

## ПРОБЛЕМА ПОЛУЧЕНИЯ КАРДИОМИОЦИТОВ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

**Н.Б. Бильдюг**

ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; [relapse@yandex.ru](mailto:relapse@yandex.ru)

На сегодняшний день известно большое количество методов дифференцировки различных клеток в кардиомиоциты. Однако существующие подходы и способы оценки их эффективности имеют целый ряд ограничений. В обзоре описаны основные направления исследований и проблемы, связанные с получением дифференцированных кардиомиоцитов *in vitro* и *in vivo* из различных клеток, включая эмбриональные стволовые клетки, стволовые клетки сердца, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки и фибробласты.

**Ключевые слова:** кардиомиоциты, методы дифференцировки, стволовые клетки, фибробласты.

Неспособность миокарда к самообновлению, обусловленная отсутствием пролиферации дифференцированных, функционально активных кардиомиоцитов (КМЦ), вызывает целый ряд проблем, которые в первую очередь связаны с вопросами регенерации. Кроме того, неспособность КМЦ к делению ограничивает возможность получения стабильной линии этих клеток для ее использования в качестве модели для проведения фундаментальных и прикладных исследований. В связи с этим большое количество исследований направлено на дифференцировку различных клеток в КМЦ для возможности получения неиссякаемого источника функционально активных клеток миокарда.

### **Методы дифференцировки КМЦ из стволовых клеток.**

Дифференцированные КМЦ получают *in vivo* и *in vitro* из различных стволовых клеток, включая эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК), мезенхимные стволовые клетки, эндотелиальные прогениторные клетки и стволовые клетки сердца (СКС). Наиболее часто в качестве источника дифференцированных КМЦ используют ЭСК. Давно известно, что КМЦ могут быть получены в результате спонтанной дифференцировки ЭСК при их культивировании в виде эмбриональных телец (1). Подобные методы ненаправленной дифференцировки КМЦ из ЭСК имитируют стадии нормального эмбрионального развития сердца и используются для

получения, в частности, мышинных и человеческих КМЦ (1, 2). Однако такой подход является малоэффективным и приводит к получению не более чем 1% КМЦ от общей клеточной популяции (2). Более эффективные методы получения КМЦ из стволовых клеток основаны на направленной дифференцировке. При разработке таких методов, как правило, учитываются факторы, влияющие на стадии эмбрионального развития сердца. В частности, в эмбриогенезе последовательные этапы дифференцировки КМЦ и других клеток сердца зависят от сигнальных путей Nodal, костного морфогенетического белка (BMP), пути Wnt/ $\beta$ -катенин, фактора роста фибробластов (3) и ретиноевой кислоты (4). Различные способы направленной дифференцировки стволовых клеток в КМЦ включают воздействие на сигнальные пути Nodal/активин и BMP4 (5) и Wnt/ $\beta$ -катенин (6, 7). Янгом с соавт. (8) был разработан более эффективный протокол дифференцировки человеческих ЭСК, включающий последовательную стимуляцию сигнальных путей Nodal/активин, BMP4 и Wnt по мере прохождения клетками определенных стадий дифференцировки. Такой метод приводил к получению примерно 40% КМЦ от общей клеточной популяции. Несмотря на определенные успехи в получении КМЦ из ЭСК, эффективность таких методов варьирует от линии к линии. Кроме того, в случае применения дифференцированных клеток в регенеративных целях *in vivo* ограничением для использования КМЦ, полученных из ЭСК, является их аллогенное происхождение, а также выраженная геномная нестабильность (9).

Другим методом, получившим широкое распространение, является дифференцировка КМЦ из иПСК. иПСК получают путем индукции плюрипотентного состояния у зрелых соматических клеток млекопитающих с помощью набора транскрипционных факторов. иПСК впервые были описаны в 2006 г., когда группе Яманаки (10) удалось превратить фибробласты взрослых мышей в иПСК путем ретровирусного введения в клетки набора транскрипционных факторов Oct4, Sox2, c-Myc и Klf4 (известных как факторы Яманаки). иПСК по своей морфологии и экспрессии генов сходны с ЭСК, включая экспрессию маркеров плюрипотентности и способность дифференцироваться в зародышевые листки (10, 11). Различными исследователями было показано, что иПСК можно дифференцировать в КМЦ, при этом свойства полученных клеток сравнимы с характеристиками КМЦ, полученных из ЭСК (12). Для повышения эффективности направленной дифференцировки иПСК в КМЦ используют различные цитокины, ростовые факторы и низкомолекулярные соединения, влияющие на сигнальные пути, важные в ходе развития сердца (13). Такие соединения включают

аскорбиновую кислоту (14), ретиноевую кислоту (15), плюрипотин (16), 5-азацитидин (17) и ДМСО (18).

