

ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПЕЙСМЕЙКЕРА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СОВРЕМЕННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

С.А. Байрамова¹, А.Г. Стрельников¹, А.Б. Романов¹, А.А. Якубов¹, Д.В. Лосик¹,
С.В. Павлова², К.И. Агладзе³, Е.А. Покушалов¹

¹ Сибирский федеральный биомедицинский исследовательский центр им. академика Е.Н. Мешалкина, Новосибирск, Россия

² Федеральный исследовательский центр институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

³ Московский физико-технический институт (государственный университет), Москва, Россия

The prospects of creating a pacemaker cardiac tissue using modern technologies

S.A. Bayramova¹, A.G. Strelnikov¹, A.B. Romanov¹, A.A. Yakubov¹, D.V. Losik¹, S.V. Pavlova²,
K.I. Agladze³, E.A. Pokushalov¹

¹ E.N. Meshalkin Siberian Federal Biomedical Research Center, Novosibirsk, Russia

² Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the RAS, Novosibirsk, Russia

³ Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Moscow, Russia

В настоящее время существует множество имплантируемых электрокардиостимулирующих систем, способных замещать функцию физиологических пейсмейкеров (синусового и атриовентрикулярного узлов). Данные системы на сегодняшний день имеют ряд ограничений и являются несовершенными, т.к. они требуют постоянного мониторинга и обслуживания в связи с ограниченным сроком службы батареи; существуют риски инфицирования системы кардиостимуляции, которые могут привести к необходимости реимплантации водителя ритма; имплантируемые устройства порой несовместимы с другими электрическими приборами (металлодетекторами и магнитами, магнитно-резонансными томографами, линиями электропередач), которые могут влиять на работу электрокардиостимуляторов; электроды не всегда удается расположить физиологично, что в свою очередь может привести к развитию сердечной недостаточности и дополнительным симптомам, ухудшающим качество жизни пациента. Данная статья посвящена обзору методов создания биологических пейсмейкеров, рассмотрению достоинств и недостатков имеющихся современных стратегий получения пейсмейкерной ткани, которые базируются на использовании ключевых генов-модификаторов, регулирующих эмбриональное развитие вентрикулярных, атриальных и пейсмейкерных кардиомиоцитов. Наряду с этим, показано, что технологии получения индуцированных пациент специфических плюрипотентных клеток (ИПСК) и последующее развитие протоколов направленной дифференцировки в кардиальном направлении открывают новые подходы для разработки биологических пейсмейкеров. Эта стратегия заключается в получении и трансплантации пациент специфических пейсмейкерных кардиомиоцитов. Также кратко описаны перспективы использования современных материалов для развития тканевой инженерии.

Ключевые слова: атрио-вентрикулярная блокада, проводящая система сердца, синусовый узел, биологический пейсмейкер, генная терапия, электрокардиостимулятор, ионные каналы, клеточная терапия, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, тканевая инженерия.

Введение

Более двух тысяч лет назад китайский врач Рен Ч'ю впервые описал изменения, происходящие при полной атрио-вентрикулярной блокаде, как разрушительная и неизлечимая аритмия. Позже итальянский исследователь Д.Б. Морганьи описал состояние, которое стало называться приступом Морганьи-Адамса-Стокса и в XIX в., независимо друг от друга ирландцы Роберт Адамс (1827) [1] и Уильям

At the present time there are a lot of implantable pacemakers, which are able to replace the function of physiological pacemakers (sinoatrial and atrioventricular nodes). These systems are currently imperfect and have a number of limitations. They require constant monitoring and maintenance due to limited battery life. There are risks of infection of pacemakers system, which may cause a pacemaker reimplantation. Implantable devices are often incompatible with other electric devices (metal detectors and magnets in MRI scanners, as well as power lines), which may affect the operation of pacemakers. Sometimes the electrodes can not be physiologically positioned, which may lead to heart failure and additional symptoms worsen the patient's quality of life. This article is devoted to a review of methods for creating biological pacemakers, considering advantages and disadvantages of the available modern strategies for obtaining pacemaker tissue, which is based on the using of key modifier genes regulating the embryonic development of ventricular, atrial and pacemaker cardiomyocytes. Furthermore the technologies for creating induced patient specific pluripotent cells (IPSC) and the subsequent development of directional differentiation protocols in the cardiac direction discover new approaches for the development of biological pacemakers. Also briefly described the prospects for using modern materials for the development of tissue engineering.

Keywords: atrioventricular block, cardiac conduction system, sinus node, biological pacemaker, gene therapy, cardiac pacing, ion channels, cell therapy, induced pluripotent stem cells, tissue engineering.

Стокс (1846) [2], детально описывали симптомы, имеющиеся у данных пациентов. Однако лечение этого заболевания не имело успеха, ввиду существовавшей на тот момент ограниченной информации о структуре и функционировании проводящей системы человеческого сердца. Структура и механизм функционирования синусового узла как главного водителя ритма были раскрыты лишь в начале XX в. А. Keith и М. Flack (1907) [3] и исследователем

Т. Lewisc соавт. (1910) [4]. Понимание механизма проведения импульса в атрио-вентрикулярном соединении было заложено в работах W. His в 1893 г. [5] и S. Tawara с соавт. в 1906 г. [6]. По мере понимания работы синусового и атрио-вентрикулярного узлов млекопитающих развивались и методы электрической кардиостимуляции. Полагают, что первым исследователем, стимулировавшим сердце млекопитающих был J.A. McWilliam (1889) [7]. Современная эра в кардиостимуляции была открыта независимо друг от друга A. Horpss (1950) с соавт. [8] и P.M. Zoll (1952) [9], чьи устройства были использованы в 1950-е годы для чрескожной кардиостимуляции. Первые имплантируемые водители ритма осуществляли стимуляцию с фиксированной частотой и имели большие размеры, однако они спасали жизни. И только в 1957 г. E.E. Vakken изготовил первый портативный внешний кардиостимулятор. К 1970-м годам батареи, электроды и программное обеспечение кардиостимуляторов были значительно улучшены в сравнении с первичной моделью устройства [10, 11].

