

ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ И ЭФФЕКТИВНОСТИ ИНЪЕКЦИОННОГО МЕТОДА ТРАНСПЛАНТАЦИИ КАРДИОМИОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА, ОБЛАДАЮЩИХ ПЕЙСМЕЙКЕРНОЙ АКТИВНОСТЬЮ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

А.В. Пономаренко, Е.В. Чепелева, С.В. Павлова, А.Б. Романов, А.Г. Стрельников, Д.С. Сергеевичев, Е.А. Покушалов

Национальный медицинский исследовательский центр им. акад. Е.Н. Мешалкина, Новосибирск, Россия

SAFETY AND EFFECTIVENESS EVALUATION OF THE INJECTION TRANSPLANTATION METHOD OF HUMAN PACEMAKER CARDIOMYOCYTE DERIVED FROM INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS

A.V. Ponomarenko, E.V. Chepeleva, S.V. Pavlova, A.B. Romanov, A.G. Strelnikov, D.S. Sergeevichev, E.A. Pokushalov

E.N. Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russia

e-mail: d_sergeevichev@meshalkin.ru

Аритмия — патологическое состояние, приводящее к нарушению частоты, ритмичности и последовательности возбуждения и сокращения сердца. Методы клеточной терапии открывают новые возможности для лечения этой группы заболеваний. Цель работы: оценить безопасность и эффективность инъекционного метода трансплантации кардиомиоцитов, обладающих пейсмейкерной активностью, полученных путем направленной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, в сердце лабораторных животных (мини-свиней).

Экспериментальные животные были разделены на 2 группы: животным первой группы в свободную стенку левого желудочка инъекционно вводили матригель с кардиомиоцитами, полученными из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, животным второй группы (контроль) — физиологический раствор. Для снижения реакции отторжения после трансплантации ксеногенной культуры клеток до операции и в течение всего срока наблюдения проводили иммуносупрессию комбинацией циклоспорина А и преднизолона. В послеоперационный период ежедневно делали запись электрокардиограммы с целью выявления эктопических событий. Через 5 сут. после трансплантации клеток животных выводили из эксперимента и забирали участки миокарда с трансплантированным материалом для гистологического и иммуногистохимического анализов.

Было показано, что трансплантированные кардиомиоциты сохраняются в сердце экспериментальных животных в течение 5 сут., однако проявления эктопической электрофизиологической активности в месте введения клеток обнаружено не было. Полученные данные указывают на необходимость проведения дополнительных экспериментальных работ с ужесточением иммуносупрессии, увеличением процентного содержания пейсмейкерных клеток в используемой культуре и времени нахождения клеток в миокарде.

Ключевые слова: клеточная терапия, регенеративная медицина, аритмия, кардиомиоциты, пейсмейкерные клетки.

Введение

Ритмичная деятельность сердца зависит от небольшого числа высокоспециализированных кардиомиоцитов (пейсмейкерных клеток), составляющих синоатриальный (СА) узел — структуру, расположенную в правом предсердии на соединении с верхней полой веной и иннервируемую автономными нервами [1]. Пейсмейкерные клетки в СА узле генерируют электрические импульсы, функционируя как триггер для сердечных сокращений. Аномалии развития СА узла ответственны за возникновение сердечных аритмий и, как следствие, внезапную сердечную смерть [2]. Дисфункция пейсмейкерных клеток обозначается термином синдром слабости синусового узла (СССУ), включающим ряд заболеваний, таких как: патологическая брадикардия и (или) симптоматическая синусовая брадикардия, синоатриальный блок,

Arrhythmia is a pathological condition leading to a violation of the frequency, rhythm and sequence of the heart contraction. The cell therapy methods open a new possibility for this group of diseases treatment. This work was aimed to evaluate effectiveness and safeness of cardiomyocytes transplantation in the heart of laboratory animals.

In the experiment, two groups of animals were examined: in the first group injection of cardiomyocytes contained in Matrigel was made into the wall of the left ventricle, saline injection was performed in the second group. To reduce the rejection reaction after xenogeneic cell culture transplantation prior to surgery and during the whole observation period, the animals were immunosuppressed by cyclosporin A and prednisolone combination. Electrocardiogram was recorded daily during the postoperative follow-up period to catch the ectopic events. After 5 days from cells transplantation animals were euthanized, the myocardium with transplanted material was taken for histological and immunohistochemical analysis.

In the course of the work, it was shown that transplanted cardiomyocytes persist in the heart of experimental animals up to 5 days, but no electrophysiological activity was found. The obtained data indicate the need for additional experimental work with increased immunosuppression, increased time of the cells in the myocardium, an increase in the percentage of pacemaker cells in the used culture.