Некоторые исследователи считают более перспективным использование стволовых клеток сердца (СКС), которые считаются эндогенными предшественниками КМЦ. Эти клетки идентифицируют по наличию различных маркеров клеточной поверхности, таких как c-kit, MDR, NKX2.5, CD195 и SCA-1 (19-21). Было описано, что СКС могут дифференцироваться во все типы клеток сердечной ткани и самообновляться. СКС являются клоногенными и мультипотентными, а также экспрессируют антигены стволовых клеток и прогениторных клеток эндотелия (22). Несмотря на отсутствие доказательств роли эндогенных СКС в нормальном гомеостазе или при восстановлении сердца после повреждения, существуют данные, описывающие возможность дифференцировки выделенных СКС *in vitro* и восстановления функции сердца при их трансплантации в зону повреждения (23). На сегодняшний день наиболее эффективной считается дифференцировка СКС в кардиосферах, представляющих собой трехмерные клеточные агрегаты (24, 25). Некоторые дифференцированные *in vitro* клетки экспрессируют ранние маркеры кардиомиоцитарной дифференцировки, такие как GATA-4 и MEF2C (25). Однако сами авторы, как правило, признают, что положительный эффект СКС на функциональное состояние сердца при их трансплантации *in vivo* в основном обусловлен паракринным воздействием секретируемых ими факторов (24).

#### **Получение КМЦ из фибробластов.**

Огромное значение имели работы, показавшие возможность превращения фибробластов млекопитающих в функционально активные зрелые клетки различных типов (26-28). Метод получения КМЦ из соматических клеток включает несколько подходов, первый из которых связан с индукцией повышенной экспрессии транскрипционных факторов, характерных для КМЦ. В 2010 году Йеда с соавт. (26) показали, что введение транскрипционных факторов Gata4, Mefc2 и Tbx5 (GMT) с помощью ретровирусов в сердечные и дермальные фибробласты мышей приводило к превращению 20% клеток в индуцированные КМЦ-подобные клетки (иКМЦ), при этом уже через 3 дня культивирования наблюдалась экспрессия специфичных для КМЦ белков (26, 29). Сходные результаты были получены другими авторами при использовании подобных наборов перепрограммирующих факторов (30, 31). В полученных с помощью таких методов клетках наблюдалась активация генов тяжелой цепи

сердечного  $\alpha$ -миозина ( $\alpha$ MHC) и сердечного тропонина T ( $cTnT1$ ), а также повышенная экспрессия генов других кардиоспецифичных белков, таких как сердечный  $\alpha$ -актин и  $\alpha$ -актинин-2. Доля клеток с активированным промотором  $\alpha$ MHC составляла 20% от общей популяции фибробластов, а доля клеток, экспрессирующих  $cTnT$ , составляла всего 6 % (26). У большинства клеток с активным  $\alpha$ MHC выявлялись саркомерные структуры, содержащие  $\alpha$ -актинин. При этом большинство иКМЦ авторы описывают как «частично перепрограммированные» клетки. Эти клетки были сходны с неонатальными КМЦ по общему профилю экспрессии генов и электрофизиологическим показателям. Таким образом, эффективность дифференцировки оставалась достаточно низкой. Кроме того, возникали проблемы, связанные с воспроизводимостью таких методов получения КМЦ (32, 33). Более эффективным оказался метод введения транскрипционных факторов GMT в стехиометрических количествах (34). Использование комбинации из 5 сердечных транскрипционных факторов GMT, Hand2, и Nkx2.5 (GMTHN) также приводило к более эффективному перепрограммированию мышечных фибробластов, однако и в этом случае большинство дифференцированных клеток *in vitro* представляли собой частично перепрограммированные КМЦ, и лишь некоторые клетки превращались в сокращающиеся КМЦ (35). Рядом исследователей было показано, что различные другие комбинации транскрипционных факторов могут активировать многие кардиомиоцитарные гены в фибробластах, однако не приводят к получению сокращающихся КМЦ *in vitro* (32, 36).

Второй подход связан с доставкой в клетки микроРНК (miRNA), которые играют важную роль в ходе развития сердца (31). Опосредованное miRNA превращение мышечных фибробластов в КМЦ было впервые описано Джайаварденой с соавт. (37) с использованием комбинации из 4-х miRNA (miR-1, -133, -208 и -499), которые, как известно, экспрессируются в КМЦ и вовлечены в развитие и нормальное функционирование сердца (38, 39). В перепрограммированных клетках выявляли маркеры КМЦ, а также наблюдали саркомерную организацию сократительного аппарата и механические сокращения. Использование дополнительного этапа обработки клеток ингибитором Janus-киназы (JAK) приводило к повышению эффективности превращения мышечных фибробластов в КМЦ-подобные клетки *in vitro* (37). Однако несмотря на то, что клетки, дифференцированные с помощью miRNA, окрашивались на маркеры КМЦ, включая MHC, сердечный тропонин I (TNNI3) и  $\alpha$ -актинин, спонтанные сокращения наблюдались только у 1 - 2% клеток от общей популяции (37).

Еще один подход, объединяющий несколько описанных ранее способов дифференцировки, называется методом «эпигенетической нестабильности». Он основан на временной индукции в фибробластах промежуточного состояния плюрипотентности с последующей направленной дифференцировкой в КМЦ (40). Такой метод включает гиперэкспрессию в эмбриональных фибробластах мышей транскрипционных факторов, используемых для получения iPСК (Oct4, Sox2 и Klf4), с последующей обработкой клеток низкомолекулярными ингибиторами Janus-киназы и их культивированием в кардиогенной среде с добавлением BMP4 (31, 40). Дифференцированные клетки окрашивались на маркеры КМЦ, такие как сTnT (примерно 40% клеток), тяжелая цепь миозина и  $\alpha$ -актинин. Интересно, что в этих клетках выявлялась только предсердная изоформа легкой цепи миозина (MLC-2a), что указывает на специализацию подтипа полученных КМЦ. В некоторых колониях наблюдались сокращения (31, 40).