В наше время мы, казалось бы, практически достигли совершенства в эре кардиостимуляции: последовательная предсердно-желудочковая стимуляция, благодаря которой сохраняется синхронное сокращение предсердий и желудочков у пациентов с нормальным синусовым узлом, но имеющих атрио-вентрикулярную блокаду; коронарный синус, позволяющий иметь доступ к перикардиальным венам для бивентрикулярной стимуляции у пациентов с сердечной недостаточностью [12]; кардиовертеры-дефибрилляторы, детектирующие жизнеугрожающие аритмии, при которых они воздействуют с помощью электрического шока и производят стимуляцию для спасения жизни при злокачественных желудочковых нарушениях ритма. Существуют программы, адаптирующие частоту сердечных сокращений под физическую активность пациента [13], безэлектродные кардиостимуляторы, позволяющие осуществлять стимуляцию без использования катетеров. Среди такого разнообразия функций и разновидностей кардиостимуляторов, невольно возникает вопрос: имеем ли мы в настоящее время реальные проблемы с системой электрической кардиостимуляции и есть ли необходимость в создании более совершенных систем? И ответ на этот вопрос положительный. Несмотря на совершенствование системы электрической кардиостимуляции, на сегодняшний день она имеет ряд ограничений: 1) невосприимчивость к вегетативной нервной системе (потребностям при физической и эмоциональной нагрузкам), т.е. в настоящее время адекватной замены автономной нервной системы не создано [14]; 2) потребность в мониторинге и обслуживании системы кардиостимуляции из-за ограниченного срока службы батареи кардиостимулятора и необходимости замены электродов; 3) риск инфицирования системы кардиостимуляции, в результате которого требуется имплантация нового водителя ритма; 4) помехи, создаваемые другими электрическими приборами (металлодетекторами и магнитами МРТ-томографов, а также линиями электропередач), которые могут влиять на работу электрокардиостимуляторов; 5) риск развития сердечной недостаточности в результате верхушечной правожелудочковой стимуляции: несмотря на имеющиеся доступы к эпикарду и эндокарду, для имплантации электрода необходимо выбрать оптимальную

позицию, при которой электрод имел бы стабильную фиксацию и хорошие электрофизиологические параметры; 6) педиатрические проблемы, связанные с необходимостью адаптации системы кардиостимуляции к росту и развитию ребенка [15, 16].

Даже несмотря на значительный прогресс в области конструирования устройств для кардиостимуляции, в настоящее время данные недостатки системы кардиостимуляции всё еще не решены, в связи с чем, встает вопрос о создании альтернативных средств стимуляции, таких как биологические пейсмейкеры. Требования, предъявляемые к альтернативным методам стимуляции, состоят в следующем: 1) они должны быть конкурентоспособны по отношению к традиционным электрокардиостимуляторам, т.е. в идеальных условиях не иметь батареи питания, не иметь электродов, которые необходимо было бы имплантировать в организм, не требовать замены, и не только создавать физиологичный стабильный ритм в течение жизни, но и обеспечивать адекватный ответ изменениям автономной нервной системы (в результате физической и эмоциональной нагрузок); 2) они не должны создавать риска инфицирования; 3) должна быть возможность их имплантации в тот участок миокарда, в котором была бы оптимизирована желудочковая активация, такая как сократительная способность и сердечный выброс; 4) они не должны обладать проаритмогенным и неопластическими эффектами [17, 18]. Иными словами, они должны давать лечебный, а не паллиативный эффект.

Принимая во внимание все изложенные факты, данными свойствами могут обладать биологические пейсмейкеры, не имеющие ни батареи питания, ни электродов, ни программного обеспечения.

Молекулярные и электрофизиологические характеристики кардиальных пейсмейкеров синоатриального узла

Структурой, служащей образцом создания биопейсмейкера, является синусовый узел, функцию и физиологию которого мы пытаемся воспроизвести. Основная функция кардиальных пейсмейкерных клеток заключается в автоматическом и циклическом генерировании потенциалов действия, которые передаются атриальным и вентрикулярным кардиомиоцитам и вызывают их электрическое возбуждение и механическое сокращение. Потенциал действия — это изменение заряда внутренней поверхности мембраны, который можно представить в виде графика зависимости величины заряда внутренней стороны мембраны от времени (рис. 1). Пики на графиках соответствуют фазе сокращения или систоле, участки между пиками — диастоле. На стадии деполяризации происходит повышение заряда мембраны кардиомиоцита, реполяризации — снижение заряда мембраны. Снижение заряда ниже порогового уровня соответствует гиперполяризации внутренней поверхности мембраны.

У пейсмейкерных кардиомиоцитов существует очень важная стадия формирования потенциала действия — диастолическая деполяризация мембраны (рис. 1). Именно в этот период происходят основные события, необходимые для формирования периодического самопроизвольного возбуждения пейсмейкера. «Пороговое» значение заряда мембраны пейсмейкера при реполяризации составляет примерно

-50 мВ и далее происходит гиперполяризация мембраны до -60 мВ (-70 мВ у человека), в результате чего активируются специфические ионные каналы HCN4 (hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 4), которые вызывают раннюю стадию диастолической деполяризации мембраны за счет поступления ионов натрия внутрь клетки. Поток ионов через канал HCN4 называют пейсмейкерный или «funny» ток (I_f). На стадии поздней диастолической деполяризации увеличение заряда мембраны до порогового уровня происходит в результате поступления ионов кальция внутрь клетки через каналы Т-типа (которые характерны для пейсмейкерных клеток, I_{CaT} ток) и активации каналов натриево-кальциевого обмена NCX (Na^+/Ca^{2+} exchanger I_{NCX}). Через эти каналы происходит удаление одного иона Ca^{2+} из клетки и введение трех ионов Na^+ , за счет которых и увеличивается заряд на внутренней поверхности мембраны. При достижении порогового уровня заряда мембраны около -50 мВ закрываются кальциевые каналы Т-типа и включаются каналы L-типа (I_{CaL} ток), которые способствуют более интенсивному перемещению ионов Ca^{2+} в клетку, деполяризации мембраны и формированию потенциала действия (рис. 1).