Keywords: cell therapy, regenerative medicine, arrhythmia, cardiomyocytes, pacemaker cells.

синусовый арест и синдром тахикадия-брадикардия [3]. СССУ часто дополняется ишемической болезнью сердца, кардиомиопатией и миокардитом [4]. Причины возникновения данного синдрома связаны с дегенеративными изменениями в клетках синусового узла и проводящей системы сердца вследствие мутаций генов, кодирующих белки ионных каналов [5]. Исследования в области электрофизиологии миокарда свидетельствуют о том, что мутации в генах *HCN4*, *HCN5a* или *CAV3*, кодирующих соответствующие субъединицы белков мембранных каналов кардиомиоцитов, приводят к аритмиям, возникающим вследствие дисфункции в клетках синусового узла [6, 7]. Лечение брадиаритмий в настоящее время заключается в имплантации искусственного водителя ритма, который способен регулировать работу сердца в стрессовой ситуации. Тем не менее, данный метод

обладает рядом существенных недостатков. Дисфункция ввиду утраты заряда батареи, дислокации электродов или угроза инфицирования являются распространенными проблемами стимуляторов [8]. Пациенты с имплантированными стимуляторами имеют повышенный риск развития осложнений (тромбоэмболия, гнойные воспаления, пневмоторакс, тахикардия, эпизоды потери сознания) на протяжении всей жизни после имплантации искусственного водителя ритма. Электронные водители ритма также не подходят для детей, так как по мере роста ребенка может потребоваться реимплантация кардиостимулятора или электродов. Перечисленные недостатки указывают на необходимость научного поиска и развития исследований в области биологических пейсмейкеров, которые придут на смену стандартным электрокардиостимуляторам и будут лишены их недостатков. Генерация биологических пейсмейкеров может быть получена путем направленной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) [9] или репрограммированием кардиомиоцитов сердца с уже развившимся СССР. На сегодняшний день разработан ряд протоколов получения кардиомиоцитов, обладающих пейсмейкерной активностью [10, 11], однако при их интрамиокардиальной трансплантации с целью лечения нарушений ритма сердца отмечается низкая выживаемость трансплантированных клеток и недостаточное их закрепление в месте введения. Например, в работе H. Zhang с соавт. (2011) было обнаружено, что только небольшая часть трансплантированных кардиомиоцитов остается в сердце экспериментального животного в течение 14 сут. [12].

За последние годы появились публикации, в которых показано, что использование в качестве носителя для клеток матригеля (экстракта компонентов базальной мембраны) способствует сохранению жизнеспособных донорских клеток в организме реципиента в месте введения, по крайней мере, до 4 недель [13, 14]. Мы предположили, что инъекция кардиомиоцитов, обладающих пейсмейкерной активностью, дифференцированных из ИПСК человека с использованием протокола по методике P. Burrige с соавт., (2014) [15], содержащихся в матригеле, будет оптимальным способом для повышения приживаемости данных клеток в сердце.

Цель работы: оценка безопасности и эффективности инъекционного метода трансплантации кардиомиоцитов, обладающих пейсмейкерной активностью, дифференцированных из ИПСК человека, с использованием матригеля в качестве носителя, в сердце лабораторных животных (мини-свиней).

Материал и методы

Дизайн эксперимента

Оценку безопасности и эффективности метода интрамиокардиальной трансплантации кардиомиоцитов, полученных из ИПСК человека, выполняли на мини-свиньях селекции ИЦиГ СО РАН в возрасте 6–8 мес. и массой тела 65–75 кг ($n=10$), разделенных на 2 группы: 1 группа (опыт, $n=5$), 2 группа (контроль, $n=5$). Животным 1 группы в свободную стенку левого желудочка инъекционно вводили кардиомиоциты в матригеле, животным 2 группы — физиологический раствор. Работа с животными проводилась в соответствии с международными и российскими нормативно-правовыми документами: «Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях: EST № 123» от 18 марта 1986 г., «Об утверждении правил лабораторной практики: приказ Министерства здравоохранения Российской

Федерации» № 267 от 19.06.2003 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария ФГБУ «НМИЦ им. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России.