К настоящему времени накопилось много данных о сходстве фибробластов с МСК по экспрессии основных поверхностных маркеров и способности к мультипотентной дифференцировке. Возможно, что положительные результаты перепрограммирования фибробластов в КМЦ связаны именно с наличием у них свойств стволовых клеток. В то же время, фибробласты отличаются от МСК, например, по уровню экспрессии ряда антигенов (41).

Методы получения КМЦ из iPСК и фибробластов часто связаны с использованием вирусных систем доставки. Использование векторов на основе ретровирусов и лентивирусов, которые встраиваются в геном клеток, может приводить к генетическим нарушениям и онкогенной трансформации. В настоящее время более предпочтительным является использование не встраивающихся в геном вирусов, таких как аденовирусы и вирус Сендай, а также невирусных систем доставки (42).

### **Ограничения методов получения дифференцированных КМЦ.**

Несмотря на наличие большого количества данных о получении дифференцированных КМЦ, методы дифференцировки имеют целый ряд ограничений, связанных с недостаточной степенью зрелости клеток и их гетерогенностью, а также небольшим количеством функционально активных КМЦ в популяции клеток.

Все доступные на сегодняшний день протоколы дифференцировки человеческих КМЦ из стволовых клеток приводят к получению смеси различных подтипов КМЦ, например, желудочковых, предсердных КМЦ и КМЦ проводящей системы сердца (43, 44). Несмотря на

то, что со временем в культуре увеличивается доля желудочковых КМЦ (45), такая гетерогенность популяции затрудняет ее использование для исследований *in vitro*, а при введении *in vivo* приводит к проаритмогенному эффекту (46). Для решения этой проблемы используются различные ростовые факторы, которые могут в некоторой степени регулировать специализацию подтипов КМЦ, дифференцированных из стволовых клеток. Такие факторы включают, например, нейрегулин, стимулирующий созревание желудочковых КМЦ (47). Кроме того, проблема неоднородности популяции усугубляется геномной нестабильностью помещенных в культуру клеток (9) и эпигенетическими модификациями, которые могут ограничивать способность клеток дифференцироваться в КМЦ (48). В результате получается культура, содержащая как КМЦ, так и недифференцированные клетки, что ограничивает ее использование *in vitro* и при введении *in vivo* может приводить к опухоленному эффекту. Таким образом, получение гомогенной культуры дифференцированных КМЦ или, по крайней мере, хорошо охарактеризованной смешанной культуры клеток разных подтипов до сих пор остается проблемой.

Другим не менее важным ограничением является то, что большинство КМЦ, полученных из стволовых клеток, а также из фибробластов, имеет так называемый «незрелый фенотип», т.е. отличается по своим характеристикам от КМЦ сердца взрослого организма. На ранних сроках КМЦ, дифференцированные из стволовых клеток, имеют намного меньшие размеры и обладают признаками эмбриональных КМЦ, такими, как аморфная форма и короткие, плохо организованные саркомеры (49, 50). Кроме того, паттерн экспрессии генов у этих клеток соответствует стадиям эмбрионального развития сердца (2, 51). В ходе длительного культивирования дифференцированные КМЦ увеличиваются в размере и приобретают более типичную морфологию и более зрелый сократительный аппарат (45, 50). Однако, даже на поздних сроках культивирования (около 180 дней в культуре) эти клетки не соответствуют взрослым КМЦ по электрофизиологическим показателям и экспрессии генов (52). Имеются данные, указывающие на пониженную массу митохондрий у дифференцированных КМЦ (53) и отсутствие Т-трубочек (54, 55). Для улучшения статуса созревания КМЦ некоторые исследователи используют трехмерные системы культивирования. Например, в КМЦ, полученных из человеческих ЭСК и помещенных в трехмерные условия, наблюдаются более длинные саркомеры и более высокий уровень экспрессии генов сердечного тропонина Т, тяжелой цепи  $\alpha$ -миозина и кальсеквестрина по сравнению с клетками, помещенными в

двумерные условия (56). Клетки, полученные из фибробластов, также не соответствуют КМЦ взрослого сердца по морфологии, общему профилю экспрессии генов и электрофизиологическим показателям и, как правило, называются авторами «КМЦ-подобными клетками» (32).

