

# Фотоуправляемый тканеинженерный биологический кардиостимулятор: доказательство концепции на *ex vivo* модели сердца крысы

В.Д. Джабраилов<sup>1,2</sup>, А.А. Бричагина<sup>2</sup>, Д.В. Кононова<sup>2</sup>, Е.А. Турчанинова<sup>1,2</sup>, М.М. Слотвицкий<sup>1,2,3</sup>, В.А. Цвеляя<sup>1,2,3</sup>, К.И. Агладзе<sup>1,2,3</sup>, А.Б. Романов<sup>1</sup>

**Для корреспонденции:** Виталий Дмитриевич Джабраилов, [dzhabrailov.vd@phystech.edu](mailto:dzhabrailov.vd@phystech.edu)

Поступила в редакцию 11 ноября 2025 г. Исправлена 4 декабря 2025 г. Принята к печати 10 декабря 2025 г.

**Цитировать:** Джабраилов В.Д., Бричагина А.А., Кононова Д.В., Турчанинова Е.А., Слотвицкий М.М., Цвеляя В.А., Агладзе К.И., Романов А.Б. Фотоуправляемый тканеинженерный биологический кардиостимулятор: доказательство концепции на *ex vivo* модели сердца крысы. *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2025;29(4):33-43. <https://doi.org/10.21688/1681-3472-2025-4-33-43>

## Финансирование

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 25-65-00037 от 22 мая 2025 г.).

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Вклад авторов

Концепция и дизайн работы: М.М. Слотвицкий, В.А. Цвеляя, К.И. Агладзе, А.Б. Романов

Сбор и анализ данных: В.Д. Джабраилов, А.А. Бричагина, Д.В. Кононова, Е.А. Турчанинова, М.М. Слотвицкий

Статистическая обработка данных: В.Д. Джабраилов, Е.А. Турчанинова, М.М. Слотвицкий

Написание статьи: В.Д. Джабраилов, А.А. Бричагина, Д.В. Кононова, Е.А. Турчанинова

Исправление статьи: М.М. Слотвицкий, В.А. Цвеляя, К.И. Агладзе, А.Б. Романов

Утверждение окончательного варианта статьи: все авторы

## ORCID

В.Д. Джабраилов,

<https://orcid.org/0009-0004-7154-386X>

А.А. Бричагина, <https://orcid.org/0009-0005-6673-3201>

Д.В. Кононова, <https://orcid.org/0009-0002-7631-2126>

Е.А. Турчанинова, <https://orcid.org/0009-0003-8165-2595>

М.М. Слотвицкий, <https://orcid.org/0000-0003-2237-4217>

В.А. Цвеляя, <https://orcid.org/0000-0002-3554-9736>

К.И. Агладзе, <https://orcid.org/0000-0002-9258-436X>

А.Б. Романов, <https://orcid.org/0000-0002-6958-6690>

© Джабраилов В.Д., Бричагина А.А., Кононова Д.В., Турчанинова Е.А., Слотвицкий М.М., Цвеляя В.А., Агладзе К.И., Романов А.Б., 2025

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Российская Федерация

<sup>2</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Москва, Российская Федерация

<sup>3</sup> Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», Москва, Российская Федерация

## Аннотация

**Актуальность.** Нарушения сердечного ритма, включая дисфункцию синусового узла и атриовентрикулярную блокаду, остаются серьезной проблемой современной кардиологии. Традиционные электрокардиостимуляторы, несмотря на эффективность, характеризуются рядом ограничений – инвазивностью, риском инфекций, механических осложнений и ограниченным сроком службы. Развитие биоинженерных и оптогенетических технологий открывает новые перспективы в создании малоинвазивных, биосовместимых и управляемых систем стимуляции сердца. Сочетание клеточной терапии и оптогенетики позволяет создать фотоуправляемый извне биологический пейсмейкер, лишенный ключевых недостатков традиционных устройств.

**Цель.** Получение фоточувствительных клеточных патчей и дальнейшее изучение их функциональности в качестве фотоуправляемого тканеинженерного биологического пейсмейкера на модели сердца крысы *ex vivo*.

**Методы.** Нами создан клеточно-инженерный конструктор: кардиомиоциты человека (полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток) или кардиомиоциты крысы в неонатальном периоде развития, экспрессирующие каналный родопсин-2, нанесенные на волокна из биосовместимой поли-L-молочной кислоты с коллагеном, покрытые белком фибронектином. Моделью для тестирования служило изолированное сердце крысы с поддержанием его временной жизнеспособности *ex vivo*. Для регистрации активности использовали оптическое картирование кальциевой активности.

**Результаты.** Через 35 мин после имплантации патча зафиксировано установление функционального контакта с миокардом. Фотостимуляция вызывала устойчивое повышение частоты сердечных сокращений, подтвержденное анализом стохастического доминирования. Эксперименты *in vitro* на клеточной культуре доказали работоспособность каналного родопсина-2 при освещении светом с длиной волны 470 нм.