Получение культуры кардиомиоцитов

Кардиомиоциты получали путем направленной дифференцировки ИПСК человека (линия ИПСК iMA1L была любезно предоставлена Е.В. Григорьевой, научным сотрудником лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН). ИПСК культивировали на пластике, предварительно покрытым тонким слоем (9 мкг/см²) матригеля (Matrigel hESC-qualified Matrix* LDEV-Free, Corning, США), в среде Essential 8™ (Thermo Fisher Scientific, США). Дифференцировку ИПСК проводили по ранее опубликованному протоколу P. Burrige с соавт. (2014) в среде RPMI 1640 (Lonza, Швейцария), дополненной B27 (Thermo Fisher Scientific), с активной сигнальной пути WNT с помощью CHIR99021 (StemRD, США) в течение 48 ч. и последующем его ингибировании посредством IWP2 (Sigma-Aldrich, США) [15]. Чистую популяцию кардиомиоцитов выделяли методом метаболической селекции клеток, основанной на способности кардиомиоцитов метаболизировать лактат в отсутствие глюкозы. На 14–20 сут. дифференцировки клетки снимали с культурального пластика с помощью TrypLE™ Express (Thermo Fisher Scientific), пересаживали на покрытые 0,1% желатином культуральные чашки диаметром 35 мм и заливали питательной средой RPMI 1640, содержащей 20% эмбриональной бычьей сыворотки (Autogene Bioclear, Великобритания) и 10 мкМ Y-27632 (StemRD). Через 1 сут. питательную среду заменяли на среду для метаболической селекции следующего состава: RPMI 1640 без D-глюкозы (Thermo Fisher Scientific), 213 мкг/мл L-аскорбиновой кислоты 2-фосфата (Sigma-Aldrich), 500 мкг/мл рекомбинантного альбумина человека (Sigma-Aldrich), 5 мМ DL-лактата натрия L4263 (Sigma-Aldrich) и инкубировали клетки в течение 1 недели. Для проведения интрамиокардиальной трансплантации чистую популяцию кардиомиоцитов на 20–30 сут. культивирования после начала дифференцировки и метаболической селекции окрашивали прижизненным флюоресцентным красителем CellTracker™ Red CMTPX Dye (Thermo Fisher Scientific) в течение 30 мин. при 37 °C согласно инструкции фирмы-производителя, открепляли от культурального пластика с помощью TrypLE™ Express, дезагрегировали и смешивали с матригелем в соотношении 1:1 (1×10^6 клеток в 50 мкл культуральной среды RPMI 1640 добавляли к 50 мкл матригеля).

Проточная цитофлюориметрия

Полученные кардиомиоциты анализировали на экспрессию клеточных маркеров HCN4 (Abcam, Великобритания) и тропонина T (TnT, Abcam), используя проточный цитометр FACSCantoll (Becton Dickinson, США). Пробоподготовку и анализ клеточного материала проводили согласно рекомендациям фирмы-производителя.

Трансплантация культуры кардиомиоцитов в сердце

За 12 ч. до операции животным внутривенно вводили раствор циклоспорина А (Novartis Pharma AG, Швейцария) в дозе 10 мг/кг массы тела. Непосредственно перед операцией животным проводилась премедикация комбинацией препаратов: атропина (0,1 мг/кг; Дальхимфарм, Россия) и Золетил-100 (6 мг/кг; Virbac, Франция). Затем внутривенно вводили миорелаксант ардуан (0,05 мг/кг; Gedeon Richter, Венгрия) и интубировали трахею трубкой соответствующего диаметра. Животное

подключали к аппарату ИВЛ HPV760 (Puritan Bennett, США) и для принудительной вентиляции легких использовали газовую смесь кислород-воздух в соотношении 1:1. Поддерживающий наркоз производили непрерывным внутривенным введением эмульсии пропофола (Fresenius Kabi, Австрия) в дозе 10 мк/кг/ч. с помощью автоматического шприцевого насоса PerfusorCompact (B. Braun, Германия) через установленный ранее периферический катетер. До начала хирургического вмешательства всем животным была сделана стандартная ЭКГ с 6 отведениями с помощью электрокардиографа Cardiovit AT-102 (Schiller, Швейцария).

В стерильных условиях, после обработки операционного поля, в 4 межреберье выполнялась левосторонняя боковая торакотомия. После вскрытия перикарда обнажилась боковая стенка левого желудочка и проводилась стимуляционная картирование, описанное Н. Zang с соавт. [2011] [12]: в предполагаемую область инъекции клеток или физиологического раствора в левый желудочек при помощи генератора импульсов Биоток ЭКСД-01 Л (Томск, Россия) через стерильный биполярный электрод подавались периодические электрические импульсы (частота 2 Hz, амплитуда 2V, сила тока 2 mA, продолжительность импульса 0,4 мс). Во время стимуляции делали запись ЭКГ с помощью стандартной методики с применением 6 стандартных отведений, с целью формирования шаблона зоны эктопической активности сердца. Животным накладывали кисетный шов из монофиламентной полипропиленовой нити диаметром 5/0 на свободную стенку левого желудочка, в центр кисетного шва инъекционно вводили суспензию кардиомиоцитов в матригеле в количестве 0,2 мл на глубину 0,3 мм (опытная группа) или физиологический раствор в равном объеме (контрольная группа), далее кисет зашивали и операционную рану послойно ушивали.

