Klimas, Christina M. Ambrosi et al. // *Nature Photonics*. — 2015. — Vol. 9, no. 12. — Pp. 813–816. — URL: <http://dx.doi.org/10.1038/nphoton.2015.196>.

127. Advanced methods of microscope control using  $\mu$ Manager software / Arthur D Edelstein, Mark A Tsuchida, Nenad Amodaj et al. // *Journal of Biological Methods*. — 2014. — nov. — Vol. 1, no. 2. — P. 10. — URL: <http://www.jbmethods.org/jbm/article/view/36>.
128. *Chae Su Kyoung, Ryoo Ji Hee, Lee Sang Hoon*. Thin and large free-standing PDMS membrane by using polystyrene Petri dish // *Biochip Journal*. — 2012. — Vol. 6, no. 2. — Pp. 184–190.
129. Synchronization of excitable cardiac cultures of different origin / N. N. Agladze, O. V. Halaidych, V. A. Tsvelaya et al. // *Biomaterials Science*. — 2017. — Vol. 5, no. 9. — Pp. 1777–1785.
130. On-chip optical stimulation and electrical recording from cells / Alexey Yakushenko, Zheng Gong, Vanessa Maybeck et al. // *Journal of Biomedical Optics*. — 2013. — Vol. 18, no. 11. — P. 1.
131. HL-1 cells: A cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte / William C. Claycomb, Nicholas A. Lanson, Beverly S. Stallworth et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 1998. — Vol. 95, no. 6. — Pp. 2979–2984.
132. Atomic force microscope (AFM) combined with the ultramicrotome: a novel device for the serial section tomography and AFM/TEM complementary structural analysis of biological and polymer samples. / Anton E Efimov, Alexander G Tonevitsky, Maria Dittrich, Nadezda B Matsko // *Journal of microscopy*. — 2007. — jun. — Vol. 226, no. Pt 3. — Pp. 207–17. — URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17535260>.
133. Determination of elastic moduli of thin layers of soft material using the atomic force microscope / Emilios K. Dimitriadis, Ferenc Horkay, Julia Maresca et al. // *Biophysical Journal*. — 2002. — Vol. 82, no. 5. — Pp. 2798–2810. — URL: [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75620-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75620-8).
134. Mechanical properties of self-assembled nanoparticle membranes: Stretching and bending / Yifan Wang, Pongsakorn Kanjanaboos, Sean P. McBride et al. // *Faraday Discussions*. — 2015. — Vol. 181. — Pp. 325–338. — URL: <http://dx.doi.org/10.1039/C4FD00243A>.

135. Diagnostics of living cells under an atomic force microscope using a submicron spherical probe with a calibrated radius of curvature / I. A. Nyapshaev, A. V. Ankudinov, A. V. Stovpyaga et al. // *Technical Physics*. — 2012. — Vol. 57, no. 10. — Pp. 1430–1437.
136. *Meredith Jere E., Schwartz Martin A.* Integrins, adhesion and apoptosis // *Trends in Cell Biology*. — 1997. — Vol. 7, no. 4. — Pp. 146–150.
137. The human adult cardiomyocyte phenotype / S. D. Bird, P. A. Doevendans, M. A. Van Rooijen et al. // *Cardiovascular Research*. — 2003. — Vol. 58, no. 2. — Pp. 423–434.
138. Guided orientation of cardiomyocytes on electrospun aligned nanofibers for cardiac tissue engineering / Dan Kai, Molamma P. Prabhakaran, Guorui Jin, Seeram Ramakrishna // *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*. — 2011. — Vol. 98 B, no. 2. — Pp. 379–386.
139. *Kennedy Kelsey M., Bhaw-Luximon Archana, Jhurry Dhanjay.* Cell-matrix mechanical interaction in electrospun polymeric scaffolds for tissue engineering: Implications for scaffold design and performance // *Acta Biomaterialia*. — 2017. — Vol. 50. — Pp. 41–55. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2016.12.034>.
140. 3D imaging of cell interactions with electrospun PLGA nanofiber membranes for bone regeneration / Urszula Stachewicz, Tuya Qiao, Simon C F Rawlinson et al. // *Acta Biomaterialia*. — 2015. — Vol. 27. — Pp. 88–100. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2015.09.003>.
141. 3D scanning probe nanotomography of tissue spheroid fibroblasts interacting with electrospun polyurethane scaffold / A. E. Efimov, O. I. Agapova, L. A. Safonova et al. // *Express Polymer Letters*. — 2019. — Vol. 13, no. 7. — Pp. 632–641.
142. *Livne Ariel, Geiger Benjamin.* The inner workings of stress fibers - From contractile machinery to focal adhesions and back // *Journal of Cell Science*. — 2016. — Vol. 129, no. 7. — Pp. 1293–1304.

143. *Bozzola John J., Lonnie Dee Russell, Russel Lonnie.* Electron microscopy: principles and techniques for biologists. — Jones & Bartlett Learning, 1999. — P. 543.
144. The nuclear envelope lamina network has elasticity and a compressibility limit suggestive of a molecular shock absorber / Kris Noel Dahl, Samuel M. Kahn, Katherine L. Wilson, Dennis E. Discher // *Journal of Cell Science.* — 2004. — Vol. 117, no. 20. — Pp. 4779–4786.
145. *Nedelec Francois, Foethke Dietrich.* Collective Langevin dynamics of flexible cytoskeletal fibers // *New Journal of Physics.* — 2007. — Vol. 9.
146. *Mogilner Alex, Keren Kinneret.* The Shape of Motile Cells // *Current Biology.* — 2009. — Vol. 19, no. 17. — Pp. R762–R771. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2009.06.053>.
147. *Samarel Allen M.* Costameres, focal adhesions, and cardiomyocyte mechanotransduction // *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology.* — 2005. — Vol. 289, no. 6 58-6.
148. *Tennyson Christine N.* 1995 Nature human dystrophin transcription // *Nature Genetics.* — 1995.
149. *Constantin Bruno.* Dystrophin complex functions as a scaffold for signalling proteins // *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes.* — 2014. — Vol. 1838, no. 2. — Pp. 635–642. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.08.023>.
150. *Townes Philip L., Holtfreter Johannes.* Directed movements and selective adhesion of embryonic amphibian cells // *Journal of Experimental Zoology.* — 1955. — Vol. 128, no. 1. — Pp. 53–120.
151. *Armstrong Peter B.* Cell Sorting Out: The Self-Assembly of Tissues In Vitro // *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* — 1989. — jan. — Vol. 24, no. 2. — Pp. 119–149. — URL: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10409238909086396>.
152. *Tzanakakis Emmanouhl S., Hansen Linda K., Hu Wei Shou.* The role of actin filaments and microtubules in hepatocyte spheroid self-assembly // *Cell Motility and the Cytoskeleton.* — 2001. — Vol. 48, no. 3. — Pp. 175–189.