**Заключение.** Исследование успешно демонстрирует работоспособность полного цикла технологии – от генетической модификации клеток до управления сокращениями целого органа. Это значительный шаг в развитии адресных и безопасных методов временной кардиостимуляции будущего. Полученные результаты подтверждают принципиальную реализуемость гибридного фотоуправляемого подхода и закладывают основу для дальнейших исследований по разработке безопасных, управляемых и биосовместимых систем кардиостимуляции нового поколения.

**Ключевые слова:** биологический пейсмейкер; биосовместимые волокна; каналный родопсин-2; кардиомиоциты; фотоуправляемая стимуляция



# An optogenetic tissue-engineered cardiac pacemaker: demonstration of principle in an isolated rat heart

Vitalii D. Dzhabrailov<sup>1,2</sup>, Alina A. Brichagina<sup>2</sup>, Daria V. Kononova<sup>2</sup>, Elena A. Turchaninova<sup>1,2</sup>, Mihail M. Slotvitsky<sup>1,2,3</sup>, Valeriya A. Tsvelaya<sup>1,2,3</sup>, Konstantin I. Agladze<sup>1,2,3</sup>, Alexander B. Romanov<sup>1</sup>

**Corresponding author:** Vitalii D. Dzhabrailov,  
[dzhabrailov.vd@phystech.edu](mailto:dzhabrailov.vd@phystech.edu)

Received 11 November 2025. Revised 4 December 2025. Accepted 10 December 2025.

**How to cite:** Dzhabrailov V.D., Brichagina A.A., Kononova D.V., Turchaninova E.A., Slotvitsky M.M., Tsvelaya V.A., Agladze K.I., Romanov A.B. An optogenetic tissue-engineered cardiac pacemaker: demonstration of principle in an isolated rat heart. *Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokhirurgiya = Circulation Pathology and Cardiac Surgery*. 2025;29(4):33-43. (In Russ.) <https://doi.org/10.21688/1681-3472-2025-4-33-43>

## Funding

The research was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (grant No. 25-65-00037 dated May 22, 2025)

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## Contribution of the authors

Conception and study design: M.M. Slotvitsky, V.A. Tsvelaya, K.I. Agladze, A.B. Romanov

Data collection and analysis: V.D. Dzhabrailov, A.A. Brichagina, D.V. Kononova, E.A. Turchaninova, M.M. Slotvitsky

Statistical analysis: V.D. Dzhabrailov, E.A. Turchaninova, M.M. Slotvitsky

Drafting the article: V.D. Dzhabrailov, A.A. Brichagina, D.V. Kononova, E.A. Turchaninova

Critical revision of the article: M.M. Slotvitsky, V.A. Tsvelaya, K.I. Agladze, A.B. Romanov

Final approval of the version to be published: V.D. Dzhabrailov, A.A. Brichagina, D.V. Kononova, E.A. Turchaninova, M.M. Slotvitsky, V.A. Tsvelaya, K.I. Agladze, A.B. Romanov

## ORCID

V.D. Dzhabrailov, <https://orcid.org/0009-0004-7154-386X>

A.A. Brichagina, <https://orcid.org/0009-0005-6673-3201>

D.V. Kononova, <https://orcid.org/0009-0002-7631-2126>

E.A. Turchaninova, <https://orcid.org/0009-0003-8165-2595>

M.M. Slotvitsky, <https://orcid.org/0000-0003-2237-4217>

V.A. Tsvelaya, <https://orcid.org/0000-0002-3554-9736>

K.I. Agladze, <https://orcid.org/0000-0002-9258-436X>

A.B. Romanov, <https://orcid.org/0000-0002-6958-6690>

© 2025 Dzhabrailov et al.

<sup>1</sup> Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>2</sup> Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup> M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow, Russian Federation

## Abstract

**Background:** Heart rhythm disturbances remain a serious problem in modern cardiology. Traditional pacemakers have certain limitations including invasiveness, risk of infection, mechanical complications, and a limited service life. Advances in bioengineering and optogenetics technologies offers new prospects for the production of minimally invasive, biocompatible, and controllable cardiac pacing systems. The combination of cell therapy and optogenetics enables to create a photo-controlled biological pacemaker, free from the key drawbacks of traditional devices.

**Objective:** The aim of this study was to produce photosensitive cellular patches and to further investigate their functionality as an optogenetic tissue-engineered pacemaker in an ex vivo rat heart model.

**Methods:** We engineered a cell-based construct using either human cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells or neonatal rat cardiomyocytes expressing channelrhodopsin-2. These cells were seeded onto fibrous scaffolds made of poly-L-lactic acid and collagen, coated with fibronectin. The testing model was an isolated, temporarily maintained ex vivo rat heart. Optical mapping of calcium activity was used to record cardiac electrophysiology.

**Results:** Functional coupling between the implanted patch and the host myocardium was observed 35 minutes after implantation. Photostimulation reliably increased the heart rate, which was confirmed by stochastic dominance analysis. The experiments in vitro on cell cultures demonstrated the operational capacity of channelrhodopsin-2 upon illumination with 470 nm light.