Для предотвращения развития реакции иммунной системы организма мини-свиньи в ответ на клетки человека перед трансплантацией кардиомиоцитов и в течение всего послеоперационного периода проводилась искусственная иммуносупрессия комбинацией циклоспорина А (Novartis Pharma AG) и преднизолона (Indus Pharma, Индия) согласно стандартным клиническим рекомендациям.

Через 5 сут. после операции животных выводили из эксперимента путем внутривенного введения тиопентала натрия (Синтез ОАО, Россия) в дозе 50 мг/кг веса животного. Сразу же после эвтаназии извлекали сердце, в проекции наложения кисетных швов вырезали фрагменты миокарда с трансплантированными клетками или инъекцией физиологического раствора. Одну часть фрагментов миокарда фиксировали в 10% растворе формалина в течение 48 ч., заключали в парафиновые блоки, изготавливали гистологические срезы, окрашивали гематоксилином и эозином по общепринятой методике и анализировали на световом микроскопе Axioskop 40 (Zeiss, Германия). Другую часть фрагментов миокарда замораживали в среде Tissue-Tek OCT (Sakura Finetek, США) для изготовления криосрезов толщиной 10 мкм на криостате HM-550 (Microm, Великобритания) и прикрепляли к стеклам SuperFrost Plus (Menzel-Gläser, Германия). Полученные криопрепараты использовали для иммунофлюоресцентного анализа.

Иммунофлюоресцентный анализ

Наличие белков TnT и Nkx2.5 в полученных кардиомиоцитах и белка HNA в криосрезах тканей сердца определяли методом иммунофлюоресцентного окрашивания. Кардиомиоциты фиксировали в 4% растворе формальдегида, блокировали неспецифическое связывание

2,5% раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA) в буфере PBS и далее инкубировали с антителами к белкам TnT и Nkx2.5 (Abcam, Великобритания) по стандартным протоколам.

Препараты криосрезов тканей сердца фиксировали в 4% растворе параформальдегида, пермеабелизовали в течение 30 мин. в 0,5% растворе Triton X-100 (Bio-Rad, США) в PBS, блокировали неспецифическое связывание 2,5% раствором BSA в PBS и далее инкубировали с антителами к белку HNA (Abcam, Великобритания) по стандартным протоколам.

Для окрашивания ядер клеток на препаратах использовали DAPI в Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, США).

Препараты анализировали на флюоресцентном микроскопе NIKON Ti100 (Nikon, Япония) с помощью программного обеспечения Imstar.

Стимуляционное картирование

После формирования шаблона эктопической активности с использованием 6 стандартных отведений выполнялась ежедневная запись ЭКГ. При возникновении эктопических явлений каждый комплекс QRS, полностью совпадающий с шаблоном эктопической активности по направлению и конфигурации, оценивался в 2 балла, если выявлялось совпадение только по направлению — в 1 балл, полное несовпадение комплексов — 0 баллов (максимальное количество баллов — 12). Также проводилось сравнение компенсаторной паузы шаблона с компенсаторной паузой при эктопической активности в случае ее возникновения на ЭКГ экспериментальных животных.

Результаты и обсуждение

Способ направленной дифференцировки ИПСК для создания линий пациент-специфичных кардиомиоцитов с целью их дальнейшего применения в терапии сердечно-сосудистых заболеваний является наиболее предпочтительным по сравнению с такими методами, как дифференцировка кардиомиоцитов из эмбриональных (ЭСК) либо региональных (ММСК костного мозга или жировой ткани) стволовых клеток организма, а также выделение кардиомиоцитов из биоптатов миокарда [16]. В настоящей работе была получена культура кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК человека методом последовательной активации и ингибирования WNT-пути. Начиная с 8 сут. культивирования отмечались слабые асинхронные сокращения отдельных клеток, высокоамплитудные синхронизированные сокращения всего клеточного монослоя с частотой до 50 ударов в мин. наблюдались после 20 сут. культивирования и сохранялись в течение 3 мес. от начала дифференцировки. Методом иммунофлюоресцентного окрашивания культуры кардиомиоцитов на 20 сут. дифференцировки практически во всех клетках было показано наличие сократительного белка TnT, характерного для клеток сердечной и скелетной мускулатуры, а также кардиального транскрипционного фактора Nkx2.5 (рис. 1). По данным точной цитофлуориметрии в исследуемой культуре клеток было выявлено 75,3% TnT-позитивных клеток и 3,8% клеток с выработкой HCN4 (мембранный маркер лиганд-зависимого катионного канала, который принимает участие в генерации ритмической активности миокарда) (рис. 2). Исходя из приведенных данных, можно сделать вывод, что отдельные клетки в культуре кардиомиоцитов способны проявлять пейсмейкерную активность (генерировать ритмические импульсы возбуждения, распространяющиеся на другие клетки).