Еще одна трудность связана с неоднозначностью интерпретации результатов дифференцировки клеток в КМЦ. В то время как существуют понятия «зрелого» и «незрелого» фенотипа КМЦ, общепринятые маркеры для идентификации дифференцированных КМЦ, а также определения статуса их созревания отсутствуют (26, 57). Несмотря на наличие огромного количества кардиоспецифичных белков, которые имеют характерный паттерн экспрессии в ходе развития сердца и которые активно используются исследователями для идентификации дифференцированных КМЦ, многие из них имеют тенденцию изменяться при стрессе или патологических состояниях (58). Например, ген тяжелой цепи  $\alpha$ -миозина является высоко специфичным для КМЦ, однако при заболеваниях сердца происходит изменение содержания изоформ миозина (59). При сердечной недостаточности активируются гены, характерные для стадий эмбрионального развития, такие как гены предсердного натрийуретического фактора ANF,  $\beta$ MHC и скелетного актина (58, 60), при этом экспрессия некоторых генов, таких как ген  $\alpha$ MHC и SERCA2a, напротив, снижается (60). При помещении КМЦ в культуру *in vitro* они начинают экспрессировать множество изоформ белков, характерных для стадий эмбрионального развития, таких как гладкомышечный  $\alpha$ -актин,  $\beta$ -MHC и ANF (61, 62). В связи с этим результаты, полученные на основании таких нестабильных маркеров, следует интерпретировать с осторожностью (63).

Еще одним, широко используемым маркером кардиомиоцитарной дифференцировки является сердечный тропонин Т (сTnT) (64). Однако, было показано, что сTnT также экспрессируется и в других клетках, таких как гладкомышечные клетки (50), что ограничивает возможность его использования в качестве маркера КМЦ. На сегодняшний день единственным надежным критерием дифференцировки КМЦ можно считать соотношение изоформ сердечного тропонина I. В миокарде у всех млекопитающих встречаются две изоформы тропонина I (TnI), которые кодируются двумя отдельными генами и последовательно экспрессируются в ходе развития сердца млекопитающих *in vivo* (59, 65). Ген медленного скелетного тропонина I (ssTnI) TNNI1 экспрессируется в саркомерах эмбриональных КМЦ. На поздних стадиях эмбрионального развития или на ранних стадиях

постнатального развития его экспрессия подавляется, и происходит активация гена «взрослого» сердечного тропонина I (сTnI) TNNI3. Таким образом, в зрелом миокарде выявляется только белок сTnI с полным отсутствием ssTnI (56, 59). Важно, что стресс и патологические состояния не оказывают влияния на динамику экспрессии изоформ ssTnI и сTnI (59) в отличие от обратимых маркеров кардиомиоцитарной дифференцировки, которые чаще всего используются исследователями в настоящее время (60). Результаты анализа соотношения изоформ тропонина ssTnI и сTnI показали, что их экспрессия в культуре неонатальных КМЦ грызунов, а также КМЦ мышей, полученных из ЭСК, сравнима с паттерном их экспрессии *in vivo*.

В случае дифференцировки из человеческих ИПСК созревание КМЦ существенно запаздывает по сравнению с созреванием клеток в ходе нормального развития сердца, при этом сTnI составляет только 2% от общего тропонина I даже через 9,5 месяцев культивирования (51). Интересно, что в отличие от результатов Вестерн-блоттинга данные иммунофлуоресцентного анализа показывают значительное количество сTnI в саркомерах дифференцированных клеток (66). Такие результаты указывают на неприемлемость использования данных иммунофлуоресцентного окрашивания клеток для количественной оценки этого маркера созревания КМЦ (51).

Таким образом, несмотря на то, что многие авторы описывают получение большого количества КМЦ в результате дифференцировки, способы оценки дифференцированных клеток, как правило, являются неоднозначными, и реальное количество функционально активных КМЦ оказывается намного меньше. Например, авторы, описывающие получение из ЭСК человека культуры, содержащей 82-95% КМЦ, идентифицировали дифференцированные клетки по экспрессии транскрипционных факторов, а также по их окраске на сердечный тропонин T, при этом из описания результатов исследования следует, что сокращения наблюдались лишь в некоторых участках культуры (67). В другой работе, несмотря на выявление в клетках различных кардиоспецифичных маркеров, сокращающиеся КМЦ полностью отсутствовали (66). Авторы еще одного исследования наблюдали спонтанные сокращения всего у 1% - 2% клеток от общей популяции, в то время как у значительно большего количества клеток были выявлены такие маркеры, как МНС, сердечный тропонин I (TNNI3) и  $\alpha$ -актинин (37).

### **Дифференцировка КМЦ *in vivo*.**

Несмотря на низкую эффективность известных на сегодняшний день методов получения дифференцированных КМЦ, они широко применяются в условиях *in vivo*. По данным разных авторов, трансплантация стволовых клеток в поврежденную зону сердца часто приводит к положительному результату. Однако в связи с неоднозначностью оценки дифференцировки трансплантированных клеток и их участия в процессе регенерации поврежденной области миокарда мнения ученых о роли этих клеток различаются. В то время как некоторые исследователи считают, что благоприятный эффект, наблюдаемый при введении стволовых клеток в сердце, обусловлен их дифференцировкой в КМЦ, большинство все же объясняет его высвобождением растворимых факторов, которые опосредуют восстановление сердца и образование сосудов (68). В то же время, методы перепрограммирования немышечных клеток сердца в КМЦ *in vivo* показывают хорошие результаты. Так, например, было показано, что перепрограммированные *in vivo* фибробласты в КМЦ мыши являются более зрелыми по сравнению с клетками, полученными *in vitro*, и их введение в поврежденный миокард приводит к значительному уменьшению рубца после инфаркта и улучшению функции сердца (69). Таким образом, методы дифференцировки, в частности, из фибробластов, даже при низкой эффективности получения КМЦ могут приводить к положительным результатам *in vivo* и в связи с этим имеют меньше ограничений по сравнению с методами получения КМЦ *in vitro*.