**Conclusion:** This study successfully demonstrates a complete technology cycle, from the genetic modification of cells to the control of contractions in a whole organ. It represents a significant step towards developing targeted and safe methods for future temporary cardiac pacing. Our results confirm the fundamental feasibility of a hybrid optogenetic approach and lay the groundwork for further research into creating safe, controllable, and biocompatible next-generation pacemaker systems.

**Keywords:** biocompatible fibers; biological pacemaker; cardiomyocytes; channelrhodopsin-2; photo-guided stimulation



## Введение

Нарушения сердечного ритма, такие как дисфункция синусового узла, атриовентрикулярная блокада, остаются одной из наиболее значимых проблем в современной кардиологии. «Золотым стандартом» их коррекции является имплантация искусственного электрокардиостимулятора. Несмотря на надежность и эффективность, эти устройства имеют существенные недостатки: инвазивность установки, риск инфекционных осложнений, механического повреждения ткани и ограниченный срок службы батареи.

Эволюция кардиостимуляции направлена на преодоление этих ограничений. Одним из перспективных направлений является создание малоинвазивных и биорезорбируемых устройств [1; 2]. Недавно была продемонстрирована беспроводная фотостимуляция сердца с помощью имплантированных кремниевых структур, преобразующих свет в локализованные электрохимические токи [3]. Параллельно развиваются принципиально иные подходы. В частности, были разработаны миллиметровые стимуляторы [4], которые получают питание беспроводным способом и полностью рассасываются в организме после выполнения своей функции, что исключает необходимость их извлечения. Такие устройства особенно востребованы для временной стимуляции сердца в послеоперационном периоде. Недостатками таких кардиостимуляторов (помимо недостатков обычных кардиостимуляторов: инвазивность, риск инфекций, формирование фиброзной ткани) являются ограниченный срок работы из-за свойств биорезорбируемых материалов и возможная нестабильность параметров стимуляции при их разложении. Беспроводная передача энергии может быть чувствительной к положению устройства и внешним помехам. Кроме того, технология пока остается дорогостоящей и требует дальнейших клинических исследований.

Параллельно развиваются принципиально иные, биологические подходы. Концепция биологического пейсмейкера предполагает создание водителя ритма на основе клеточной терапии или генной инженерии. Ключевыми направлениями здесь являются использование эмбриональных кардиомиоцитов [5; 6], мезенхимальных стволовых клеток или индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, трансфицированных генами ионных каналов (например, HCN2 [7]), а также прямое репрограммирование кардиомиоцитов иного типа или миоцитов с помощью гена TBX18 [8] в пейсмейкерные кардиомиоциты.

Особый интерес представляет объединение методов оптогенетики и клеточной терапии. Фотоуправляемая стимуляция, использующая введение в возбудимые клетки светочувствительных ионных каналов, таких как каналный родопсин-2 (Channelrhodopsin-2, ChR2), позволяет с высочайшей пространственно-временной точностью контролировать активность сердечной ткани [9–11]. Успешное применение этого метода было продемонстрировано на модельных организмах, включая дрозофилу [12] и крыс [10], где с помощью стимуляции синим светом удавалось не только задавать частоту сокращений, но и проводить ресинхронизирующую терапию [10].

Современные исследования направлены на интеграцию этих технологий. Перспективной является концепция гибридного оптического биологического пейсмейкера, который сочетает клеточную терапию для создания биологической проводящей ткани и оптогенетику для ее внешнего контроля. Это позволит объединить преимущества биологической интеграции (потенциальный рост с организмом, физиологичность) с возможностью точного внешнего управления.

Несмотря на значительный прогресс в развитии как электронных, так и биологических методов кардиостимуляции, ключевая задача создания управляемого, эффективно интегрирующегося и долговечного биологического пейсмейкера, лишенного недостатков устройств на основе жесткой электроники, остается нерешенной. Мы предположили, что гибридный конструкт, сочетающий кардиомиоциты, экспрессирующие каналный родопсин-2, и биосовместимый полимерный носитель, сможет функционировать в качестве управляемого светом водителя ритма и устанавливать функциональный электрофизиологический контакт с тканью реципиента.

Целью настоящего исследования было изучение работы оптического биологического пейсмейкера на сердцах малых лабораторных животных. В работе использовались как неонатальные крысиные желудочковые кардиомиоциты, так и кардиомиоциты человека, дифференцированные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК). Клеточные культуры модифицировали для экспрессии канального родопсина-2 (ChR2), а также сажали на полимерные биосовместимые носители для более эффективного приживления кардиомиоцитов [13]. Тестирование функциональной эффективности данной конструкции на изолированном сердце крысы с фотостимуляцией позволяет исследовать установление электрофизиологического контакта между трансплантатом и тканью реципиента.

## Методы

### Этические положения

Все манипуляции с животными проводили в соответствии с Руководством Национального института здравоохранения по уходу и использованию лабораторных животных, утвержденным Институциональной комиссией по уходу и использованию животных Московского областного научно-исследовательского клинического института им. М.Ф. Владимирского (протокол № 7 от 18 апреля 2024 г.) и Временной комиссией по процедурам содержания и исследования животных Научного центра по жизни Московского физико-технического института (протокол № А2-2012-09-02).