153. *Jacques Steven L.* Erratum: Optical properties of biological tissues: A review (Physics in Medicine and Biology (2013) 58) // *Physics in Medicine and Biology*. — 2013. — Vol. 58, no. 14. — Pp. 5007–5008.
154. Microfabricated tissue gauges to measure and manipulate forces from 3D micro-tissues / Wesley R. Legant, Amit Pathak, Michael T. Yang et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2009. — Vol. 106, no. 25. — Pp. 10097–10102.
155. Muscular Thin Films for Label-Free Mapping of Excitation Propagation in Cardiac Tissue / Viktor A. Balashov, Vasily S. Gorbunov, Konstantin G. Guria, Konstantin I. Agladze // *Annals of Biomedical Engineering*. — 2020.
156. Arrhythmogenic role of the border between two areas of cardiac cell alignment / N. N. Kudryashova, A. S. Teplenin, Y. V. Orlova et al. // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. — 2014. — Vol. 76. — Pp. 227–234. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.09.003>.
157. Self-organization of conducting pathways explains electrical wave propagation in cardiac tissues with high fraction of nonconducting cells / Nina Kudryashova, Aygul Nizamieva, Valeriya Tsvelaya et al. // *PLoS Computational Biology*. — 2019. — Vol. 15, no. 3. — Pp. 1–21.
158. *Vite Alexia, Radice Glenn L.* N-cadherin/catenin complex as a master regulator of intercalated disc function // *Cell Communication and Adhesion*. — 2014. — Vol. 21, no. 3. — Pp. 169–179.
159. *Khajavi R., Abbasipour M.* Electrospinning as a versatile method for fabricating coreshell, hollow and porous nanofibers // *Scientia Iranica*. — 2012. — Vol. 19, no. 6. — Pp. 2029–2034. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scient.2012.10.037>.
160. Recent Progress in Coaxial Electrospinning: New Parameters, Various Structures, and Wide Applications / Jihyun Yoon, Ho Sung Yang, Byoung Sun Lee, Woong Ryeol Yu // *Advanced Materials*. — 2018. — Vol. 30, no. 42. — Pp. 1–23.
161. Sinoatrial node cardiomyocytes derived from human pluripotent cells function as a biological pacemaker / Stephanie I. Protze, Jie Liu, Udi Nussinovitch et al. // *Nature Biotechnology*. — 2017. — Vol. 35, no. 1. — Pp. 56–68.

162. Optogenetic Control of Cardiac Function / A. B. Arrenberg, D. Y. R. Stainier, H. Baier, J. Huisken // *Science*. — 2010. — nov. — Vol. 330, no. 6006. — Pp. 971–974. — URL: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1195929>.
163. Channelrhodopsin-2 and optical control of excitable cells / Jason D. Meyers, Patrick Y. Jay, Stacey Rentschler et al. // *Nature Biotechnology*. — 2016. — Vol. 6, no. 1. — Pp. 14–20. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcm.2015.03.015>.
164. Optogenetics design of mechanistically-based stimulation patterns for cardiac defibrillation / Claudia Crocini, Cecilia Ferrantini, Raffaele Coppini et al. // *Scientific Reports*. — 2016. — Vol. 6. — Pp. 1–7.
165. *Mogilner Alex, Oster George*. Force generation by actin polymerization II: The elastic ratchet and tethered filaments // *Biophysical Journal*. — 2003. — Vol. 84, no. 3. — Pp. 1591–1605. — URL: [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74969-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74969-8).
166. Molecular mechanisms regulating formation, trafficking and processing of annular gap junctions / Matthias M. Falk, Cheryl L. Bell, Rachael M. Kells Andrews, Sandra A. Murray // *BMC Cell Biology*. — 2016. — Vol. 17, no. 1.
167. *Picone John B., Sperelakis Nicholas, Mann James E*. Expanded model of the electric field hypothesis for propagation in cardiac muscle // *Mathematical and Computer Modelling*. — 1991. — Vol. 15, no. 8. — Pp. 17–35.
168. *Huber Alexander, Pickett Andy, Shakesheff Kevin M*. Reconstruction of spatially orientated myotubes in vitro using electrospun, parallel microfibre arrays // *European Cells and Materials*. — 2007. — Vol. 14, no. 0. — Pp. 56–63.
169. Inhibition of anchorage-dependent cell spreading triggers apoptosis in cultured human endothelial cells / Fabio Re, Adriana Zanetti, Marina Sironi et al. // *Journal of Cell Biology*. — 1994. — Vol. 127, no. 2. — Pp. 537–546.
170. *Kwee Brian J., Mooney David J*. Biomaterials for skeletal muscle tissue engineering // *Current Opinion in Biotechnology*. — 2017. — Vol. 47. — Pp. 16–22. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2017.05.003>.

171. Камкин А., Каменский А. Фундаментальная и клиническая физиология. — 2004. — P. 1073.
172. Stationary and drifting spiral waves of excitation in isolated cardiac muscle / Jorge M. Davidenko, Arcady V. Pertsov, Remy Salomonsz et al. // *Nature*. — 1992. — jan. — Vol. 355, no. 6358. — Pp. 349–351. — URL: <http://www.nature.com/articles/355349a0>.
173. Jalife José. Ventricular Fibrillation: Mechanisms of Initiation and Maintenance // *Annual Review of Physiology*. — 2000. — mar. — Vol. 62, no. 1. — Pp. 25–50. — URL: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.physiol.62.1.25>.
174. Basic Mechanisms of Cardiac Impulse Propagation and Associated Arrhythmias / Andre G Kleber, Yoram Rudy, André G. Kléber, Yoram Rudy // *Physiological Reviews*. — 2004. — apr. — Vol. 84, no. 2. — Pp. 431–488. — URL: <http://physrev.physiology.org/cgi/content/abstract/84/2/431>.
175. Multi-electrode monitoring of guided excitation in patterned cardiomyocytes / L. Wang, L. Liu, X. Li et al. // *Microelectronic Engineering*. — 2013. — Vol. 111. — Pp. 267–271.
176. Muscular thin films for building actuators and powering devices / Adam W. Feinberg, Alex Feigel, Sergey S. Shevkoplyas et al. // *Science*. — 2007. — Vol. 317, no. 5843. — Pp. 1366–1370.
177. Ensembles of engineered cardiac tissues for physiological and pharmacological study: Heart on a chip / Anna Grosberg, Patrick W. Alford, Megan L. McCain, Kevin Kit Parker // *Lab on a Chip*. — 2011. — Vol. 11, no. 24. — Pp. 4165–4173.
178. Contractile tension and beating rates of self-exciting monolayers and 3D-tissue constructs of neonatal rat cardiomyocytes / P. Linder, J. Trzewik, M. Rüffer et al. // *Medical and Biological Engineering and Computing*. — 2010. — Vol. 48, no. 1. — Pp. 59–65.
179. Effect of heptanol and ethanol on excitation wave propagation in a neonatal rat ventricular myocyte monolayer / A. D. Podgurskaya, V. A. Tsvelaya, S. R. Frolova et al. // *Toxicology in Vitro*. — 2018. — Vol. 51, no. May. — Pp. 136–144. — URL: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.05.009>.

180. The Use of iPSC-Derived Cardiomyocytes and Optical Mapping for Erythromycin Arrhythmogenicity Testing / A. D. Podgurskaya, V. A. Tsvelaya, M. M. Slotvitsky et al. // *Cardiovascular Toxicology*. — 2019. — Vol. 19, no. 6. — Pp. 518–528. — URL: <https://doi.org/10.1007/s12012-019-09532-x>.