Механизм диастолической деполяризации мембраны за счет специфических потенциал-зависимых каналов наружной мембраны является ключевым для самопроизвольной генерации потенциала действия пейсмейкерными клетками. Также, помимо «мембранного» механизма автоматии или «M-часов»,

существует внутреклеточный механизм осцилляции ионов кальция из саркоплазматического ретикулума или «кальциевые часы» (рис. 1). Механизм Ca^{2+} -часов работает на стадии поздней диастолической деполяризации и заключается в циклических выбросах небольших порций ионов кальция из саркоплазматического ретикулума (LCR, local calcium release), которые активируют поступление ионов натрия извне, через NCX каналы, вызывая деполяризацию мембраны. Повышение концентрации ионов кальция в цитоплазме при активации каналов L-типа стимулирует массивный выброс внутриклеточного запаса ионов кальция из цитоплазматического ретикулума (CICR, calcium-induced calcium release) через каналы RyR2 (Ryanodine receptor 2), который необходим для работы сократительного аппарата кардиомиоцита. Реабсорбция ионов кальция в цистерны саркоплазматического ретикулума происходит за счет АТФ зависимого насоса SERCA (Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase [19-23]).

Частота генерации потенциала действия пейсмейкерной клетки регулируется симпатической и парасимпатической нервными системами путем сокращения или удлинения фазы диастолической деполяризации соответственно. Медиаторы симпатической нервной системы эпинефрин и норэпинефрин связываются с β -рецепторами и активируют аденилатциклазу, которая конвертирует АТФ в цАМФ. Молекулы цАМФ активируют работу каналов HCN4, увеличивая входящий ток ионов натрия. Также цАМФ

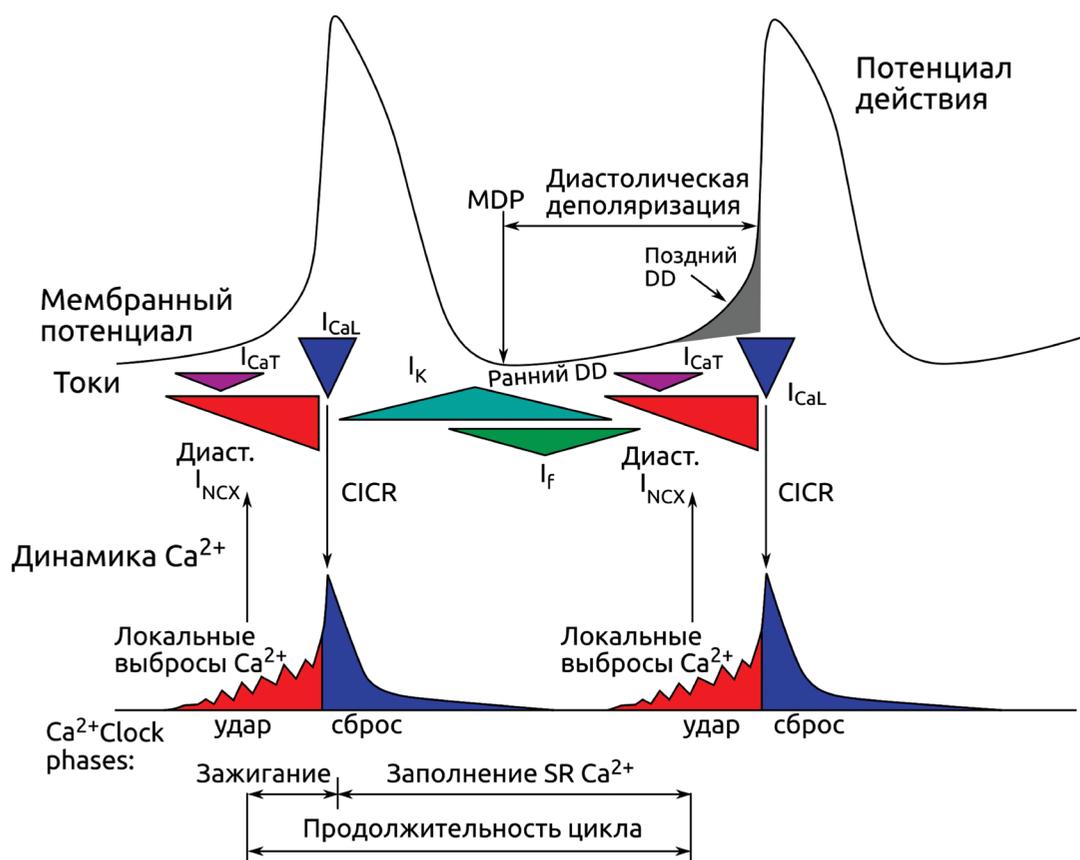


Рис. 1. Формирования потенциала действия пейсмейкерных кардиомиоцитов.

На схеме отражено взаимодействие мембранного и кальциевого механизмов формирования фазы диастолической деполяризации мембраны (по [19] с изм.): MDP – минимальный диастолический потенциал; DD – диастолическая деполяризация; CICR – кальций-индуцированное высвобождение кальция (calcium-induced calcium release); SR – саркоплазматический ретикулум; Ca^{2+} -clock – механизм «кальциевых часов» автоматии

активирует протеинкиназу А, которая фосфорилирует определенные белки, что приводит к увеличению поступления ионов кальция через L-каналы, активации RYR2 и SERCA и усилению осцилляции ионов кальция между саркоплазматическим ретикуломом и цитоплазмой. В результате уменьшается период диастолической поляризации и увеличивается частота генерирования потенциала действия за счет взаимосвязанных процессов регуляции «мембранных» и «кальциевых» механизмов. Медиатор парасимпатической системы ацетилхолин связывается с мускариновым рецептором и инактивирует аденилатциклазу, вызывая обратные эффекты, которые приводят к снижению частоты генерирования потенциала действия [20].