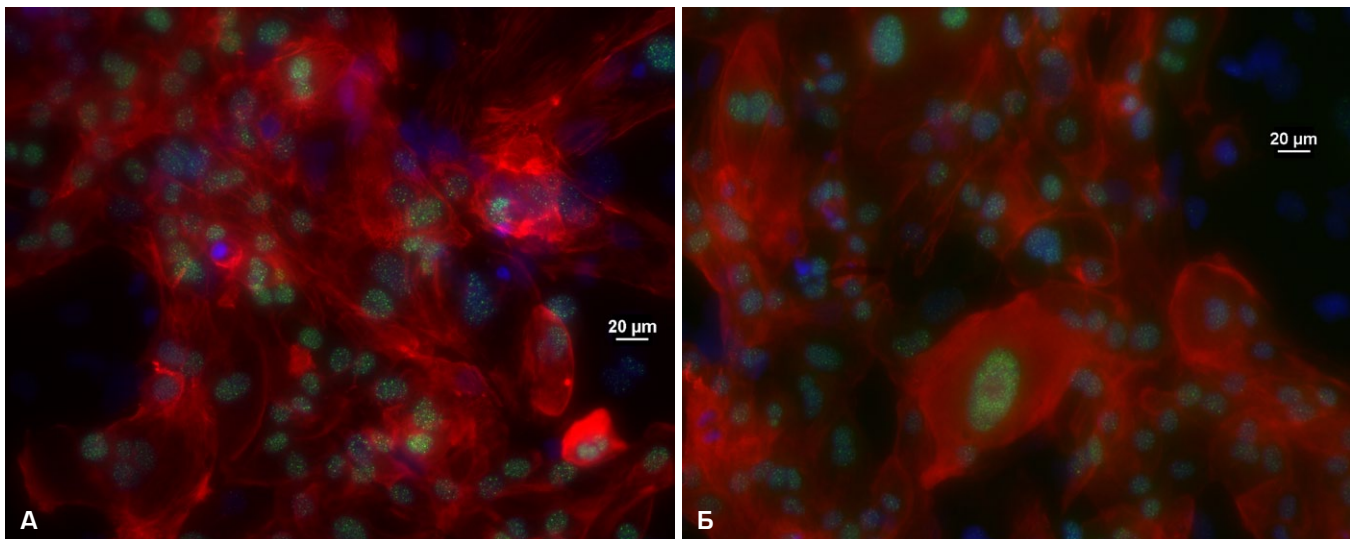


Рис. 1. Культура кардиомиоцитов, полученных из ИПСК человека, на 20 сут. дифференцировки. Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами против Nkx2.5 (зеленый) и TnT (красный), клеточные ядра окрашены DAPI (синий). Масштабный отрезок: 20 мкм