## Список рисунков

- 0.1 Искусственно сконструированная трёхмерная сердечная ткань. (а) Изготовленная из полидиметилсилоксана форма для заливки гидрогеля с сердечными клетками. (б) Увеличенное изображение искусственной сердечной ткани, выделенное белым прямоугольником на панели а. Конструкция прикреплена к титановым проводам. (в) Гистологическое исследование спустя 15 дней культивации. Окраска гематоксилином и эозином продольного и поперечного сечений искусственного миокарда. Из [26]. . . . . 10
- 0.2 Схема устройства микроприборов типа лёгкое-на-чипе. (А) Микроустройство для имитации лёгких состоит из микроканалов в ПДМС и тонкой, пористой ПДМС мембраны. Устройство воссоздаёт движения при дыхании, понижая давление в боковых камерах и вызывая механическое растяжение мембраны ПДМС, образующей альвеолярно-капиллярный барьер. (В) При вдыхании сокращение диафрагмы вызывает снижение внутриплеврального давления, что приводит к растяжению легкого и физическому растяжению альвеолярно-капиллярного интерфейса. (С) Схема получения трёх параллельных микроканалов, разделённых мембраной толщиной 10 мкм, содержащей поры с эффективными диаметрами 10 мкм. Шкала масштаба 200 мкм. (D) Вид готового изделия. Шкала масштаба 200 мкм. (Е) Изображения фактического микрофлюидного устройства «лёгкие на чипе», вид сверху. [27]. . . 11
- 0.3 (а) Подходы к изготовлению искусственных сосудов. Трубочатые структуры, которые напоминают артерии (диаметром  $< 6$  мм), могут быть получены из ксеногенного сырья или изготовлены из биоматериалов посредством листовой прокатки, формовки или прямого скаффолдинга. После изготовления на трансплантаты высеваются эндотелиальные и гладкомышечные клетки, после чего они кондиционируются биомеханическими стимулами перед имплантацией. Из [38]. . . . . 12

- 0.4 (а) Протокол генерации сосудистых органоидов из стволовых клеток человека. (б) Репрезентативная иммунофлюоресценция CD31-экспрессирующих эндотелиальных клеток показывает образование сосудистых сетей (клетки NC8). (в) Эндотелиальные сети (CD31 и UEA-I) покрыты перицитами (PDGFR $\beta$ ) (клетки NC8). (г) 3D реконструкция капиллярной организации (CD31) в сосудистом органоиде (клетки NC8). (д) - эндотелиальные трубки (CD31) в сосудистых органоидах (клетки NC8), покрытые перицитами (PDGFR $\beta$ ) и базальной мембраной (коллаген типа IV (Col IV)). (е) трансплантация сосудистых органоидов человека (клетки NC8) мышам NSG. Слева вверху, место трансплантации с помощью МРТ. Внизу слева целая трансплантация после изоляции. Из [39]. . . . . 13
- 0.5 Регенерация эпидермиса трансдуцированными культурами кератиноцитов. (а) Подготовка ложа кожной раны во время трансплантации. (б) Трансплантация на левую руку эпидермальных трансплантатов с культуры на пластике, установленных на непрелипающей марле (звездочки). (с) Приживленный эпидермис (звездочки) проявляется при удалении марли (стрелки) через десять дней после пересадки. (д) восстановленный эпидермис на левой руке через 1 месяц. (е) трансплантация и приживание кожных трансплантатов на левой ноге. (ф) полная эпидермальная регенерация проявляется через 1 месяц. Из [40]. . . . . 14

- 0.6 (a, b) Схемы удлинения клетки, показывающие сайты прикрепления. (c) Схема изгиба филамента матрикса из-за силы, развиваемой актиновыми волокнами в клетке, показывающая зазор между клеткой и филаментом. (d) Диаграмма, показывающая натяжение актиновых волокон, напряжение в матриксе и результирующий баланс сил в месте прикрепления. (e, f) Схемы, показывающие стягивание клеткой нескольких филаментов. (g) Схематический график силы сопротивления, создаваемой филаментами матрицы для заданного смещения, создаваемого клеткой. Обратите внимание, что после начала потери устойчивости сила сопротивления не увеличивается значительно при увеличении деформации. Из [98]. . . . . 24
- 1.1 (a) - Схема приготовления подложек с подвешенными нановолокнами из PLA. (б) - СЭМ-изображение подвешенных нановолокон из PLA, полученных с помощью электроспиннинга. Средний диаметр  $616 \pm 101$  нм. Шкала 5 мкм. . . . . 47
- 1.2 КЛСМ-микротографии крысиных неонатальных кардиомиоцитов, выращенные на подвешенных нановолокнах. Нановолокна окрашены родамином 6G (оранжевый), актиновые филаменты клеток (в клеточном кортексе и миофибриллах) окрашены Alexa 488 Phalloidin (зеленый),  $\alpha$ -актинин в Z-дисках саркомер кардиомиоцитов окрашен первичными антителами к  $\alpha$ -актинину и вторичными антителами Alexa Fluor 594 (красный), ядра контрастированы DAPI (синий). (a) Оптический срез кардиомиоцита, поглотившего единичное нановолокно. (б) Реконструкция среза кардиомиоцита вдоль белых стрелок на (a). Полимерное нановолокно (оранжевый) окружено миофибриллой (зеленый). Шкалы масштаба 4 мкм. (в) Снимок кардиомиоцита, выращенного на трёх нановолокнах. (г) Реконструкция среза кардиомиоцита вдоль белых стрелок на (в). Миофибриллы примыкают к нановолокнам. Шкалы масштаба 5 мкм. . . . . 48

- 1.3 КЛСМ-микротографии крысиных фибробластов сердца, выращенных на полимерных нановолокнах. (а) Оптический срез фибробласта на отдельном волокне. (б) Реконструкция среза фибробласта вдоль белых стрелок на (а). Нановолокно находится рядом с клеткой. Шкалы 4 мкм. (в) Фибробласт, выращенных на кластере полимерных волокон. Шкала 10 мкм. (г) Реконструкция среза фибробласта вдоль белых стрелок на (в). Волокна на этом срезе могут быть классифицированы как проходящие через объём клетки. Шкала 5 мкм. . . . . 49
- 1.4 Гистограмма, показывающая 95% доверительные интервалы для долей кардиомиоцитов и фибробластов, в которых волокна были локализованы во внутреннем объёме клеток. . . . . 50
- 1.5 ПЭМ микротографии кардиомиоцитов, выращенных на подвешенных волокнах. (а, б) Типичные ПЭМ изображения кардиомиоцитов, выращенных на подвешенных волокнах. На вставках представлены увеличенные участки с поглощёнными волокнами и клеточными мембранами, окружающими волокно. Волокна f1 и f2 на (а) и f3 на (б) поглощены клетками, но складка мембраны, образованная в результате поглощения, расположена над ними. Большинство миофибрилл (mf) расположены вблизи полимерных нановолокон. Шкалы масштаба 1 мкм. Шкалы масштаба во вставках - 0,5 мкм. . . . . 51
- 1.6 ПЭМ микротография кардиомиоцита, полностью и частично обернувшего нановолокна. Волокно f1 находится в небольшой полости, образованной клеточной мембраной. Поверхность мембраны контактирует с волокном только в месте расположения миофибрилл. Волокно f2 частично обернуто клеткой. Используются следующие обозначения: f - волокна PLA/FN, mt - митохондрии, mf - миофибриллы, er - шероховатый эндоплазматический ретикулум. Чёрные стрелки указывают складки клеточной мембраны. Шкала 2 мкм. . . . . 53