### Культура неонатальных желудочковых кардиомиоцитов крысы

Неонатальные желудочковые кардиомиоциты крыс выделяли с использованием протокола двухдневного выделения от Worthington-Biochem для неонатальных кардиомиоцитов и фибробластов крыс (<http://www.worthingtonbiochem.com/NCIS/default.html>). Вкратце это можно изложить следующим образом. Сердца извлекали из крысят в возрасте 1–4 дней и немедленно помещали в сбалансированный солевой раствор Хэнкса (Gibco, США) без  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$ , на лед. Для выделения использовали только желудочковую ткань (что составляло примерно 50–60 % исходной массы сердца), удаляя при этом синоатриальный и атриоventрикулярный узлы, а также предсердия. Выделенные желудочки измельчали и затем инкубировали при 4 °С в течение ночи в присутствии трипсина (0,25 % трипсин-ЭДТА, «ПанЭко», Россия). На второй день фрагменты тканей помещали в раствор коллагеназы (коллагеназа из гепатопанкреаса краба, 2,25 мг/мл; «Биолот», Россия) и перемешивали в течение 1 ч при 37 °С. Полученную клеточную суспензию помещали в культуральный флакон Т75 на 1 ч для разделения кардиомиоцитов и фибробластов. Клетки, прикрепившиеся к дну флакона, считали фибробластами, а оставшиеся в суспензии – кардиомиоцитами. После этого суспензию кардиомиоцитов переносили на заранее подготовленные полимерные волокнистые каркасы.

### ИПСК и получение индуцированных кардиомиоцитов человека

В данной работе использовали клеточную линию индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека iSMA6L, описанную ранее в [14]. Данная линия была полностью охарактеризована с точки зрения плюрипотентности.

Направленную дифференцировку из клеток iSMA6L в кардиомиоциты проводили в соответствии с модифицированным протоколом [15]. До начала протокола дифференцировки ИПСК рассаживали на подложку Geltrex (Gibco, США), после чего клетки вели на среде Essential 8 (Gibco, A1517001, США). Дифференцировку инициировали добавлением 12 мкМ CHIR99021 (Sigma-Aldrich, SML1046, США) в среде RPMI 1640 Medium (Gibco, 11875093, США) с добавлением B27 без инсулина (B27 Supplement, minus insulin; Gibco, A1895601, США). Ровно через сутки после добавления CHIR99021 среду меняли на новую RPMI 1640 Medium с добавлением B27 без инсулина. На 3-и сутки дифференцировки среду меняли на смесь кондиционированной и свежей дифференцировочной среды (в соотношении 1:1), содержащую 5 мкМ IWP-2 (Sigma-Aldrich, I0536, США). На 5-е сутки среду полностью заменяли на свежую. На заключительном этапе, на 7-е сутки, среду заменяли на RPMI 1640 (Gibco, 11875093, США) с добавлением полной добавки B27 (B27 Supplement; Gibco, 17504044, США). Первые спонтанные сокращения наблюдали на 8-е сутки дифференцировки. В дальнейшем клетки культивировали в среде, содержащей инсулин. После переселения на волокнистые носители клетки культивировали в среде с добавлением 20 % фетальной бычьей сыворотки (FBS, Capricorn, США).

Индукцированные кардиомиоциты пересаживали после трансфекции на полимерные волокна на 20-й день дифференцировки. Важно отметить, что необходимо пересадить и имплантировать клетки в ткань реципиента на определенном этапе развития (неонатальном), когда они еще способны формировать функциональный синцитий и стабильно проводить волны возбуждения, без риска возникновения аритмий, что было показано в нашем исследовании ранее [16].

### Трансфекция клеточных культур

И неонатальные желудочковые кардиомиоциты крыс, и кардиомиоциты человека, полученные дифференцировкой из ИПСК, трансфицировали плазмидой, кодирующей каналальный родопсин-2 (ChR2) (плазмида № 20942; Addgene). На трансфекцию 100–200 тысяч клеток использовали 500 нг плазмидной ДНК. Плазмиду ChR2 разводили в среде Opti-MEM (Gibco, 31985062, США) до рабочей концентрации 20 мкг/мл, после чего добавляли трансфекционный реагент FuGENE HD (Promega, США) в соотношении 1:3 (ДНК : реагент). Смесь инкубировали при 22 °С в течение 15 мин, затем добавляли в лунку 24-луночного планшета с клетками и инкубировали в течение 48 ч при 37 °С.

### **Подготовка PDMS-каркасов для электроспиннинга полимерных волокон**

В качестве жестких подложек-коллекторов для электроспиннинга использовали пластины из полидиметилсилоксана (PDMS). PDMS получали путем тщательного смешивания прекурсоров – Sylgard 184 Silicone Elastomer Base и Sylgard 184 Curing Agent (Dow Corning, США) – в массовом соотношении 10:1 в течение 10 мин. Полученную смесь заливали в чашку Петри диаметром 10 см, формируя слой толщиной около 3 мм. Затем PDMS отверждали в сушильном шкафу при 70 °C в течение 24 ч. После отверждения из полученного листа PDMS вырезали заготовки нужной формы, которые использовали в качестве основ.