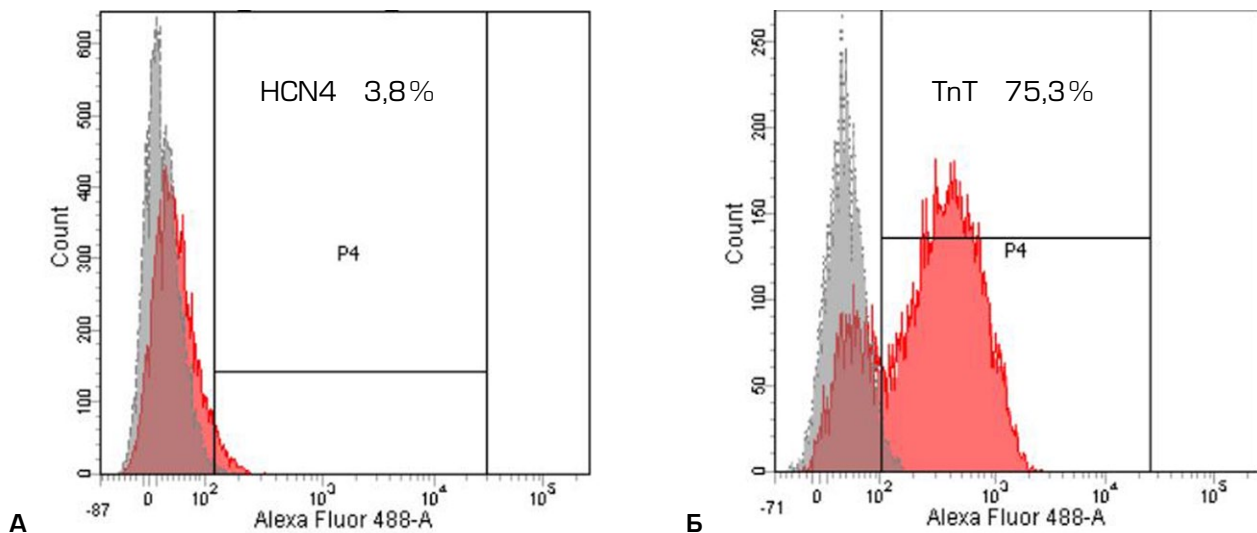


Рис. 2. Маркеры HCN4 (А) и TnT (Б) в культуре кардиомиоцитов, полученных из ИПСК человека, 20 сут. дифференцировки (проточная цитофлуориметрия)

В наших предыдущих работах оценивалась эффективность использования биоматериалов, состоящих из компонентов внеклеточного матрикса, в качестве носителя для интрамиокардиальной трансплантации кардиальных клеток крысы, несущих репортерную систему на основе гена люциферазы [17, 18]. В этих исследованиях было показано положительное влияние матрикса на закрепление клеток в месте инъекции. В данной работе для фиксации клеток в миокарде в качестве матрикса использовали коммерчески доступный препарат Matrigel™ (представляющий собой экстракт компонентов базальной мембраны). Для отработки модели интрамиокардиальной трансплантации полученных кардиомиоцитов, а также для предварительной оценки возможности сохранения электрофизиологической активности трансплантированных клеток в сердце были выбраны лабораторные мини-свиньи стандартных размеров, поскольку данные животные наиболее сходны с человеком по морфологии и функционированию сердечно-сосудистой системы. Контрольной группе животных делали инъекцию физиологического раствора с целью изучения состояния миокарда после механических повреждений в ходе экспериментальной операции.

По данным стимуляционного картирования эктопических событий из зон интрамиокардиальной инъекции выявлено не было, у двух свиней была отмечена экстрасистолия из зоны выходного отдела правого желудочка, набравшая 4 балла, что не соответствовало интраоперационным зонам стимуляции. Послеоперационный период у всех экспериментальных животных проходил без осложнений.

При оценке влияния интрамиокардиальной инъекции на состояние тканей сердца экспериментального животного методом окрашивания гистологических препаратов гематоксилином и эозином (рис. 3) как в опытной, так и в контрольной группах животных были отмечены небольшие отдельные участки формирующегося заместительного фиброза с очаговой лимфоцитарной инфильтрацией. В периинъекционной зоне исследуемой ткани имелись некротически измененные микроучастки, содержащие большое количество клеток мононуклеарного ряда и незначительное число гистиоцитов. Материал сердечной мышцы в основном был представлен миокардом с мышечными волокнами равномерной толщины. Внутримиокардиальные артериолы сохраняли свое