Несмотря на интенсивные исследования пейсмейкерных клеток, окончательный механизм циклического автоматического генерирования потенциала действия неясен. Например, HCN4 каналы отсутствуют у спонтанно сокращающихся неонатальных кардиомиоцитов или присутствуют лишь в 1–10% кардиомиоцитов, полученных в результате дифференцировки плюрипотентных клеток (ПК). При изучении неонатальных и дифференцированных из ПК кардиомиоцитов было показано, что митохондрии также участвуют в обмене ионов кальция с цитоплазмой, что на стадии диастолической деполяризации является критичным для достижения порогового уровня ионов в цитоплазме, запускающих процесс CICR из саркоплазматического ретикула и сокращения [22–24]. Возникает вопрос — могут ли спонтанно сокращающиеся незрелые кардиомиоциты, полученные путем дифференцировки ПК, быть «биологическим пейсмейкером»? Скорее всего, нет. Дело в том, что пороговое значение мембранного потенциала кардиомиоцитов, дифференцированных из ПК, составляет около -35 мВ, что значительно облегчает генерирование спонтанного потенциала действия *in vitro*. Однако при интеграции в миокард они будут находиться в контакте с клетками, мембранный потенциал которых составляет -90 мВ. В отсутствие гиперполяризационно активирующихся каналов HCN4, их мембранный потенциал выровняется, и клетки не смогут спонтанно генерировать потенциал действия. Т.е. каналы HCN4 выполняют функцию электрического инсультатора и позволяют мембранному потенциалу пейсмейкерной клетки оставаться в пределах, необходимых для инициации деполяризации мембраны и формированию потенциала действия [25].

Таким образом, идеальным биологическим пейсмейкером может быть клетка, которая способна к диастолической деполяризации мембраны. Основным медиатором этого процесса будут ионы Ca^{2+} , которые поступают через наружную мембрану (M-механизм), или из саркоплазматического ретикула (кальциевый механизм) и митохондрий. Ионы Ca^{2+} запускают каналы кальций-натриевого обмена NCX, вызывающих деполяризацию мембраны. Биологический пейсмейкер должен регулировать скорость процесса диастолической деполяризации в ответ на действия вегетативной нервной системы. В мембране потенциального пейсмейкера должны присутствовать каналы HCN4, активирующиеся при гиперполяризации мембраны, которые будут служить электрическим инсультатором, защищающим от электроотрицательного влияния соседства сократительных кардиомиоцитов. Для распространения потенциала действия

от пейсмейкера к сократительным кардиомиоцитам, в мембране должны присутствовать специфические коннексины — белки межклеточного взаимодействия [21, 25].

Создание биологического пейсмейкера с использованием методов генетической инженерии

Первые попытки создать пейсмейкер из зрелых сократительных кардиомиоцитов заключались в модуляции мембранных ионных токов путем внесения дополнительной копии гена *HCN4*, ответственного за пейсмейкерный ток I_h [26], или внесения мутантного гена *Kir2* для уменьшения реполяризующего тока I_r [27]. Также было изучено влияние симпатической нервной системы на сократительные кардиомиоциты с дополнительной копией β -адренергического рецептора (β_2 AR) [28]. В результате этих экспериментов определенные изменения в физиологии химерных кардиомиоцитов были выявлены, однако модификаций клеток на уровне мембранных каналов оказалось недостаточно для формирования всего комплекса пейсмейкерных свойств.

Современная стратегия разработки биологического пейсмейкера базируется на использовании ключевых генов-модификаторов, регулирующих эмбриональное развитие вентрикулярных, атриальных и пейсмейкерных кардиомиоцитов. Известно, что миокард желудочков сердца развивается из клеток первичного кардиального поля, миокард предсердий — из клеток первичного и вторичного кардиальных полей, экспрессирующих ключевой транскрипционный фактор *Nkx2.5*, запускающий программу формирования сократительных кардиомиоцитов.

Синоатриальный узел (SAN), прилегающий миокард предсердия и венозный синус дифференцируются *de novo* из мезенхимальных предшественников каудально вентролатеральной части входящего тракта (начиная с E9–E9.5 дня развития у мыши), экспрессирующих транскрипционный фактор *Tbx18*. Из этих клеток формируются полые вены, миокард правого предсердия и SAN (рис. 2А). Пейсмейкерные кардиомиоциты развиваются из клеток «линии» *Tbx18*, в которых экспрессируется транскрипционный фактор *Shox2*. Фактор *Shox2* активирует комплекс генов (в том числе, *Isl1* и *Tbx3*), которые регулируют синтез белков HCN4 каналов, T-каналов, белков межклеточного взаимодействия коннексинов *Cx30.2* и т.д., обеспечивающих генерирование и распространение потенциала действия [29–33] (рис. 2Б).

Таким образом, основными «мишенями» генной терапии для перепрограммирования вентрикулярных кардиомиоцитов в пейсмейкерные являются гены транскрипционных факторов *Tbx18*, *Tbx5*, *Shox2*, *Tbx3* и каналов *HCN4*. Влияние сверхэкспрессии этих генов на появление пейсмейкерных свойств изучали на неонатальных кардиомиоцитах электрофизиологическими и молекулярными методами [34–37]. Было показано, что эктопически активный *Tbx3* фактор не способствует формированию раннего деполяризующего тока I_h , но влияет на кальциевый механизм автоматии — частота спонтанных сокращений неонатальных кардиомиоцитов увеличилась. Эктопическая экспрессия гена *Tbx3*, запускаемая в зрелых кардиомиоцитах тамоксифеном в трансгенных мышцах, изменяла профиль экспрессии генов в направлении, характерном для пейсмейкеров,

однако приводила к замедлению частоты сердечных сокращений, что авторы объясняют нарушением контактных взаимодействий между модифицированными кардиомиоцитами [38].