### **Электроспиннинг полимерных волокон на PDMS-каркасы**

Рабочий раствор для электроспиннинга готовили, растворяя полимерную смесь (90 % поли-L-молочной кислоты (PLLA, Sigma-Aldrich, GF24762887, США) и 10 % коллагена) в гексафторизопропаноле («ПИМ-Инвест», Россия) до конечной концентрации 10 % (мас./об.). Приготовленный раствор загружали в шприц объемом 3 мл с тупоконечной иглой калибра 20G и подвергали электроспиннингу на установке Nanon-01 (MECC Co., Ltd, Япония). Процесс проводили при напряжении 7 кВ между иглой и заземленным коллектором и скорости подачи раствора 0,5 мл/ч (с помощью программируемого шприцевого насоса Fusion 100). Волокна осаждали непосредственно на предварительно подготовленные PDMS-каркасы. После формирования волокнистого слоя конструкцию обрабатывали фибронектином («ПанЭко», Н Фе, Россия) для улучшения адгезивных свойств поверхности.

### **Протокол перфузии сердца**

Всех животных анестезировали в смеси изофлурана с кислородом на установке R500 (RWD Life Science, США) для анестезии малых животных и умерщвляли путем цервикальной дислокации [17]. Изолированное сердце промывали теплым раствором Тироде, содержащим гепарин (50 МЕ/мл). В аорту вводили и фиксировали хирургической лигатурой канюлю 18G. Интервал между изоляцией сердца и началом перфузии не превышал 10 мин.

Перфузию по Лангендорфу проводили на установке Radnoti (ADInstruments, США) с использованием перистальтического насоса Masterflex L/S (Cole-Parmer, США) со скоростью потока 1 мл/мин. Общий объем перфузата составлял 50 мл. Для поддержания температуры перфузата на уровне 37 °C использовали водяную

баню Polystat (Cole-Parmer, США) и термостатируемую подставку (Tokai Hit, Япония).

В качестве перфузата применяли раствор Тироде, дополненный HEPES (Sigma-Aldrich Co., США) для стабилизации pH на уровне 7,4, и кардиоплегический раствор «Нормакор» (АО «КСФ», Россия) в соотношении 4:1 (раствор Тироде : «Нормакор») для продления жизнеспособности препарата. Перфузат постоянно насыщали газовой смесью (95 % O<sub>2</sub> и 5 % CO<sub>2</sub>). Концентрацию растворенного кислорода контролировали с помощью оксиметра (Cole-Parmer Instrument Company, США).

### **Оптическое картирование**

Для клеточных культур оптическое картирование с использованием красителя Fluo-4 AM (Lumiprobe, 1892-500 µg, Россия) выполняли в растворе Тироде (pH 7,25–7,40) по протоколу, аналогичному приведенному в [18]. Сигнал регистрировали с разрешением 1920×1080 пикселей и частотой съемки 16,959 кадра в секунду (флуоресцентный микроскоп Olympus Co. (Япония) с камерой SVBONY SV305M Pro (Китай)).

Для изолированных сердец съемку проводили при временной остановке перфузии. Сигнал записывали с разрешением 128×128 пикселей и частотой съемки 130 кадров в секунду (микроскоп Olympus MVX-10 Macro-View (Япония) с камерой Andor iXon-3 EMCCD (Великобритания)).

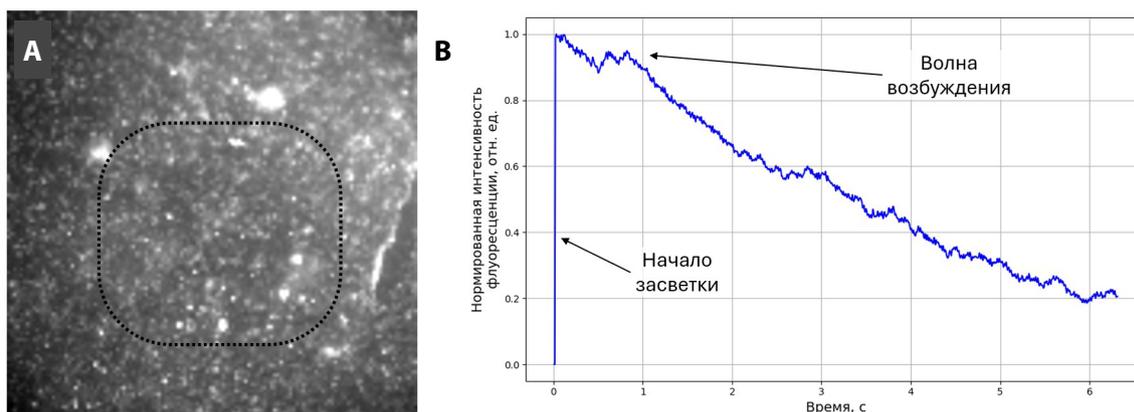
Во всех экспериментах температуру поддерживали на уровне 37 °C.