- 1.7 ПЭМ микрофотографии сердечных фибробластов, выращенных на подвешенных волокнах. (б) ПЭМ-изображение веретенообразного фибробласта, выращенного на подвешенном волокне. (б)  
 ПЭМ-изображение полигонального фибробласта, выращенного на нескольких подвешенных волокнах. Клетка имеет минимальную площадь взаимодействия с двумя волокнами, которые обозначены стрелками. Одно волокно (двойное) частично поглощено.  
 Используются следующие обозначения: f - волокна PLA / FN, mt - митохондрии, mf - миофибриллы, er - шероховатый эндоплазматический ретикулум, N - ядро. Шкалы масштаба 1 мкм.  
 Шкалы масштаба во вставках - 0,5 мкм. . . . . 54
- 1.8 ПЭМ микрофотография кластера фибробластов на подвешенных полимерных нановолокнах. На снимке видно три отдельных фибробласта, которые прилегают к трём полимерным волокнам, но не обёртывают их. . . . . 55
- 1.9 Распределения степеней обёртывания нановолокон кардиомиоцитами и фибробластами. 100% соответствует полному обёртыванию волокна. (а) Распределение степеней обёртывания для кардиомиоцитов. (б) Распределение степеней обёртывания для фибробластов. . . . . 55
- 1.10 Трёхмерная СЗНТ реконструкция кардиомиоцита, поглотившего нановолокна из PLA. (а) Одно из топографических АСМ изображений (№ 27 из 54), использованное для трёхмерной реконструкции. На вставке присутствует увеличенная отмеченная область с волокнами и клеточной мембраной складки. (б)  
 3D-модель кардиомиоцита с оболочкой из полимерных волокон (16,0 × 16,0 × 6,5 мкм, 54 среза, толщина среза 120 нм). Серая плоскость представляет местоположение АСМ изображения из а).  
 (с) Еще один ракурс трёхмерной модели кардиомиоцитов. Можно видеть, что все полимерные волокна расположены глубоко внутри клетки, которая имеет разветвления, направляемые волокнами.  
 Шкала масштаба 1 мкм. . . . . 56

- 1.11 Деформация нановолокна неонатальным кардиомиоцитом и влияние натяжения на его морфологию. (а) - Кардиомиоцит в покое на натянутом волокне. (б) - кардиомиоцит в покое на волокне с ослабленным натяжением. (в) - Кардиомиоцит на ослабленном волокне в состоянии сокращения. Шкалы масштаба 20 мкм. (г) - Схема деформации волокна кардиомиоцитом. . . . . 58
- 1.12 Поведение кардиомиоцитов и сердечных фибробластов при внезапном снижении силы натяжения волокна. (а) - Кардиомиоциты и фибробласты на натянутом волокне. Кардиомиоциты отмечены цифрами. (б) - Деформации кардиомиоцитов и фибробластов после снижения натяжения. (в) - Кардиомиоциты и фибробласты на натянутых волокнах. Кардиомиоциты отмечены стрелками. (г) - Деформации кардиомиоцитов и фибробластов после снижения натяжения. Шкалы масштаба 50 мкм. . . . . 59
- 1.13 Культивация отдельных кардиомиоцитов и сердечных фибробластов на одиночных нановолокнах в течение 72 часов. (а) - Фибробласт на одиночном волокне. Видны два фокальных контакта и 3 точки перегиба нановолокна. (б, в) - Отдельные кардиомиоциты на единичных нановолокнах. Волокно натянуто за пределами клетки. В месте прикрепления нанофиламент имеет 5 точек изгиба, что говорит о наличии дополнительных сайтов прикрепления в середине клетки. Шкалы масштаба 10 мкм. . . . . 60
- 1.14 (а) - Схема, демонстрирующая отношение растяжения волокна  $dl$  и смещения его конца  $dx$  в продольном и поперечном направлениях. (б) - График, демонстрирующий зависимость отношения  $\frac{dl/L}{dx/L}$  от относительного смещения  $\frac{dx}{L}$  конца волокна в поперечном направлении. При относительных смещениях  $<50\%$  растяжение волокна  $dl$  в 2 раза меньше смещения  $dx$ . . . . . 64

- 1.15 Образец с сеткой полимерных нановолокон. (а) - Общий вид образца. По краям квадратного стекла 22x22 мм помещаются две полоски из ПДМС, перпендикулярно которым напыляются адгезивные нановолокна из полилактида. (б) - СЭМ изображение сетки полимерных волокон плотностью 35 волокон/мм. Средняя толщина волокон  $683 \pm 175$  нм. Шкала масштаба 0,5 мм. (в) - Типичное распределение по направлениям в образце, вычисленное с помощью метода локального градиента плагином ImageJ Directionality. . . . . 65
- 1.16 Кардиомиоциты и сердечные фибробласты, выращенные на подвешенной сетке нановолокон. (а) - Сердечная культура на выровненной сетке волокон с плотностью 67 волокон/мм. (б) - Сердечная культура на сетке нановолокон с низкой степенью ориентации и плотностью 19 волокон/мм. Шкалы масштаба 100 мкм. 65
- 1.17 Интервальная съёмка с периодом в 1 сутки процесса ремоделирования сетки полимерных волокон культурой клеток сердца. Области, выделенные белыми квадратами, показаны на вставках справа. Изначальная ширина сетки 2 мм, плотность  $\sim 40$  волокон/мм. Шкалы масштаба 4 мм. . . . . 66
- 1.18 Фотографирование с интервалом в 1 сутки процесса ремоделирования сетки полимерных волокон культурой клеток сердца. Ширина сетки 7 мм, плотность  $\sim 44$  волокон/мм. Образовалась сетка взаимосвязанных клеточных пучков, которые не смогли объединиться из-за большой ширины сетки. Шкалы масштаба 4 мм. . . . . 67
- 1.19 Сформированные кардиальные жгуты, полученные в результате ремоделирования культурой клеток сердца сетки полимерных нановолокон с перемещаемыми концами. Жгуты получены из участков сетки, шириной 3 мм. Шкала масштаба 2 мм. . . . . 68