### **Заключение.**

Методы дифференцировки в кардиомиоцитарном направлении считаются довольно перспективными с точки зрения регенеративной медицины и их применения *in vivo*. Однако использование дифференцированных КМЦ *in vitro* для фундаментальных, а также прикладных исследований (например, для тестирования возможных лекарственных средств) пока еще ограничено в связи с отсутствием стандартного метода получения гомогенной культуры зрелых функционально активных КМЦ. Несмотря на существенные достижения в изучении механизмов дифференцировки КМЦ в ходе эмбриогенеза, пока еще мало известно о сигнальных путях и макромолекулах, играющих ключевую роль в процессе дифференцировки КМЦ в системе *in vitro*. Более детальное изучение особенностей дифференцировки клеток в культуре, а также факторов, влияющих на этот процесс, может приблизить исследователей к созданию более эффективных методов получения дифференцированных КМЦ, а также способов их оценки.

## Список литературы

1. **Doetschman T.C., Eistetter H., Katz M., Schmidt W., Kemler R.** The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolksac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morpholog.* 1985, 87: 27–45.
2. **Kehat I., Kenyagin-Karseni D., Snir M., Segev H., Amit M., Gepstein A., Livne E., Binah O., Itskovitz-Eldor J., Gepstein L.** Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. 2001, *J Clin Invest.* 108: 407–416.
3. **Prowse A.B., Timmins N.E., Yau T.M., Li R.-K., Weisel R.D., Keller G., Zandstra P.W.** Transforming the promise of pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes to a therapy: challenges and solutions for clinical trials. *Canadian Journal of Cardiology* 2014, 30: 1335-1349.
4. **Evans S.M., Yelon D., Conlon F.L., Kirby M.L.** Myocardial lineage development. *Circulation research.* 2010, 107: 1428-1444.
5. **Laflamme M.A., Chen K.Y., Naumova A.V., Muskheli V., Fugate J.A., Dupras S.K., Reinecke H., Xu C., Hassanipour M., Police S., O'Sullivan C., Collins L., Chen Y., Minami E., Gill E.A., Ueno S., Yuan C., Gold J., Murry C.E.** Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol.* 2007, 25: 1015–1024.
6. **Naito A.T., Shiojima I., Akazawa H., Hidaka K., Morisaki T., Kikuchi A., Komuro I.** Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/beta-catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci.* 2006, 103: 19812–19817.
7. **Paige S.L., Osugi T., Afanasiev O.K., Pabon L., Reinecke H., Murry C.E.** Endogenous Wnt/beta-catenin signaling is required for cardiac differentiation in human embryonic stem cells. *PLoS One.* 2010, 5(6): 11134.
8. **Yang L., Soonpaa M.H., Adler E.D., Roepke T.K., Kattman S.J., Kennedy M., Henckaerts E., Bonham K., Abbott G.W., Linden R.M., Field L.J., Keller G.M.** Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population. *Nature.* 2008, 453: 524–528.
9. **Полянская Г.Г.** Проблема нестабильности генома культивируемых стволовых клеток человека. *Цитология.* 2014, 56(10): 697-707.
10. **Takahashi K., Yamanaka S.** Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006, 126: 663–676.
11. **Guenther M.G., Frampton G.M., Soldner F., Hockemeyer D., Mitalipova M., Jaenisch R., Young R.A.** Chromatin structure and gene expression programs of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 2010, 7: 249–257.
12. **Schenke-Layland K., Rhodes K.E., Angelis E., Butylkova Y., Heydarkhan-Hagvall S., Gekas C., Zhang R., Goldhaber J.I., Mikkola H.K., Plath K., MacLellan W.R.** Reprogrammed mouse fibroblasts differentiate into cells of the cardiovascular and hematopoietic lineages. *Stem Cells.* 2008, 26: 1537–1546.
13. **Willems E., Bushway P.J., Mercola M.** Natural and synthetic regulators of embryonic stem cell cardiogenesis. *Pediatr Cardiol.* 2009, 30: 635-642.
14. **Cao N., Liu Z., Chen Z., Wang J., Chen T., Zhao X., Ma Y., Qin L., Kang J., Wei B., Wang L., Jin Y., Yang H.T.** Ascorbic acid enhances the cardiac differentiation of induced pluripotent stem cells through promoting the proliferation of cardiac progenitor cells. *Cell Res.* 2012, 22: 219–236.
15. **Lin S.C., Dolle P., Ryckebusch L., Nosedá M., Zaffran S., Schneider M.D., Niederreither K.** Endogenous retinoic acid regulates cardiac progenitor differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010, 107: 9234–9239.