### **Обработка данных**

Первичную обработку данных оптического картирования выполняли в программе ImageJ (v. 1.54r). Для дальнейшего статистического анализа и построения графиков зависимости интенсивности флуоресценции от времени данные предварительно обрабатывали в Microsoft Excel, а затем анализировали с использованием Python (v. 3.11.13) и библиотек Matplotlib (v. 3.10.0), NumPy (v. 2.0.2), SciPy (v. 1.15.3) и Pandas (v. 2.2.2). Статистический анализ включал построение эмпирических функций распределения с помощью библиотеки Matplotlib.

### **Результаты**

Были проведены эксперименты по созданию модели биологического кардиостимулятора на основе фоточувствительных кардиомиоцитов. Неонатальные желудочковые кардиомиоциты крысы были трансфицированы для экспрессии канального родопсина-2 (ChR2). Таким образом мы получили фоточувствительные кардиомиоциты, способные



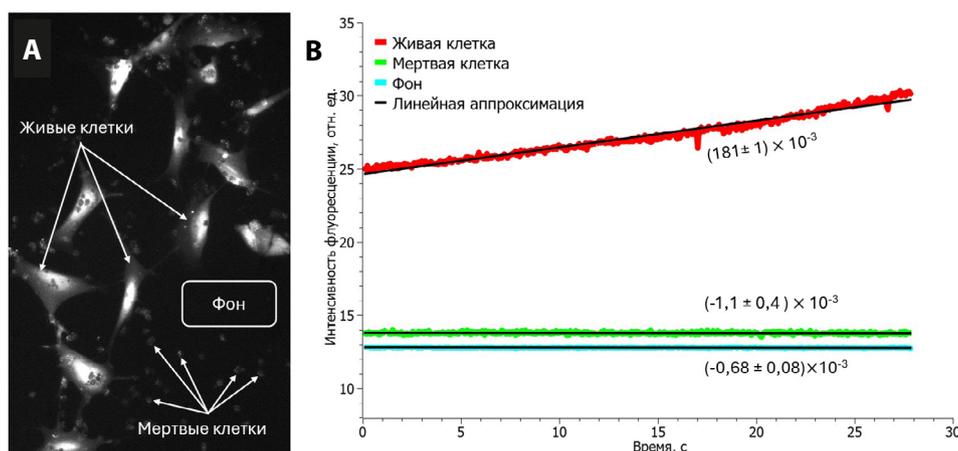
**Рис. 1.** Функциональная проверка экспрессии канального родопсина-2 в неонатальных кардиомиоцитах крысы: А – оптическое картирование клеточного монослоя, пунктиром обозначена область анализа; В – нормированная динамика кальциевой флуоресценции при фотостимуляции

генерировать потенциал действия в ответ на стимуляцию синим светом. Впоследствии данные клетки были высеяны на тонкие биосовместимые волокна из поли-L-молочной кислоты (PLLA), закрепленные на П-образном каркасе. Таким образом был получен фоточувствительный клеточно-инженерный патч, который использовался в дальнейших экспериментах.

Для оценки экспрессии ChR2 и функциональной активности трансфицированных кардиомиоцитов было проведено оптическое картирование данной культуры. Клетки были окрашены кальций-зависимым красителем Fluo-4 AM. Таким образом, при открытии канального родопсина под воздействием синего света (470 нм) происходит вход ионов в клетку, что приводит к повышению внутриклеточной концентрации кальция и соответственно увеличению интенсивности флуоресценции красителя. На рис. 1 представлены

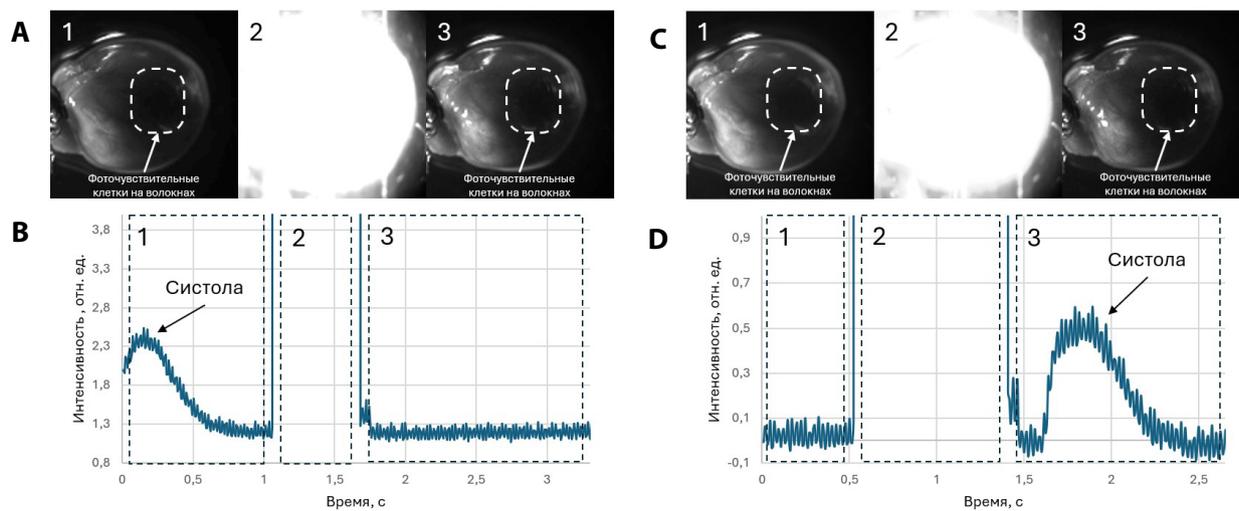
результаты проведенного оптического картирования. Показано, что после начала фотостимуляции культура отвечает на это повышением уровня флуоресценции. Это свидетельствует о повышении внутриклеточной концентрации кальция и, как следствие, о генерации клетками потенциала действия.