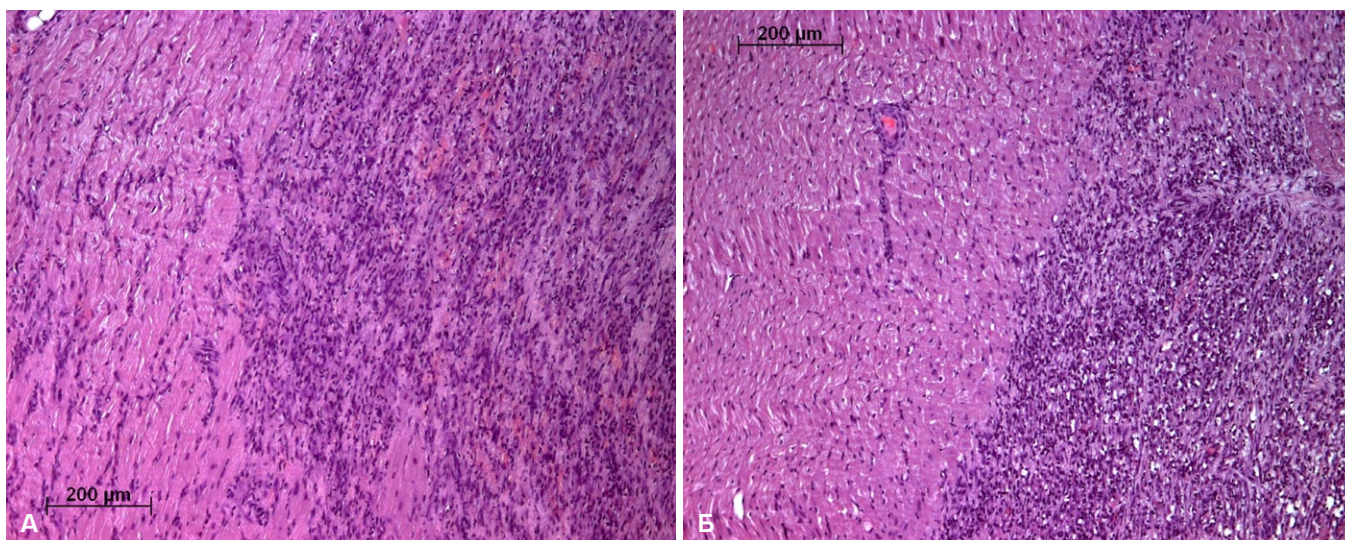


Рис. 3. Участки миокарда мини-свиньи на 5 сут. после интрамиокардиальной инъекции. Окраска: гематоксилин и эозин. Масштабный отрезок: 200 мкм

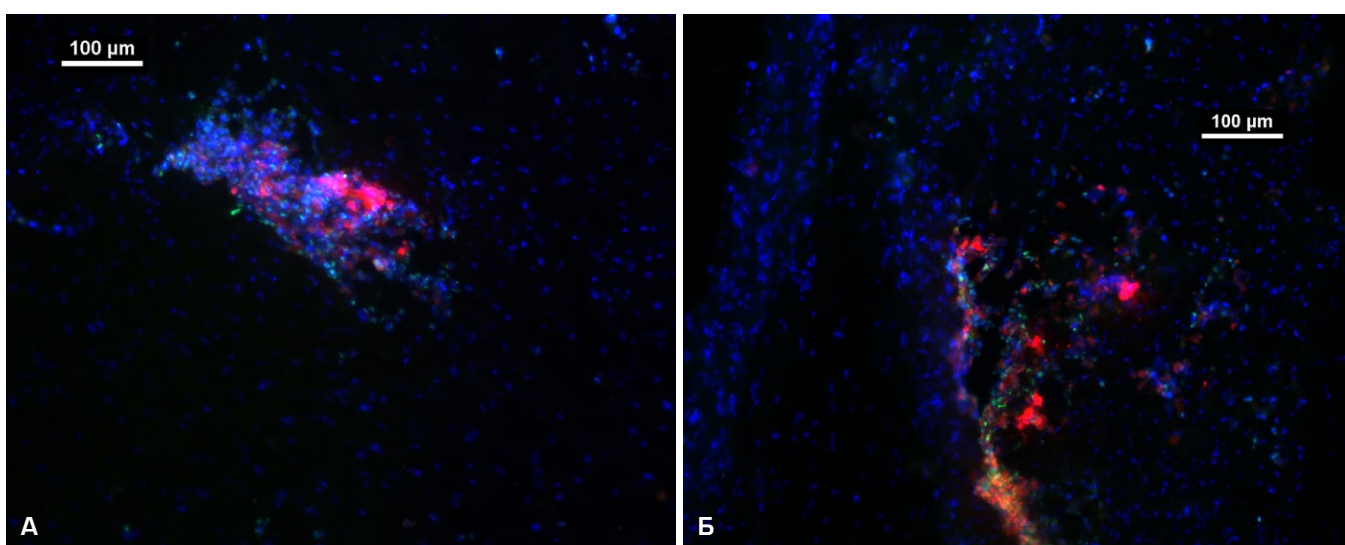


Рис. 4. Участки миокарда мини-свиньи на 5 сут. после интрамиокардиальной инъекции. Иммунофлуоресцентное окрашивание криосрезов сердца антителами против HNA (зеленый), трансплантированные клетки окрашены CellTracker™ Red (красный), клеточные ядра — DAPI (синий). Масштабный отрезок: 100 мкм

строение, имели свободный просвет, в перикапиллярных сосудах наблюдались скопления эритроцитов. Выявленные изменения являются начальными признаками репаративных процессов в виде формирования соединительной ткани. Качественных различий в морфо-гистохимических особенностях миокарда между контрольной и опытной группами животных выявлено не было, из чего можно сделать вывод, что воспаление и последующее формирование фиброзной ткани в зоне интрамиокардиальной инъекции клеток представляет собой стереотипную реакцию организма животного и связано только с самой процедурой экспериментальной операции.