16. **Osada H.** Protein Targeting with Small Molecules: Chemical Biology Techniques and Applications. Wiley: Hoboken, NJ, USA. 2009, p. 297.
17. **Qian Q., Qian H., Zhang X., Zhu W., Yan Y., Ye S., Peng X., Li W., Xu Z., Sun L., Xu W.** 5-Azacytidine induces cardiac differentiation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells by activating extracellular regulated kinase. *Stem Cells Dev.* 2012, 21: 67–75.
18. **Nakamura T., Sano M., Songyang Z., Schneider M.D.** A Wnt- and  $\beta$ -catenin-dependent pathway for mammalian cardiac myogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003, 100: 5834–5839.
19. **Oh H., Bradfute S.B., Gallardo T.D., Nakamura T., Gaussin V., Mishina Y., Pocius J., Michael L.H., Behringer R.R., Garry D.J., Entman M.L., Schneider M.D.** Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003, 100: 12313–12318.
20. **Valente M., Nascimento D.S., Cumano A., Pinto-do-Ó P.** Sca-1(+) Cardiac Progenitor Cells and Heart-Making: A Critical Synopsis. *Stem Cells Dev.* 2014, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.305557.
21. **Keith M.C.L., Bolli R.** “String theory” of c-kit(pos) cardiac cells: a new paradigm regarding the nature of these cells that may reconcile apparently discrepant results. *Circ Res.* 2015, 116: 1216–30.
22. **Stastna M., Chiment I., Marbaín E., Van Eyk J.E.** Identification and functionality of proteomes secreted by rat cardiac stem cells and neonatal cardiomyocytes. *Proteomics.* 2010, 10: 245–253.
23. **Beltrami A.P., Barlucchi L., Torella D., Baker M., Limana F., Chimenti S., Kasahara H., Rota M., Musso E., Urbanek K., Leri A., Kajstura J., Nadal-Ginard B., Anversa P.** Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell.* 2003, 114: 763–776.
24. **Li T.S., Cheng K., Lee S.T., Matsushita S., Davis D., Malliaras K., Zhang Y., Matsushita N., Smith R.R., Marbán E.** Cardiospheres recapitulate a niche-like microenvironment rich in stemness and cell-matrix interactions, rationalizing their enhanced functional potency for myocardial repair. *Stem Cells,* 2010, 28(11): 2088-98.
25. **Oltolina F., Zamperone A., Colangelo D., Gregoletto L., Reano S., Pietronave S., Merlin S., Talmon M., Novelli E., Diena M., Nicoletti C., Musarò A., Filigheddu N., Follenzi A., Prat M.** Human Cardiac Progenitor Spheroids Exhibit Enhanced Engraftment Potential. *PLoS One.* 2015, 10(9): 0137999.
26. **Ieda M., Fu J.D., Delgado-Olguin P., Vedantham V., Hayashi Y., Bruneau B.G., Srivastava D.** Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell.* 2010, 142: 375–386.
27. **Vierbuchen T., Ostermeier A., Pang Z.P., Kokubu Y., Südhof T.C., Wernig M.** Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature.* 2010, 463: 1035–1041.
28. **Sekiya S., Suzuki A.** Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocytelike cells by defined factors. *Nature.* 2011, 475: 390–393.
29. **Lin C., Yu C., Ding S.** Toward directed reprogramming through exogenous factors. *Acad Sci USA.* 2013, 23(5): 519-25.
30. **Song K., Nam Y.J., Luo X., Qi X., Tan W., Huang G.N., Acharya A., Smith C.L., Tallquist M.D., Neilson E.G., Hill J.A., Bassel-Duby R., Olson E.N.** Heart repair by reprogramming non-mycocytes with cardiac transcription factors. *Nature.* 2012, 485: 599–604.
31. **Xu C.** Turning cardiac fibroblasts into cardiomyocytes in vivo. *Trends Mol Med.* 2012, 18: 575–576.