Была показана принципиальная возможность создания модели биологического кардиостимулятора на основе неонатальных кардиомиоцитов крысы. Однако клетки животного происхождения невозможно применять при разработке прототипов для клинического использования. Поэтому в ходе работы была отработана методика получения кардиомиоцитов человека, дифференцированных из ИПСК, и их трансфекции для экспрессии канального родопсина-2.



**Рис. 2.** Оптогенетическая модификация кардиомиоцитов человека, дифференцированных из ИПСК: А – оптическое картирование культуры при фотостимуляции; В – динамика кальциевой флуоресценции в живых клетках, мертвых клетках и фоне с линейной аппроксимацией

*Примечание.* ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.



**Рис. 3.** Динамика формирования функционального контакта между клеточным патчем и изолированным сердцем крысы: А, С – фотографии сердца до, во время и после фотостимуляции сразу (А) и через 34 мин (С) после имплантации; В, D – соответствующие графики интенсивности свечения сердца

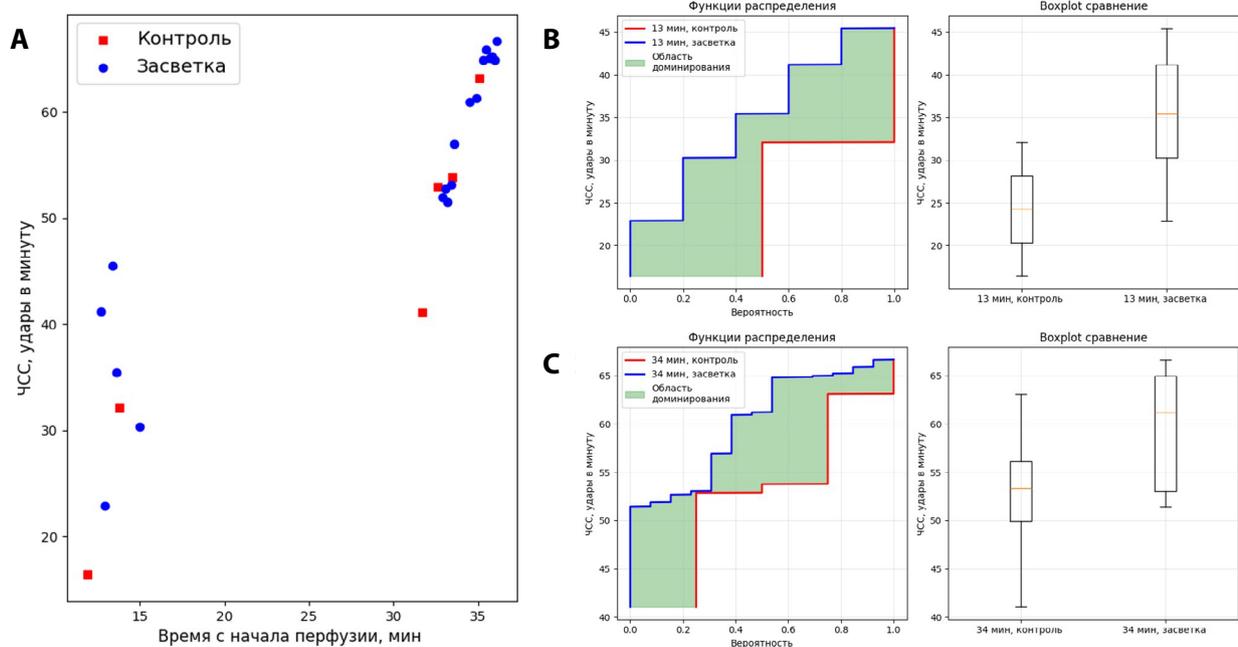
На рис. 2 представлены результаты оптического картирования таких клеток. Показано значительное повышение флуоресценции в популяции живых клеток (красный график на рис. 2, В) по сравнению с сигналом от мертвых клеток (зеленый график на рис. 2, В) или фоновой флуоресценцией (бирюзовый график на рис. 2, В). Интенсивность флуоресценции живых клеток растет с коэффициентом наклона  $(181 \pm 1) \cdot 10^{-3}$  отн. ед./с, в отличие от падения флуоресценции для других объектов. Это свидетельствует о повышении внутриклеточной концентрации кальция (т.е. об открытии канального родопсина) при освещении синим светом. Сигнал от мертвых клеток же демонстрирует только уменьшение интенсивности флуоресценции (обусловленное, вероятно, фотообесцвечиванием красителя):  $(-1,1 \pm 0,4) \cdot 10^{-3}$  отн. ед./с. Это ожидаемо, поскольку мертвые клетки не способны поддерживать ионные градиенты из-за нарушения целостности плазматической мембраны. Даже при наличии в мембране каналородопсинов их активация не приведет к направленному транспорту ионов, так как электрохимический градиент для кальция нарушен. Поэтому единственный наблюдаемый эффект – монотонное уменьшение сигнала вследствие фотообесцвечивания. Фон также демонстрирует аналогичное снижение интенсивности флуоресценции:  $(-0,68 \pm 0,08) \cdot 10^{-3}$  отн. ед./с. Данные результаты подтверждают возможность получения фоточувствительных кардиомиоцитов человека.