- 1.20 КЛСМ иммуноцитохимические снимки крысиных кардиомиоцитов и сердечных фибробластов, реорганизовавших сетку полимерных волокон в трёхмерные жгуты. (а) - Оптический снимок в проходящем свете кардиальной микроткани. (б) - КЛСМ оптический срез в плоскости ХУ кардиальной микроткани. Её средняя толщина составляет  $46 \pm 4$  мкм. Сечения пучка вдоль белых стрелок показаны на панели (г). (в) - КЛСМ снимок другой кардиальной микроткани, толщиной  $44 \pm 2$  мкм. Реконструкции поперечного оптического среза вдоль белой стрелки показаны на панели (д). Форма сечения этого кардиального жгута более приближена к окружности по сравнению с (а, б). Шкалы масштаба (а, б) 50 мкм, (в, г, д, е) 20 мкм. . . . . 69
- 1.21 Гистограмма, показывающая распределение диаметров сформированных кардиальных микротканей на 4 или 5 день культивации. . . . . 70
- 1.22 Кардиальные микроткани в проходящем свете и при флуоресцентной визуализации. (а) Шкала 2 мм. (б) Шкала 50 мкм. 71
- 1.23 Анализ расположения волокон в кардиальном жгуте, визуализированного на конфокальном микроскопе. Красным обозначен краситель Rhodamine 6G, окрасивший волокна и митохондрии. (а) - Оптический срез микроткани. Виден плотный пучок волокон. (б) - Реконструированные сечения вдоль белых стрелок. (в) - Схемы, показывающие расположения основной фракции волокон на (б). Видно, что волокна лежат на одной кривой. (г) - Оптические срезы, дополнительно показывающие распределение актина и ядер. (д) - Трёхмерная реконструкция расположения волокон в объёме микроткани. Шкалы масштаба 15 мкм. . . . . 73
- 1.24 Гистологическое и электронно микроскопическое исследование жгутов. (а, б) - ПРЭМ изображения полутонкого поперечного среза кардиального жгута. Чёрным цветом на изображении показана медная сеточка для поддержки срезов. (в) - Оптический снимок в проходящем свете гистологического образца, окрашенного по Гимзе. (г) - Автофлуоресценция заливочной среды - эпоксидной смолы Ерон 812. Шкала масштаба 10 мкм. . . . . 74

- 1.25 ПЭМ микрофотографии кардиального жгута, имеющего в своём составе кластер полимерных нановолокон. (а) - снимок нижней оконечности жгута, обозначенного цифрой «1» на Рисунке 1.24. Шкала 5 мкм. (б) - Увеличенный снимок области, обозначенный на панели (а) белым прямоугольником снизу. Виден кластер из 14 полимерных волокон, скреплённый микровыростами фибробластов. Чёрные шестиугольники - отложения цитрата свинца. Шкала 3 мкм. (в) - Увеличенный снимок области, обозначенный на панели (а) белым прямоугольником сверху. Шкала 3 мкм. . . . . 75
- 1.26 Гистологическое и электронно микроскопическое исследование кардиального жгута. (а) - гистологический снимок полутонкого среза кардиального жгута, обозначенного цифрой «2» на Рисунке 1.24. (б) - ПРЭМ микрофотография этого среза. (в, г) - ПЭМ микрофотографии ультратонкого среза этого кардиального жгута. Чёрные области на изображениях - следы загрязнения среза цитратом свинца. . . . . 76
- 1.27 ПЭМ микрофотография участка жгута без нановолокон. Высокая степень ориентации клеток говорит о наличии механического напряжения в этом образце. Шкала масштаба 5 мкм. . . . . 77
- 1.28 Гистологическое и ПРЭМ микрофотографии кардиального жгута. Шкалы масштаба 10 мкм. . . . . 78
- 1.29 Распределение волокон в объёме кардиальных микротканей на ПЭМ снимках. Преобладает одиночное расположение клеток. . . . . 79

- 1.30 (а) - Схема, поясняющая объединение первичных пучков и возникновение напряжения в кардиальной микроткани. Кардиальная микроткань во фронтальном и аксиальном сечениях показана оранжевыми овалами. Кластеры полимерных волокон показаны толстыми чёрными линиями. (1) - Два первично образовавшихся пучка волокон могут сблизиться друг с другом из-за деформации полимерной сетки или могут быть в соприкосновении изначально. (2) - При контакте двух пучков происходит образование «мостика», который расширяется со временем из-за межклеточных взаимодействий, стягивая пучки друг к другу. (3) - После завершения объединения образуется единый пучок. Однако в таком пучке полимерные волокна могут быть натянутыми, что вызывает напряжение в плоскости XZ и соответствующую ориентацию клеток. (б) - Схема этого процесса в перпендикулярной плоскости XZ. . . . . 80
- 1.31 Картирование кардиальных жгутов (а) - Флуоресцентный снимок сетки нановолокон с кардиальными жгутами на разных стадиях формирования. Белым квадратом выделена область картирования. Шкала масштаба 2,5 мм. (б) - Область картирования кардиальных жгутов, обозначенная на (а) белым квадратом. (в) - Схема, показывающая расположение прямых, вдоль которых измерялась скорость. Шкала масштаба 1 мм. . . . . 81
- 1.32 Картирование кардиального жгута, находящегося на стадии формирования (а) - Флуоресцентный снимок. По краям видна два плотных кардиальных пучка. Плотность волокон в центре более низкая по сравнению с краями. (б) - Карта активации. Шкалы масштаба 1 мм. . . . . 83

- 1.33 Модельная васкуляризация кардиального жгута. (а) - Оптический снимок в проходящем свете кардиального жгута с толстым полимерных филаментов внутри. Филамент выровнен по оси микроткани. (б) - Иммуноцитохимический конфокальный снимок кардиального жгута с толстым полимерным филаментом внутри, представляющим модель капилляра. Актиновый цитоскелет обозначен зелёным, нановолокна и мёртвые клетки обозначены красным, толстое микроволокно обозначено синим. Это доказывает возможность размещения в объёме полых полимерных структур, позволяющих улучшить питание областей жгута, удалённых от поверхности. Вдоль белых стрелок реконструированы флуоресцентные оптические срезы в плоскости XZ. (в - д) - Оптические срезы в плоскости XZ кардиального жгута с толстым полимерным филаментом внутри. Видно, что волокно, обозначенное синим цветом, находится внутри жгута, в окрестности его центра. Шкалы масштаба - 50 мкм. . . . . 84
- 1.34 Сердечная микроткань, с полимерным филаментом толщиной 20 мкм внутри. Длина микрофиламента составляет  $742 \pm 9$  мкм. Он выровнен по главной оси жгута. Шкала масштаба 100 мкм. . . . . 85
- 2.1 Кластеры из светочувствительных клеток линии ChR2-HL1. (А) Сетка, которую образуют ChR2-HL1 на агарозном геле. (Б) Малые кластеры, получаемые на поверхности плоской неадгезивной подложки. Косое освещение. Шкалы масштаба 200 мкм. . . . . 88
- 2.2 Подсадка клеток линии ChR2-HL1 на культуру кардиомиоцитов и на адгезивный субстрат. (А) Первичная культура с посаженными клетками ChR2-HL1. Светлое поле. Зеленым показана флуоресценция белка eYFP в клетках линии ChR2-HL1, встроенных в монослой первичной культуры желудочковых кардиомиоцитов крысы. (Б) Флуоресценция белка eYFP в отдельных кардиомиоцитах линии ChR2-HL1 (зеленый), выращенных на покровном стекле. Шкалы масштаба 100 мкм. . . . . 89