С помощью иммунофлуоресцентного окрашивания криосрезов фрагментов сердца антителами к белку HNA, специфично связывающимися с человеческим ядерным антигеном, было показано наличие кардиомиоцитов человека в миокарде экспериментальных животных через 5 сут. после проведения трансплантации (рис. 4).

Отсутствие эктопической электрофизиологической активности в месте введения клеток, вероятно, указывает на необходимость увеличения продолжительности

эксперимента для более полного формирования межклеточных связей трансплантированного материала с клетками миокарда реципиента, большей дозировки препаратов для иммуносупрессии, а также отработке протокола получения культуры кардиомиоцитов с повышенным содержанием пейсмекерных клеток.

В результате проведенного экспериментального исследования были получены данные, свидетельствующие о безопасности отработанного нами метода трансплантации дифференцированных из ИПСК человека кардиомиоцитов, обладающих пейсмекерной активностью, в сердце животного с использованием матригеля в качестве носителя. Данный метод может быть в дальнейшем полезен для повышения эффективности трансплантации тканеинженерного биологического водителя ритма.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ 16-15-10322 «Разработка научных подходов создания пейсмекерных клеток человека с целью замещения функции проводящей системы сердца, используя матрицы из полимерного нановолокна».

ЛИТЕРАТУРА:

1. Boyett M.R., Honjo H., Kodama I. The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovasc. Res.* 2000; 47(4): 658–87.
2. Chugh S.S., Reinier K., Teodorescu C. et al. Epidemiology of sudden cardiac death: clinical and research implication. *Prog. Cardiovasc.* 2008; 51: 213–28.
3. Adan V., Crown L.A. Diagnosis and treatment of sick sinus syndrome. *Am. Fam. Physician.* 2003; 67: 1725–32.
4. Inoue S., Shinohara F., Sakai T. et al. Myocarditis and arrhythmia: a clinico-pathological study of conduction system based on serial section in 65 cases. *Jpn. Circ. J.* 1989; 53: 49–57.
5. Milano A., Vermeer A.M., Lodder E.M. et al. HCN4 mutations in multiple families with bradycardia and left ventricular noncompaction cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2014; 64: 745–56.
6. Balijepalli R.C., Kamp T.J. Caveolae, ion channels and cardiac arrhythmias. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2008; 98: 149–60.
7. Lei M., Zhang H., Grace A.A. SCN5A and sinoatrial node pacemaker function. *Cardiovasc. Res.* 2007; 74: 356–65.
8. Poole J.E., Gleva M.J., Mela T. et al. Complication rates associated with pacemaker or implantable cardioverter-defibrillator generator replacements and upgrade procedures clinical perspective: results from the REPLACE Registry. *Circulation* 2010; 122(16): 1553–61.
9. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131(5): 861–72.
10. Boheler K.R., Czyn J., Tweedie D. et al. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ. Res.* 2002; 91(3): 189–201.
11. Lian X., Zhang J., Azarin S.M. et al. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions. *Nat. Protoc.* 2013; 8(1): 162–75.
12. Zhang H., Lau D.H., Shlapakova I.N. et al. Implantation of sinoatrial node cells into canine right ventricle: biological pacing appears limited by the substrate. *Cell Transplant.* 2011; 20: 1907–14.
13. Zhang L., Li X., Yu X. et al. Construction of vascularized pacemaker tissues by seeding cardiac progenitor cells and endothelial progenitor cells into Matrigel. *Life Sciences* 2017; 179: 139–46.
14. Xia X., Li J., Xia B. et al. Matrigel scaffold combined with Ad-hBMP7-transfected chondrocytes improves the repair of rabbit cartilage defect. *Exp. Ther. Med.* 2017; 13(2): 542–50.
15. Burridge P.W., Matsa E., Shukla P. et al. Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nature methods* 2014; 11(8): 855–60.
16. Худяков А.А., Куралеев Д.И., Костарева А.А. и др. Сравнение эффективности методов получения функционально активных кардиомиоцитов человека. *Гены и Клетки* 2013; 8(2): 47–55.
17. Милевская Е.А., Немудрый А.А., Чепелева Е.В. и др. Оптимизация протокола интрамиокардиальной трансплантации с использованием люминесценции кардиальных мезенхимальных клеток, маркированных экспрессией люциферазы. *Патология кровообращения и кардиохирургия* 2015; 19(4–2): 69–77.
18. Павлова С.В., Леонова Е.А., Чепелева Е.В. и др. Мониторинг трансплантации кардиальных клеток в зону ишемического повреждения миокарда с использованием люциферазной репортерной системы. *Гены и Клетки* 2017; 12(4): 69–75.

Поступила: 17.09.2018