32. **Chen J.X., Krane M., Deutsch M.A., Wang L., Rav-Acha M., Gregoire S., Engels M.C., Rajarajan K., Karra R., Abel E.D., Wu J.C., Milan D., Wu S.M.** Inefficient reprogramming of fibroblasts into cardiomyocytes using Gata4, Mef2c, and Tbx5. *Circ Res.* 2012, 111: 50–55.
33. **Srivastava D., Ieda M.** Critical factors for cardiac reprogramming. *Circ Res.* 2012, 111: 5–8.
34. **Wang L., Liu Z., Yin C., Asfour H., Chen O., Li Y., Bursac N., Liu J., Qian L.** Stoichiometry of Gata4, Mef2c, and Tbx5 influences the efficiency and quality of induced cardiac myocyte reprogramming. *Circ Res.* 2015, 116(2): 237–44.
35. **Ifkovits J.L., Addis R.C., Epstein J.A., Gearhart J.D.** Inhibition of TGF $\beta$  signaling increases direct conversion of fibroblasts to induced cardiomyocytes. *PLoS One.* 2014, 9: e89678.
36. **Kim T.K., Sul J.Y., Peterenko N.B., Lee J.H., Lee M., Patel V.V., Kim J., Eberwine J.H.** Transcriptome transfer provides a model for understanding the phenotype of cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011, 108: 11918–11923.
37. **Jayawardena T.M., Egemnazarov B., Finch E.A., Zhang L., Payne J.A., Pandya K., Zhang Z., Rosenberg P., Mirotsov M., Dzau V.J.** MicroRNA-mediated *in vitro* and *in vivo* direct reprogramming of cardiac fibroblasts to cardiomyocytes. *Circ Res.* 2012, 110: 1465–1473.
38. **Zhao Y., Ransom J.F., Li A., Vedantham V., von Drehle M., Muth A.N., Tsuchihashi T., McManus M.T., Schwartz R.J., Srivastava D.** Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell.* 2007, 129: 303–317.
39. **Fu J.D., Rushing S.N., Lieu D.K., Chan C.W., Kong C.W., Geng L., Wilson K.D., Chiamvimonvat N., Boheler K.R., Wu J.C., Keller G., Hajjar R.J., Li R.A.** Distinct roles of microRNA-1 and -499 in ventricular specification and functional maturation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *PLoS One.* 2011, 6: 27417.
40. **Efe J.A., Hilcove S., Kim J., Zhou H., Ouyang K., Wang G., Chen J., Ding S.** Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy. *Nat Cell Biol.* 2011, 13: 215–222.
41. **Halfon S., Abramov N., Grinblat B., Ginis I.** Markers distinguishing mesenchymal stem cells from fibroblasts are downregulated with passaging. *Stem cells and development.* 2010, 20(1): 53–66.
42. **Malik N., Rao M.S.** A review of the methods for human iPSC derivation. *Methods Mol Biol.* 2013, 997: 23–33.
43. **He J.Q., Ma Y., Leev, Thomson J.A., Kamp T.J.** Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization. *Circ Res.* 2003, 93: 32–39.
44. **Zhang J., Klos M., Wilson G.F., Herman A.M., Lian X., Raval K.K., Barron M.R., Hou L., Soerens A.G., Yu J., Palecek S.P., Lyons G.E., Thomson J.A., Herron T.J., Jalife J., Kamp T.J.** Extracellular matrix promotes highly efficient cardiac differentiation of human pluripotent stem cells: the matrix sandwich method. *Circ Res.* 2012, 111: 1125–1136.
45. **Kamakura T., Makiyama T., Sasaki K., Yoshida Y., Wuriyanghai Y., Chen J., Hattori T, Ohno S., Kita T., Horie M., Yamanaka S., Kimura T.** Ultrastructural maturation of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in a long-term culture. *Circ J.* 2013, 77: 1307–1314.
46. **Hartman M.E., Dai D.F., Laflamme M.A.** Human pluripotent stem cells: Prospects and challenges as a source of cardiomyocytes for *in vitro* modeling and cell-based cardiac repair. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2016, 96: 3–17.
47. **Zhu W.Z., Xie Y., Moyes K.W., Gold J.D., Askari B., Laflamme M.A.** Neuregulin/ErbB signaling regulates cardiac subtype specification in differentiating human embryonic stem cells. *Circ Res.* 2010, 107: 776–786.
48. **Polo J.M., Liu S., Figueroa M.E., Kulalert W., Eminli S., Tan K.Y., Apostolou E., Stadtfeld M., Li Y., Shioda T., Natesan S., Wagers A.J., Melnick A., Evans T., Hochedlinger K.** Cell type of

origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* 2010, 28: 848–855.

49. **Mummery C., Ward-van Oostwaard D., Doevendans P., Spijker R., van den Brink S., Hassink R., van der Heyden M., Opthof T., Pera M., de la Riviere A.B., Passier R., Tertoolen L.** Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation.* 2003, 107: 2733–2740.

50. **Lundy S.D., Zhu W.Z., Regnier M., Laflamme M.A.** Structural and functional maturation of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev.* 2013, 22: 1991–2002.

51. **Bedada F.B., Chan S.S., Metzger S.K., Zhang L., Zhang J., Garry D.J., Kamp T.J., Kyba M., Metzger J.M.** Acquisition of a quantitative, stoichiometrically conserved ratiometric marker of maturation status in stem cell-derived cardiac myocytes. *Stem Cell Rep.* 2014, 3: 594–605.

52. **Moretti A., Bellin M., Welling A., Jung C.B., Lam J.T., Bott-Flugel L., Dorn T., Goedel A., Hohnke C., Hofmann F., Seyfarth M., Sinnecker D., Schomig A., Laugwitz K.L.** Patient specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome. *N Engl J Med.* 2010, 363: 1397–1409.

53. **Yang X., Rodriguez M., Pabon L., Fischer K.A., Reinecke H., Regnier M., Sniadecki N.J., Ruohola-Baker H., Murry C.E.** Tri-iodo-L-thyronine promotes the maturation of human cardiomyocytes-derived from induced pluripotent stem cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2014, 72: 296–304.

54. **Lieu D.K., Liu J., Siu C.W., McNERney G.P., Tse H.F., Abu-Khalil A., Huser T., Li R.A.** Absence of transverse tubules contributes to non-uniform Ca(2+) wavefronts in mouse and human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cells Dev.* 2009, 18: 1493–1500.

55. **Lee Y.K., Ng K.M., Lai W.H., Chan Y.C., Lau Y.M., Lian Q., Tse H.F., Siu C.W.** Calcium homeostasis in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cell Rev.* 2011, 7: 976–986.

56. **Zhang D., Shadrin I.Y., Lam J., Xian H.Q., Snodgrass H.R., Bursac N.** Tissue-engineered cardiac patch for advanced functional maturation of human ESC-derived cardiomyocytes. *Biomaterials.* 2013, 34: 5813–5820.