- 2.3 Встраивание кластеров клеток линии ChR2-HL1 в первичную культуру крысиных кардиомиоцитов. Время совместного культивирования 24 часа. (А) Распластаный кластер, посаженный на субконфлюэнтную первичную культуру желудочковых кардиомиоцитов крысы. Освещение по методу светлого поля. (Б) Флуоресценция химерного белка eYFP с канальным родопсином 2, встроенного в мембраны клеток линии ChR2-HL1. Клетки располагаются менее плотно и мигрируют из кластера в культуру. (В, Г) Кластер клеток ChR2-HL1 в светлом поле и при флуоресценции, посаженный в монослой полностью конфлюэнтной первичной культуры. Клетки в кластере располагаются плотно, миграция менее выражена, о чём говорит чёткий контур кластера. (Д, Е) Распределение по размерам посаженных кластеров спустя 24 часа совместного культивирования при посадке суб- и конфлюэнтные монослои первичных культур соответственно. Под графиками указаны диапазоны размеров кластеров. Шкалы масштаба 100 мкм. . . . . 90
- 2.4 3D КЛСМ изображения кластеров из светочувствительных клеток, посаженные на первичные культуры кардиомиоцитов. (А, Б, В, Г) Кластеры, посаженные на субконфлюэнтные культуры неонатальных кардиомиоцитов. Красным обозначен  $\alpha$ -актинин, зелёным - F-актин, синим – ядра (DAPI). Шкалы масштаба 100 мкм. (Д) Кластеры, посаженные на плотные культуры неонатальных кардиомиоцитов. Шкала 300 мкм. (Е) Трёхмерная реконструкция одного из кластеров. Видно прикрепление кластера к нижележащему монослою. Шкала масштаба 50 мкм. . . . . 91



- 2.5 Волны возбуждения на сердечной культуре, инициированные в ответ на стимуляцию кластера световыми импульсами. (А) Распространение волны возбуждения по культуре неонатальных кардиомиоцитов с подсаженным кластером ChR2-НL1 в разные промежутки времени. Шкала масштаба 3 мм; (Б) Пространственно - временная развёртка распространения волны вдоль оси, обозначенной “Х” на рис. (А). Толстые вертикальные белые линии – световой импульс (10 мс). Показан ответ культуры на каждый световой стимул. Период стимуляции 1300 мс. Шкала масштаба 3 мм обозначена короткой белой вертикальной линией. . . . . 92
- 2.6 Характеристики ответа на световой импульс отдельных светочувствительных ChR2-НL1 клеток и их кластеров, посаженных на суб- и конфлюэнтные монослои неонатальных крысиных кардиомиоцитов. Закрашенные прямоугольники показывают медиану, а также нижний и верхний квартили распределения в соответствующих выборках. Нижние и верхние «усы» показывают 5 и 95 процентиля. Оранжевые и фиолетовые солбцы показывают распределения до и после воздействия 0.86 мМ лидокаином. (А) Количество источников волн возбуждения, появляющихся на сердечных культурах в ответ на засветку образца сразу по всей площади. Наибольшее количество источников волн возбуждения наблюдалось для светочувствительных кластеров на субконфлюэнтных монослоях и для отдельных клеток на анизотропных культурах. (Б) Критические частоты, воспринимаемые сердечными монослоями из разных групп в ответ на точечный световой импульс. В этом случае кластеры НL1, посаженные на субконфлюэнтные 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. . . . . 94

- 2.7 Стимуляция светом анизотропной сердечной культуры с отдельными клетками ChR2-HL1 (а) - Флуоресценция  $Ca^{2+}$  - зависимого красителя fluo-4 во время картирования. Белым квадратом выделена область, показанная на КЛСМ снимке на панели (в). Шкала 200 мкм. (б) - Карта активации этого участка сердечной культуры. Темно-синим цветом показано место инициации волны возбуждения (в) - Иммуноцитохимический КЛСМ снимок области, где произошла инициация волны возбуждения в ответ на раздражение цветом. Стрелкой показана клетка HL1. Зелёный цвет - F-актин. Красный -  $\alpha$ -актинин и полимерные волокна. Синий - ядра. Шкала 50 мкм. . . . . 95
- 2.8 Влияние взаимодействия с субстратом на возникновение электрической связи между кластерами светочувствительных клеток ChR2-HL1 и монослоем неонатальных крысиных кардиомиоцитов. (А) Схематичное изображение полужаселённой культуры. Розовым обозначена часть стекла, заселённая неонатальными первичными кардиомиоцитами. Белым – незаселённая. Маленькие фиолетовые кружки обозначают подсаженные кластеры ChR2-HL1. Разный размер кружков обозначает разную степень их распластывания на заселённой и незаселённой частях образца. (Б) Один из кадров оптического картирования волн возбуждения с помощью  $Ca^{2+}$ -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. . . . . 97

- 2.9 Иллюстрация возможного механизма влияния совместного роста клеток на одном субстрате на эффективность образования электрической связи. (а) Схема взаимного расположения клеток подсаживаемого сфероида и культуры реципиента. Связь между этими типами клеток образуется за счёт действия силы тяжести. (б) Образование связи между клетками, мигрирующими во взаимном направлении по единому субстрату. Во время этого процесса в лидирующем крае клетки за счёт полимеризации актиновых филаментов образуется толкающая сила, которая может обеспечить давление в месте контакта, более чем на два порядка превышающее давление при взаимодействии под действием силы тяжести. . . . . 98
- 2.10 Схема приготовления наноподложек нарезанием ориентированных полимерных нановолокон, полученных с помощью электроспиннинга. (а) - Нарезка ориентированных полимерных нановолокон на покровном стекле, прикреплённом к ХУ столику моторизованного микроскопа Carl Zeiss Axio Observer. (б) - Схема резки полимерных нановолокон. Стрелками показано направления движения ножа. Шаг резки  $dx$  задаётся в управляющей программе. 101
- 2.11 Прикрепление кардиомиоцитов к наноподложкам. (а) Клетки, во время подсадки на образцы с наноподложками. Шкала 100 мкм. (Б, В, Г, Д) Отдельные кардиомиоциты на наноподложках после открепления от покровного стекла. (Б, В, Г) Шкала 20 мкм. (Д) Шкала 10 мкм. (Е, Ж) . . . . . 102
- 2.12 Кардиомиоциты на наноподложках, подсаженные на монослои неонатальных крысиных кардиомиоцитов. Стрелками показаны места образования связей с монослоями. Иммуноцитохимическое окрашивание. Зелёное – F-актин. Синее – ядра. Красное – наноподложки. (а) Шкала 20 мкм. (б) Шкала 50 мкм. (в) Взаимодействие культуры кардиомиоцитов с адгезивными волокнами без клеток. Стрелками показаны изменения в строении цитоскелета, вызванные присутствием наноподложек. Шкала 20 мкм. . . . . 103

- 3.1 Изготовление МТП для мониторинга волн возбуждения по методу на основе эластичных мембран без использования красителей. (а) - Полимер ПДМС наносился на крышку чашки Петри и центрифугировался до образования тонкой плёнки, после чего запекался; (б) - кольцо из ПДМС приклеивалось к поверхности плёнки для обеспечения её механической стабильности; (в) - кольцо с плёнкой отсоединялось от крышки чашки Петри; (г) - конструкция в виде «барабана» покрывалась фибронектином для улучшения адгезии клеток; (д) - на подготовленную поверхность «барабана» высаживалась суспензия клеток; (е) - сокращения кардиомиоцитов и последующие изгибы поверхности МТП детектировались камерой с ПЗС матрицей в косом освещении. . . . . 107
- 3.2 Визуализация изгибов Мышечной Тонкой Плёнки (МТП) при косом освещении. (а) - расчёт отклонения света при его переходе через изгиб мембраны ПДМС, лежащей на границе раздела вода/воздух. (б) - деформированная мембрана слегка сжатого ПДМС барабана, визуализированная в косом освещении. Шкала масштаба - 2 мм. (в) - участок ПДМС мембраны, деформированной сократившимися кардиомиоцитами, в косом освещении. Шкала масштаба - 200 мкм. (г) - Временная зависимость средней яркости двух квадратных областей от времени, указанных в (в). . . . . 108
- 3.3 Визуализация распространения волны возбуждения на мышечной тонкой плёнке (МТП) с помощью метода без красителя. (а) - последовательность кадров, показывающая распространение волны возбуждения, записанной методом без красителя; (б) - пространственно-временная развёртка, построенная вдоль линии, показанной на панели (а) стрелкой; (в) и (г) - те же изображения после обработки для повышения контрастности. Шкала масштаба - 3 мм. Шкала времени - 1 с. . . . . 110