Другая группа исследователей изучала способность перепрограммировать к пейсмейкерному состоянию неонатальные кардиомиоциты крысы при помощи сверхактивации гена *Tbx18*. Авторы показали, что в результате действия фактора *Tbx18* в неонатальных кардиомиоцитах происходят изменения на транскрипционном, эпигенетическом и электрофизиологическом уровнях — активируется мембранный (регистрируется деполяризующий ток I_f) и Ca_{2+} механизма в томатии. В экспериментах *in vivo* трансдукция кардиомиоцитов морской свинки аденовирусами, содержащими ген *Tbx18*, вызывала эктопиче-

скую пейсмейкерную активность [34]. В дальнейших экспериментах на модели свиньи с полной блокадой сердца, эктопическая электрическая активность в результате действия *Tbx18*-индуцированных пейсмейкеров поддерживала деятельность сердца в течение двух недель [39]. Однако, другая группа исследователей не смогла обнаружить эктопическую электрическую активность при сверхактивации гена *Tbx18* в сократительных кардиомиоцитах эмбриональных мышей. Хотя авторы наблюдали общее снижение активности генов, отвечающих за развитие сократительных кардиомиоцитов, экспрессия генов, кодирующих белки HNC каналов, не индуцировалась [36]. Таким образом, несмотря на успешное перепрограммирование с помощью индуцированной экспрессии гена *Tbx18* сократительных кардиомиоцитов

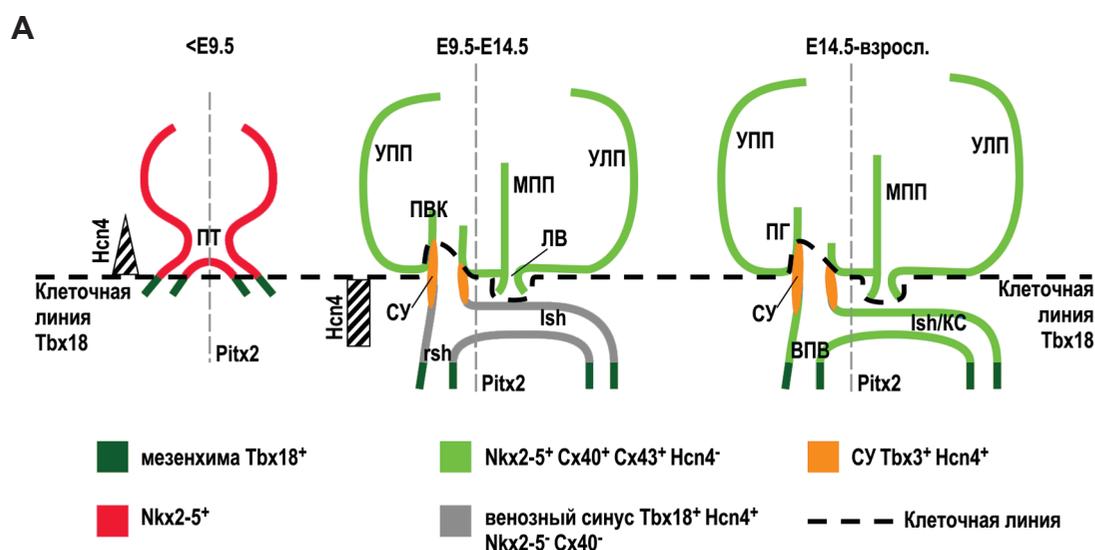


Рис. 2А. Развитие венозного синуса и синусового узла. Профиль экспрессии генов и клеточных линий в эмбриональном развитии до E9.5 (слева), между E9.5 и E14.5 (в середине) и после E14.5 (справа). Тонкая пунктирная линия представляет границу области клеток, экспрессирующих *Pitx2*с или их потомков; толстая пунктирная линия — граница клеток, экспрессирующих *Tbx18* или их потомков. Место локализации мезенхимальных клеток изображено темно-зеленым цветом, остальные цвета — миокард и сосуды. УЛП — ушко левого предсердия; ЛВ — легочная вена; УПП — ушко правого предсердия; ВК — венозные клапаны; ПГ — пограничный гребень; МПП — межпредсердная перегородка; ПВК — правый венозный клапан; SAN — синоатриальный узел; ВПВ — верхняя полая вена; Ish/KC — правый синусовый рог/коронарный синус; rsh — правый синусовый рог; ПТ — приносящий тракт (по [29] с изм.)

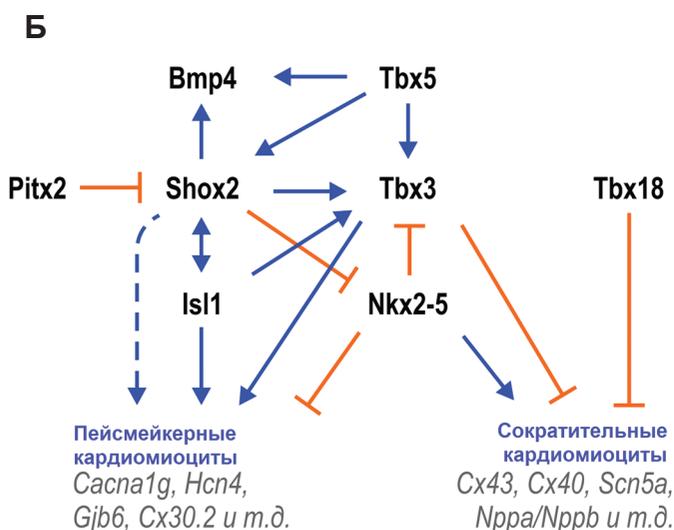


Рис. 2Б. Схема взаимодействия транскрипционных факторов при формировании пейсмейкерных и сократительных кардиомиоцитов. Фактор *Tbx18* блокирует гены, отвечающие за формирование сократительного миокарда; фактор *Pitx2* блокирует развитие пейсмейкерных кардиомиоцитов даже если в клетке присутствует *Tbx18* (по [33] с изм.)

свиньи в функционирующие пейсмейкерные клетки, регулирующие работу всего сердца, необходимы дальнейшие усилия по изучению «видоспецифических» последствий такого подхода в создании искусственного пейсмейкера, а также особое внимание следует уделить «тонкой настройке» программы развития кардиомиоцита. Например, показано, что транскрипционные факторы *Nkx2.5* и *Shox2* имеют общие сайты связывания с генами-мишенями, определяющими сократительную/пейсмейкерную программу развития клетки [40]. Взаимодействие *Nkx2.5* с мишенями приводит к «активации» программы развития сократительного кардиомиоцита, тогда как связывание фактора *Shox2* блокирует ее и развивается пейсмейкер [40,41].