57. **Shiba Y., Fernandes S., Zhu W.Z., Filice D., Muskheli V., Kim J., Palpant N.J., Gantz J., Moyes K.W., Reinecke H., Van Biber B., Dardas T., Mignone J.L., Izawa A., Hanna R., Viswanathan M., Gold J.D., Kotlikoff M.I., Sarvazyan N., Kay M.W., Murry C.E., Laflamme M.A.** Human ES-cell-derived cardiomyocytes electrically couple and suppress arrhythmias in injured hearts. *Nature.* 2012, 489: 322–325.

58. **Parker T.G., Packer S.E., Schneider M.D.** Peptide growth factors can provoke “fetal” contractile protein gene expression in rat cardiac myocytes. *J Clin Invest.* 1990, 85: 507–514.

59. **Sasse S., Brand N.J., Kyprianou P., Dhoot G.K., Wade R., Arai M., Periasamy M., Yacoub M.H., Barton P.J.** Troponin I gene expression during human cardiac development and in endstage heart failure. *Circ Res.* 1993, 72: 932–938.

60. **Razeghi P., Young M.E., Alcorn J.L., Moravec C.S., Frazier O.H., Taegtmeier H.** Metabolic gene expression in fetal and failing human heart. *Circulation.* 2001, 104: 2923–2931.

61. **Eppenberger-Eberhardt M., Flamme I., Kurer V., Eppenberger H.M.** Reexpression of  $\alpha$ -smooth muscle actin isoform in cultured adult rat cardiomyocytes. *Dev Biol.* 1990, 139: 269–278.

62. **Schaub M.C., Hefti M.A., Harder B.A., Eppenberger H.M.** Various hypertrophic stimuli induce distinct phenotypes in cardiomyocytes. *J Mol Med.* 1997, 75: 901–920.

63. **Bedada F.B., Wheelwright M., Metzger J.M.** Maturation status of sarcomere structure and function in human iPSC-derived cardiac myocyte. *Biochim Biophys Acta.* 2015, Nov 11.

64. **Chan Y.C., Ting S., Lee Y.K., Ng K.M., Zhang J., Chen Z., Siu C.W., Oh S.K., Tse H.F.** Electrical stimulation promotes maturation of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *J Cardiovasc Transl Res.* 2013, 6: 989–999.

65. Bhavsar, P.K., Dhoot, G.K., Cumming, D.V., Butler-Browne, G.S., Yacoub, M.H., Barton, P.J. Developmental expression of troponin I isoforms in fetal human heart. FEBS Lett. 1991, 292: 5–8.
66. Shi S., Wu X., Wang X., Hao W., Miao H., Zhen L., Nie S. Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells to cardiomyocyte-like cells is regulated by the combined low dose treatment of transforming growth factor  $\beta$ 1 and 5azacytidine. Stem Cells Int. 2016: 3816256.
67. Lian X., Zhang J., Azarin S.M., Zhu K., Hazeltine L.B., Bao X., Hsiao C., Kamp T.J., Palecek S.P. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/beta-catenin signaling under fully defined conditions. Nat Protoc. 2013, 8: 162–175.
68. Tang X.L., Rokosh G., Sanganalmath S.K., Yuan F., Sato H., Mu J., Dai S., Li C., Chen N., Peng Y., Dawn B., Hunt G., Leri A., Kajstura J., Tiwari S., Shirk G., Anversa P., Bolli R. Intracoronary administration of cardiac progenitor cells alleviates left ventricular dysfunction in rats with a 30-day-old infarction. Circulation. 2010, 121: 293–305.
69. Qian L., Huang Y., Spencer C.I., Foley A., Vedantham V., Liu L., Conway S.J., Fu J.D., Srivastava D. *In vivo* reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. Nature. 2012, 485: 593–598.

**МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ СОЗДАНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ  
ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ДЕФЕКТОВ КОСТНОЙ И ХРЯЩЕВОЙ ТКАНЕЙ  
(ОПЫТ ИНСТИТУТА ЦИТОЛОГИИ РАН)**

**С.А.Александрова<sup>1</sup>, Ю.А.Нащекина<sup>1,2</sup>, Н.В.Цупкина<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>ФГБУН «Институт цитологии» РАН, Санкт-Петербург, [alekssvet2205@gmail.com](mailto:alekssvet2205@gmail.com),

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»

В статье изложен краткий обзор методологических подходов к созданию тканеинженерных конструкций для восстановления дефектов костной и хрящевой тканей, разрабатываемых сотрудниками Института цитологии РАН. Определены условия, необходимые для адгезии и роста мультипотентных мезенхимных стромальных клеток костного мозга кролика на матриксах различной природы (коллаген I типа, деминерализованный костный матрикс, поли(L,L)-лактид, биоситалл), оработаны способы совмещения клеток и трехмерных носителей, проведены испытания полученных тканеинженерных конструкций на лабораторных животных, показавшие возможность их применения в клинике.

**Ключевые слова:** мультипотентные мезенхимные стромальные клетки костного мозга, остеогенная и хондрогенная дифференцировка, коллаген I типа, деминерализованный костный матрикс, биоситалл, поли(L,L)-лактид, тканеинженерные конструкции.