- 3.4 Сравнение двух методов картирования возбуждения: оптическое картирование с использованием  $Ca^{2+}$  - чувствительного красителя Fluo-4 и оптическое картирование без красителей на основе МТП. (а) - видеокадр из записи флуоресцентного оптического картирования  $Ca^{2+}$  полужаселённой культурой кардиомиоцитов ПДМС мембраны. (б) - видеокадр из записи оптического картирования без химических меток того же образца. Шкалы масштаба - 3 мм. . . . . 112
- 3.5 Сравнение двух методов картирования возбуждения: оптическое картирование с использованием  $Ca^{2+}$  - чувствительного красителя Fluo-4 и оптическое картирование без красителей на основе МТП. (б) - кадр из видеозаписи эксперимента с параллельным картированием (подробности см. в тексте). Левая часть изображения представляет визуализацию флуоресцентного сигнала от части образца, закрытой от проходящего света непрозрачным фильтром. Правая часть изображения представляет визуализацию деформаций мембраны, детектированных в косом освещении. Волны возбуждения распространяются по образцу снизу вверх. (а, в) - пространственно-временные развёртки, построенные вдоль белых стрелок на изображении (б). Шкалы масштаба - 3 мм. . . . . 113
- 3.6 Нормализованные сигналы, записанные флуоресцентным картированием и картированием без красителя из одновременно возбуждённых областей образца. . . . . 114
- 3.7 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. По оси абсцисс отложены следующие категории: firm - твёрдые стеклянные подложки; мембраны из стандартного ПДМС, толщиной 213 мкм, 117 мкм, 40 мкм, 14 мкм ; soft - мембрана из более мягкого ПДМС толщиной 24 мкм. N = 5 в каждой группе образцов. . . . . 115

- 3.8 Оптическое картирование возбуждения методом без красителей, выполненное с помощью недорогой бытовой камеры. (а) - кадр из необработанного видео, который показывает бегущую волну сокращения на ПДМС мембране. (б) - пространственно-временная развёртка, построенная вдоль линии сканирования, обозначенной на панели (а) стрелкой. (в) и (г) - изображения тех же моментов времени после повышения контрастности. Шкала масштаба - 3 мм. Шкала времени - 1 сек. . . . . 116
- 3.9 Зависимость скорости распространения волн возбуждения от концентрации лидокаина. (а) - картирование оптическим методом без красителей; (б) - картирование с помощью оптического  $Ca^{2+}$  - зависимого флуоресцентного метода. . . . . 118
- 3.10 Изотропные и анизотропные клеточные культуры, выращенные на плоских и микротекстурированных мембранах. (а, б) - АСМ топография поверхности микротекстурированной мембраны и форма её поперечного сечения. Шкала масштаба - 5 мкм. (в, г) - иммуноцитохимические конфокальные изображения культур клеток сердца, выращенных на плоских и микропаттернированных мембранах соответственно. Актиновые филаменты окрашены Alexa 488 Phalloidin (зеленый); ядра окрашены DAPI (синий). Шкалы масштаба 100 мкм. (д, е) - карты активации для сердечных монослоев, выращенных на плоской и микропаттернированной ПДМС мембранах соответственно. Шкалы масштаба - 3 мм. . . . . 122
- 3.11 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. Шкала масштаба - 3 мм. . . . . 123

## Список таблиц

- 1 Физико-химические свойства полилактида и других биополимеров.  
 $a$ :  $\rho$ - плотность полимера,  $\sigma$ - предел прочности,  $E$ - модуль упругости,  $\varepsilon$ - предельное растяжение,  $\sigma^*$ - удельная прочность на разрыв,  $E^*$ - удельный модуль упругости при растяжении,  $T_g$ - температура стеклования,  $T_m$ - температура плавления.  $b$ : ам - аморфное вещество, не имеющее точки плавления. Из [55], [56]. . . . 17
- 2 Морфологические параметры микротканей, измеренные на ПЭМ снимках . . . . . 79
- 3 Скорости проведения волн возбуждения в сердечных пучках и средние толщины этих пучков. (N = 14 - 16 измерений) . . . . . 82

## Приложение А

### Исходные программные коды

Алгоритм [А.1](#) предназначен для коррекции затухания сигнала в Z-стеках конфокальных снимков. В этом алгоритме предполагается, что сигнал затухает как линейная функция от поверхности исследуемого объекта плюс некая толщина, где сигнал достаточно силён, и корректировать его не надо. Для этого изначальные снимки размывались трёхмерным фильтром Гаусса, и первые Z координаты с пороговой яркостью считались началом ткани. После этого яркость всех последующих пикселей умножались на произведение подобранного в ручную коэффициента  $k$  и координаты  $z'$  от начала ткани.

Листинг А.1: Код на языке Wolfram Mathematica для коррекции затухания сигнала на конфокальных снимках

```

5  (*Вычисляет матрицу начала жгута, отсчитывая от этого начала для
   \
   каждой точки умножает каждый пиксель на 1 + i/k
   row - строка для среза в XZ плоскости
   k1 - коэффициент усиления
   thk - толщина слоя, когда не усиляется*)

brtAdj[st_, row_, k1_, thk_] := Module[{blurredSt, firstPx,
  resArr},
  firstPx =
  ConstantArray[
10  Dimensions[st][[1]], {Dimensions[st][[2]], Dimensions[st]
  ][[3]]}];
  blurredSt =
  ConstantArray[
  0, {Dimensions[st][[1]], Dimensions[st][[2]],
  Dimensions[st][[3]]}];
15  resArr =
  ConstantArray[
  0, {Dimensions[st][[1]], Dimensions[st][[2]],
  Dimensions[st][[3]]}];
  (*Blur initial array to calculate first pixels of cardiac
  bundle*)

```



```

20 Do[blurredSt[[k]] = GaussianFilter[st[[k]], 10], {k,
    Dimensions[st][[1]]}];
Print@Dimensions@blurredSt;
(*Calculate First pixels*)
25 Do[Do[Do[
    If[blurredSt[[k, i, j]] >= 15,
        firstPx[[i, j]] = k + thk; Break[]], {k,
        Dimensions[st][[1]]}], {j, Dimensions[st][[3]]}], {i,
    Dimensions[st][[2]]}];
30 (*Calculate resultant array*)
Do[Do[Do[
    If[k >= firstPx[[i, j]],
        resArr[[k, i, j]] = st[[k, i, j]]*(1 + (k - firstPx[[i, j]
    ])/k1),
        resArr[[k, i, j]] = st[[k, i, j]]], {k,
35     Dimensions[st][[1]]}], {j, Dimensions[st][[3]]}], {i,
    Dimensions[st][[2]]}];

Export["stack_k_" <> ToString@k1 <> "_th_" <> ToString@thk <>
    ".tiff",
40 Table[Image[resArr[[k]], "Bit16"], {k,
    Dimensions[resArr][[1]]}]; {Image[
    Table[st[[k, row, ;;]], {k, 1, Dimensions[st][[1]]}], "Bit16
    "],
    Image[Table[resArr[[k, row, ;;]], {k, 1, Dimensions[resArr
    ][[1]]}],
        "Bit16"], ListPlot3D[firstPx]}
45 ]