Создание идеального биологического пейсмейкера: кардиальная дифференцировка плюрипотентных стволовых клеток

Технологии получения индуцированных пациент специфических плюрипотентных клеток (ИПСК) и последующее развитие протоколов направленной дифференцировки в кардиальном направлении открыли новые подходы для разработки биологических пейсмейкеров. Стратегия заключается в получении и трансплантации пациент специфических пейсмейкерных кардиомиоцитов, удовлетворяющих всем молекулярным (*Tbx3⁺*, *HCN4⁺*, *Sx30.2*) и электрофизиологическим показателям (наличие фазы диастолической деполяризации, наличие ионных каналов, активирующихся при гиперполяризации (If ток), функциональные межклеточные контакты). Для создания идеального биологического пейсмейкера следует решить, как минимум, две задачи: разработка эффективного протокола получения пейсмейкерных кардиомиоцитов и адекватной технологии трансплантации, при которой клетки будут хорошо интегрироваться, генерировать потенциал действия и контролировать работу сердца в ответ на нервные сигналы.

На данный момент существуют надежные и воспроизводимые протоколы получения кардиомиоцитов на основании последовательной активации и ингибирования WNT пути, однако доля клеток, относящихся к пейсмейкерам (*Tbx3⁺*, *HCN4⁺*) среди них составляет не более 1–10% [42,43]. Недавно было показано, что для дифференцировки ИПСК (ЭСК) человека в пейсмейкеры не нужно ингибировать WNT путь, а следует ингибировать *Activin/Nodal/TGFβ* и *bFGF* сигнальный путь в присутствии ретиноевой кислоты (активирует *Shox2* и *Tbx3* через *Tbx 5* [29]) и *BMP4* ростового фактора (увеличивает количество *Tbx18⁺* предшественников). При использовании такого протокола дифференцировки количество пейсмейкеров (*Tbx3⁺*, *HCN4⁺*) достигает 35% от всех кардиомиоцитов и их качество соответствует всем необходимым критериям на молекулярном и электрофизиологическом уровнях. Полученные клетки способны вызывать эктопическую пейсмейкерную активность при трансплантации в миокард крысы [44].

При разработке протоколов направленной дифференцировки в пейсмейкеры используют знания о развитии синоатриального узла в эмбриогенезе. Например, повысить долю пейсмейкерных кардиомиоцитов при дифференцировке ЭСК мыши до 60% удалось в результате трансдукции гена *Shox2* с по-

мощью стандартного протокола, и эти кардиомиоциты также обладали всеми необходимыми характеристиками [45]. Оригинальная модель биологического пейсмейкера была получена при кардиальной дифференцировке ЭСК мыши с конститутивной экспрессией копии гена *HNC4*. Созданные «химерные» клетки имели черты сократительных кардиомиоцитов и функциональные каналы *HNC4*, которые участвовали в образовании If тока. При сокультивировании, квази-пейсмейкерные кардиомиоциты мыши обладали способностью задавать ритм вентрикулярным кардиомиоцитам, дифференцированным из ИПСК человека [46].

Следует отметить, что дифференцированные из стволовых клеток кардиомиоциты скорее ближе по своим свойствам к эмбриональным или неонатальным кардиомиоцитам: они обладают собственным механизмом автоматии, вероятно, основанным на механизме Ca^{2+} -часов, или специфическими низкочастотными каналами [25, 47] и непонятно, как они поведут себя после трансплантации, интеграции и созревании в миокарде. Однако на определенном этапе развития технологии создания биологического пейсмейкера, эти клетки безусловно полезны.

Трансплантация дифференцированных из ПК пейсмейкеров в миокард — отдельная задача, которую еще только предстоит решить. Известно, что синоатриальный узел содержит всего лишь около 10 000 пейсмейкеров. Генерируемый потенциал действия распространяется в ткани предсердия непосредственно между сократительными кардиомиоцитами, без участия специализированных проводящих клеток. Т.е. для успешной работы биологического водителя ритма необходимо, чтобы трансплантированные пейсмейкеры корректно взаимодействовали между собой, а также с окружающими клетками «хозяина».

Идеальным вариантом будет создание *in vitro* «микроткани», в которой уже будут сформированы физиологические контакты пейсмейкерных клеток между собой. При проведении 3D кардиальной дифференцировки (в т.н. «бодиках») как раз и формируются такие естественные фрагменты «микроткани» [44, 46]. Для кардиомиоцитов, полученных при дифференцировке в монослое, необходимо формирование «микроткани» биологического пейсмейкера для последующей трансплантации в миокард.

Перспективы использования современных материалов для развития тканевой инженерии

Тканевая инженерия — это современный подход к формированию организованной функциональной клеточной системы *in vitro*. Современные технологии тканевой инженерии дают возможность получать орган-специфичные структуры для регенеративной медицины [48, 49], а также позволяют контролировать процесс дифференцировки группы клеток в единую структуру, с функциональными возможностями той ткани, которая требуется исследователю. Клетки «засеваются» в трехмерные матрицы скаффолдных материалов для формирования живых тканевых продуктов, имеющие определенную структуру и функциональные свойства. Стремительное развитие тканевой инженерии за последние годы создает потребность создания материалов, которые могут помочь в конструировании тканей. Более того, высокоспециализированные клетки, такие как кар-

диомиоциты, являются наиболее требовательными к специфическим материалам тканевой инженерии, ввиду необходимости обеспечения функционального электрофизиологического единства клеток.

Использование полимеров на сегодняшний день является наиболее перспективным направлением в тканевой инженерии, ввиду их биосовместимости, способности к биологической деградации, а также благодаря надежным механическим свойствам [50]. Учитывая имеющиеся данные, наши будущие исследования будут связаны с созданием пейсмейкерных клеток человека и разработкой технологий имплантации пейсмейкерных клеток путем применения полимерных нановолоконных матриц, что может послужить первым шагом к развитию кардиальных тканей, которые требуются для регенеративной терапии.