```

Листинг А.2: Реализация алгоритма для построения карты активации на языке Wolfram Mathematica.

```

data = Import["video.tiff"];
imgs = ImageData[Threshold[GaussianFilter[#, 9], 0]] & /@
    data[;; ;; 1];
FirstReallyGrowing[x_] :=
5 Module[{c = x[[2 ;;]] - x[;; -2]], pos}, pos = Position[c, Max
    [c]];
    If[pos == {} || Max[c] < 0.025, 0, pos[[1, 1]]]
im = Colorize[

```

```
Table[FirstReallyGrowing[imgs[;; , i, j]], {i, 1, 1}, {j, 1,
  w}],
ColorFunction -> ColorData["ThermometerColors"]]
```

Листинг А.3: Код на языке Wolfram Mathematica для расчёта прохождения лучей через изогнутую полимерную мембрану на границе раздела вода/воздух.

```
Refr2::usage = "This function calculates refraction angle. The
  resulting angle is measured from the x axis";
Refr2[x0_, a0_] :=
Module[{x = x0, a = a0*Pi/180, b, g}, g = ArcTan[f2'[x]];
  b = If[a + g < ArcSin[1/1.4], Pi/2 - ArcSin[1.4*Sin[a + g]] +
  5   g,
  3 Pi/2 + a + 2 g]; b]
step = Pi/100;
shift = -0.17;
a = 15; (*angle*)
thk = 0.001; (*thickness*)
10 g1 =
Graphics[{Red, Thickness[thk],
  Table[HalfLine[{x0, f2[x0]},
    Which[0 < Refr2[x0, a] < Pi/2, {1, Abs@Tan[Refr2[x0, a]}],
    0 == Refr2[x0, a], {0, 1},
  15   Pi/2 < Refr2[x0, a] < Pi, {-1, Abs@Tan[Refr2[x0, a]}],
    3 Pi/2 < Refr2[x0, a] <
    5 Pi/2, {1, -Abs@Tan[-Pi + Refr2[x0, a]}]}], {x0, -3 Pi/2
  +
  shift, 3 Pi/2, step}}], Frame -> True];
g2 = Graphics[{Orange, Thickness[thk],
20   Table[HalfLine[{x0,
  f2[x0]}, {-1, -Tan[Pi/2 - a*Pi/180]}], {x0, -3 Pi/2 +
  shift,
  3 Pi/2, step}}]];
g3 = Plot[{f2[x]}, {x, -3 Pi/2, 3 Pi/2},
  PlotStyle -> {Thickness[thk]}, Filling -> Bottom];
25 Show[g1, g2, g3, PlotRange -> {{-4, 4}, {-1, 3.5}}, ImageSize ->
  1300]
```

Листинг А.4: Исходный код плагина для управление XY столиков на языке Java для программы uManager Imagej

```
package ru.mipt;

import mmcorej.CMMCore;
5 import org.micromanager.api.MMPlugin;
import org.micromanager.api.ScriptInterface;
import javax.swing.JOptionPane;
import mmcorej.StrVector;

10 /**
 *
 * @author Victor Balashov
 */
public class stageManipulator implements MMPlugin {
15
    private CMMCore core_;
    private stageManipulatorDialog dialog_;

    @Override
20 public void dispose() {

    }

    @Override
25 public void setApp(ScriptInterface si) {
        core_ = si.getMMCore();
    }

    @Override
30 public void show() {
        if (null == dialog_) {
            dialog_ = new stageManipulatorDialog(this);
            dialog_.setVisible(true);
35         } else {
            dialog_.setPlugin(this);
            dialog_.ToFront();
        }
    }
40
    @Override
```

```
public String getDescription() {
    return "Stage manipulating plugin";
}

@Override
public String getInfo() {
    return "Stage manipulating plugin";
}

@Override
public String getVersion() {
    return "1.0 alpha";
}

@Override
public String getCopyright() {
    return " ";
}

public void setXYPosition(double x, double y) {
    try {
        core_.setXYPosition(x, y);
    }
    catch (Exception e) {
        System.out.println(e.getMessage());
    }
}

public void setXPosition(double x) {
    try {
        core_.setPosition("X", x);
    }
    catch (Exception e) {
        System.out.println(e.getMessage());
    }
}
```

Листинг А.5: Исходный код плагина для управление XY столиков на языке Java для программы uManager Imagej

/\*

```

5  * To change this license header, choose License Headers in
   * Project Properties.
   * To change this template file, choose Tools | Templates
   * and open the template in the editor.
   */
package ru.mipt;

import javax.swing.JOptionPane;
import java.util.logging.Level;
10 import java.util.logging.Logger;

/**
 *
 * @author VA
15 */
public class stageManipulatorDialog extends javax.swing.JFrame {

    private stageManipulator plugin;
    private Thread moveStageThread;

20
    private double r; //Glass radius [mm]
    private double dy; //Line spacing [um]

    private double xInit; //X initial
25 private double yInit = 0; //Y initial
    private double yFin = 0;

    private double xLow; //X in retrace position
30 private double yLow;

    /**
     * Start
35     * @param evt
     */
    private void jButton1ActionPerformed(java.awt.event.
ActionEvent evt) {//GEN-FIRST:event_jButton1ActionPerformed

        r = Double.parseDouble(jTextField1.getText()) * 1000 /
40 2;
        dy = Double.parseDouble(jTextField2.getText());

```

```

        xInit = r + 4000;

        if (yInit == 0 && yFin == 0) {
45             yInit = -r + 1000;
                yFin = r + 1000;
                jTextField3.setText(yInit + " ");
                jTextField4.setText(yFin + " ");
        }

50         xLow = r + 4000;
        yLow = -r - 4000;

        moveStageThread = new Thread(new moveStage(plugin, xInit
, yInit, yFin, dy, xLow, yLow));
55         moveStageThread.start();
    } //GEN-LAST:event_jButton1ActionPerformed

    /**
     * Stop
60     * @param evt
     */
    private void jButton2ActionPerformed(java.awt.event.
ActionEvent evt) { //GEN-FIRST:event_jButton2ActionPerformed
        moveStageThread.stop();
    } //GEN-LAST:event_jButton2ActionPerformed

65     /**
     * Got to zero position
     * @param evt
     */
70     private void jButton3ActionPerformed(java.awt.event.
ActionEvent evt) { //GEN-FIRST:event_jButton3ActionPerformed
        plugin.setXYPosition(0, 0);
        updateLabels();
    } //GEN-LAST:event_jButton3ActionPerformed

75     /**
     * Go to initial position
     * @param evt
     */

```