Заключение

Изучение процесса формирования автоматизируемых пейсмейкерных клеток в онтогенезе и эмбриогенезе показало, что это очень древняя и консервативная система, что выражается в высокой гомологии между ортологами ключевых генов, а также во взаимодействии факторов в эмбриогенезе. Таким образом, данные, полученные при изучении развития синоатриального узла у грызунов являются актуальными для человека и других млекопитающих. В теме разработки биологического пейсмейкера наиболее сильные акценты расставлены на получение клеток в результате направленной кардиальной дифференцировки индуцированных стволовых клеток с использованием ростовых факторов и активных низкомолекулярных соединений в соответствии с естественным ходом формирования пейсмейкерно-синоатриального узла в эмбриогенезе, либо попытке увеличить долю пейсмейкерных кардиомиоцитов, внося дополнительные копии гена *Shox2* и повышая

уровень транскрипционного фактора, который отвечает за программу развития пейсмейкера. Также отдельной темой исследований является модификация сократительных кардиомиоцитов в направлении «развития» пейсмейкерных свойств с помощью введения дополнительных копий генов *Tbx18* или *Hcn4*. Однако данные, полученные в этих экспериментальных работах либо являются неоднозначными, как в случае с трансдукцией гена *Tbx18* в сократительные кардиомиоциты, когда одна группа исследователей видела появление эктопической электрической активности на модели крысы, морской свинки и свиньи [34, 39], а другая группа исследователей не смогла повторить этот эксперимент на мышинной модели [36], либо не приводят к созданию всех необходимых компонентов для формирования и распространения потенциала действия, как в случае с трансдукцией дополнительной копии гена *Hcn4* эктопической экспрессии на «фоне» соматических клеток.

Развитие технологии получения биологических пейсмейкеров открывает достаточно широкие перспективы изучения генной и клеточной терапии, которые могут найти свое применение не только в кардиостимуляции, но и сопутствующих направлениях. За последние десятилетия были продемонстрированы достаточно интригующие результаты, протестированные на различных моделях. Результаты, базируемые на генных исследованиях, показали потенциальные преимущества биологического пейсмейкера по сравнению с электрической стимуляцией [51], но в будущем еще предстоит сделать достаточно много шагов для оптимизации постоянства функционирования данных клеток, методов их доставки и безопасности в долгосрочной перспективе.

Благодарности

Выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №16-15-10322).

ЛИТЕРАТУРА:

- Adams R. Cases of diseases of the heart, accompanied with pathological observations. Hosp.Rep., Dublin; 1827.
- Stokes W. Observations on some cases of permanently slow pulse. Dublin Q. J. Med. Sci., 1846; 2: 73-85.
- Keith A., Flack M. The form and nature of the muscular connections between the primary divisions of the vertebrate heart. J. Anat. Physiol., 1907; 41: 172-89.
- Lewis T., Oppenheimer B.S., Oppenheimer A. The site of origin of the mammalian heart-beat: the pacemaker in the dog. Heart 1910; 2: 147-69.
- His W. Die Tätigkeit des embryonalen Herzens und deren Bedeutung für die Lehre von der Herzbewegung beim Erwachsenen. Arb. Med. Klin. Leipzig 1893; 14-49.
- Tawara S., Fischer V. Das Reizleitungssystem des Säugetierherzens. Einatomisch pathologische Studie über das Atrioventrikulärbündel und die Purkinjeschen Fäden. Jena, Germany; 1906.
- McWilliam J.A. Electrical stimulation of the heart in man. Br. Med. J. 1889; 1: 348-50.
- Bigelow W.G., Callaghan J.C., Hopps J.A. General hypothermia for experimental intracardiac surgery: the use of electrophrenic respirations, an artificial pacemaker for cardiac standstill, and radio-frequency rewarming in general hypothermia. Transactions of the Meeting of the American Surgical Association 1950; 68: 211-9.
- Zoll P.M. Resuscitation of the heart in ventricular standstill by external electric stimulation. N. Engl. J. Med. 1952; 247(20): 768-71.
- Jeffrey K. The invention and reinvention of cardiac pacing. Cardiol. Clin. 1992; 10: 561-71.
- Lidwell M.C. Cardiac disease in relation to anaesthesia. In: Proceedings of the Third Session of Australasian Medical Congress (British Medical Association); 1929 Sep 2-7; Sydney, Australia; 1929. p.160.
- Мареєв Ю.В. Модуляция сердечной сократимости в лечении пациентов с хронической сердечной недостаточностью. Патология кровообращения и кардиохирургия 2014; 18(4): 158-63.

- Alt E., Matula M., Theres H. et al. The basis for activity controlled rate variable cardiac pacemakers: an analysis of mechanical forces on the human body induced by exercise and environment. Pacing Clin. Electrophysiol. 1989; 12: 1667-80.
- Стрельников А.Г., Якубов А.А., Сергеевичев Д.С. и др. Метод эндокардиальной инъекции ботулотоксина в ганглионарные сплетения автономной нервной системы сердца в целях снижения уязвимости к фибрилляции предсердий. Патология кровообращения и кардиохирургия 2015; 19(4): 99-107.
- Rosen M.R. 15th annual Gordon K. Moe Lecture. Heart Rhythm 2005; 2(4): 418-28.
- Rosen M.R., Brink P.R., Cohen I.S. et al. Genes, stem cells and biological pacemakers. Cardiovasc. Res. 2004; 64(1): 12-23.
- Kashiwakura Y., Cho H.C., Barth A.S. et al. Gene transfer of a synthetic pacemaker channel into the heart: a novel strategy for biological pacing. Circulation 2006; 114(16): 1682-6.
- Kehat I., Khimovich L., Caspi O. et al. Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. Nat. Biotechnol. 2004; 22(10): 1282-9.
- Lakatta E.G., Maltsev V.A., Vinogradova T.M. A Coupled SYSTEM of intracellular Ca²⁺ clocks and surface membrane voltage clocks controls the timekeeping mechanism of the heart's pacemaker. Circ. Res. 2010; 106(4): 659-73.
- Yaniv Y., Ahmet I., Liu J. et al. Synchronization of sinoatrial node pacemaker cell clocks and its autonomic modulation impart complexity to heart beating intervals. Heart Rhythm 2014; 11(7): 1210-9.
- Yaniv Y., Lakatta E.G., Maltsev V.A. From two competing oscillators to one coupled-clock pacemaker cell system. Front. Physiol. 2015; 6(FEB): 1-8.
- Yaniv Y., Spurgeon H.A., Lyashkov A.E. et al. Crosstalk between mitochondrial and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ cycling modulates cardiac pacemaker cell automaticity. PLoS One 2012; 7(5): e37582.
- Maltsev V.A., Yaniv Y., Maltsev A.V. et al. Modern Perspectives on Numerical Modeling of Cardiac Pacemaker Cell. J. Pharmacol. Sci. 2014; 125(1): 6-38.

24. Zhang X.H., Wei H., Šarić T. et al. Regionally diverse mitochondrial calcium signaling regulates spontaneous pacing in developing cardiomyocytes. *Cell Calcium* 2015; 57(5-6): 321-36.
25. Morad M., Zhang X.N. Mechanisms of spontaneous pacing: SA-nodal cells, neonatal cardiomyocytes, and human Stem cell derived cardiomyocytes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2017; 1-29.
26. Qu J., Barbuti A., Protas L. et al. HCN2 overexpression in newborn and adult ventricular myocytes: distinct effects on gating and excitability. *Circ. Res.* 2001; 89(1): E8-14.
27. Miale J., Marban E., Nuss H.B. Functional role of inward rectifier current in heart probed by Kir2.1 overexpression and dominant-negative suppression. *J. Clin. Invest.* 2003; 111(10): 1529-36.
28. Edelberg J.M., Aird W.C., Rosenberg R.D. Enhancement of murine cardiac chronotropy by the molecular transfer of the human 2 adrenergic receptor cDNA. *J. Clin. Invest.* 1998; 101(2): 337-43.
29. Christoffels V.M., Smits G.J., Kispert A. et al. Development of the pacemaker tissues of the heart. *Circ. Res.* 2010; 106(2): 240-54.
30. Vedantham V. New Approaches to Biological Pacemakers: Links to Sinoatrial Node Development. *Trends Mol. Med.* 2015; 21(12): 749-61.
31. Ye W., Song Y., Huang Z. et al. Genetic regulation of sinoatrial node development and pacemaker program in the venous pole. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* 2015; 2(4): 282-98.
32. Burkhard S., Eif V., Garric L. et al. On the Evolution of the cardiac pacemaker. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* 2017; 4(2): 4.
33. Weerd J.H., Christoffels V.M. The formation and function of the cardiac conduction system. *Development* 2016; 143(2): 197-210.
34. Kapoor N., Liang W., Marbán E. et al. Direct conversion of quiescent cardiomyocytes to pacemaker cells by expression of Tbx18. *Nat. Biotechnol.* 2012; 31(1): 54-62.
35. Brand T. Tbx18 and the generation of a biological pacemaker. Are we there yet? *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2016; 97: 263-5.
36. Greulich F., Trowe M.O., Leffler A. et al. Misexpression of Tbx18 in cardiac chambers of fetal mice interferes with chamber-specific developmental programs but does not induce a pacemaker-like gene signature. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2016; 97: 140-9.
37. Yang M., Zhang G., Wang T. et al. TBX18 gene induces adipose-derived stem cells to differentiate into pacemaker-like cells in the myocardial microenvironment. *Int. J. Mol. Med.* 2016; 38(5): 1403-10.
38. Bakker M.L., Boink G.J., Boukens B.G. et al. T-box transcription factor TBX3 reprogrammes mature cardiac myocytes into pacemaker-like cells. *Cardiovasc. Res.* 2012; 94(3): 439-49.
39. Hu Y.F., Dawkins J.F., Cho H.C. et al. Biological pacemaker created by minimally invasive somatic reprogramming in pigs with complete heart block. *Sci. Transl. Med.* 2014; 6(245): 245-94.
40. Ye W., Wang J., Song Y. et al. A common Shox2-Nkx2-5 antagonistic mechanism primes the pacemaking cell fate in the pulmonary vein myocardium and sinoatrial node. *Development* 2015; 142: 2521-32.
41. Espinoza-Lewis R.A., Yu L., He F. et al. Shox2 is essential for the differentiation of cardiac pacemaker cells by repressing Nkx2-5. *Dev. Biol.* 2009; 327(2): 376-85.
42. Burridge P.W., Matsa E., Shukla P. et al. Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat. Methods* 2014; 11(8): 855-60.
43. LianXiaojun S.P., Bao X., Zilberter M. et al. Chemically defined albumin-free human cardiomyocyte generation. *Nat. Methods* 2015; 12(7): 595-6.
44. Protze S.I., Liu J., Nussinovitch U. et al. Sinoatrial node cardiomyocytes derived from human pluripotent cells function as a biological pacemaker. *Nat. Biotechnol.* 2017; 35(1): 55-68.
45. Ionta V., Liang W., Kim E. et al. SHOX2 overexpression favors differentiation of embryonic stem cells into cardiac pacemaker cells, improving biological pacing ability. *Stem Cell Reports* 2015; 4(1): 129-42.
46. Saito Y., Nakamura K., Yoshida M. et al. Enhancement of spontaneous activity by hcn4 overexpression in mouse embryonic stem cell-derived cardiomyocytes - a possible biological pacemaker. *PLoS One* 2015; 10(9): 1-16.
47. Du D.T.M., Hellen N., Kane C. et al. Action potential morphology of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes does not predict cardiac chamber specificity and is dependent on cell density. *Biophys. J.* 2015; 108(1): 1-4.
48. Isenberg W.J.Y. Building structure into engineered tissues. *Mater. Today* 2006; 12(9): 54-60.
49. Vacanti C.A. History of tissue engineering and a glimpse into its future. *Tissue Eng.* 2006; 12(5): 1137-42.
50. Orlova Y., Magome N., Liu L. et al. Electrospun nanofibers as a tool for architecture control in engineered cardiac tissue. *Biomaterials* 2011; 32(24): 5615-24.
51. Boink G.J., Christoffels V.M., Robinson R.B. et al. The past, present, and future of pacemaker therapies. *Trends Cardiovasc. Med.* 2015; 25(8): 661-73.

Поступила: 03.01.2017