После проверки эффективности трансфекции были проведены *ex vivo* эксперименты на изолированном

сердце крысы с использованием полученных клеточно-инженерных патчей. Сердце перфузировали по Лангендорфу. Затем патч имплантировали на поверхность сердца: волокнистый слой с клетками, закрепленный на PDMS-каркасе, помещали на эпикард, после чего каркас аккуратно отделяли по периметру и удаляли, оставляя на миокарде только волокна с клетками.

Непосредственно после имплантации была зарегистрирована сократительная активность сердца (рис. 3, А, В). На рис. 3, В показано, что сердце сокращается спонтанно и асинхронно с патчем (область 1). После засветки патча синим светом (область 2) у сердца не наблюдается дополнительных сокращений, индуцированных стимулом (область 3). Это указывает на отсутствие функционального электрофизиологического контакта в начальный момент.

Спустя некоторое время после имплантации установилось электрофизиологическое взаимодействие между имплантированными клетками и тканью перфузируемого сердца, что позволило стимулировать сердце оптически. Для подтверждения этого была повторно проведена фотостимуляция сердца с имплантированным конструктом светом с длиной волны 470 нм (рис. 3, С, D). На рис. 3, D показано, что сразу после засветки (область 2) возникает систола (область 3), которая синхронизирована со стимулом. Это демонстрирует, что имплантированные фоточувствительные кардиомиоциты, интегрировавшись, стали функционировать



**Рис. 4.** Эффективность фотоуправления сердечным ритмом: А – динамика частоты сердечных сокращений в ходе эксперимента; В, С – анализ стохастического доминирования и сравнение средних значений частоты сердечных сокращений при фотостимуляции и в контроле через 13 (В) и 34 (С) мин после имплантации

*Примечание.* ЧСС – частота сердечных сокращений.

в качестве управляемого светом биологического водителя ритма.

Также по результатам проведенного эксперимента были проанализированы частоты сокращений изолированного сердца. Результаты представлены на рис. 4, А. Показано, что при оптической стимуляции синим светом наблюдается тенденция к увеличению частоты сердечных сокращений (ЧСС).

Для статистической оценки этого эффекта был проведен анализ стохастического доминирования. Сравнивались распределения ЧСС в условиях стимуляции синим светом (экспериментальная выборка) и без него (контрольная выборка).

На рис. 4, В представлены результаты анализа для данных, полученных через 13 мин после имплантации конструкта. На левой панели рис. 4, В показано, что эмпирическая функция распределения для экспериментальной выборки стохастически доминирует над таковой для контрольной выборки на всей области значений. На правой панели рис. 4, В также видно увеличение среднего значения ЧСС в экспериментальной выборке по сравнению с контрольной.

Сходные результаты были получены при анализе данных, зарегистрированных через 34 мин после имплантации (рис. 4, С). На левой панели рис. 4, С

вновь наблюдается стохастическое доминирование экспериментальной выборки над контрольной. На правой панели подтверждается увеличение среднего значения ЧСС при фотостимуляции.

## Обсуждение

В ходе проведенного исследования была продемонстрирована принципиальная возможность управления сокращениями миокарда с помощью оптогенетически модифицированных кардиомиоцитов. Мы подтвердили, что после трансфекции в неонатальных кардиомиоцитах крысы функционально экспрессируется ионный канал, активируемый светом с длиной волны 470 нм, что делает возможной их фотостимуляцию. На этой основе была реализована модель фотоуправляемого клеточно-инженерного патча. Кроме того, была успешно проведена трансфекция кардиомиоцитов человека, дифференцированных из ИПСК. Этот результат открывает перспективы для создания персонализированных биологических водителей ритма, совместимых с тканями пациента и способных к длительной интеграции в миокард. В дальнейшем планируется провести функциональную оценку таких клеток и их способности к синхронизации

с электрической активностью сердца на более сложных модельных системах *in vivo*.

В работе был разработан клеточно-инженерный конструкт на основе биodeградируемых волокон из поли-L-молочной кислоты с коллагеном, который позволил эффективно доставлять и удерживать клетки на эпикарде изолированного сердца крысы. На таком носителе потенциально могут быть использованы и другие клетки, такие как индуцированные кардиомиоциты человека, полученные из ИПСК, функциональную фоточувствительность которых мы также продемонстрировали. Полученные данные по интеграции данного патча на перфузируемое сердце крысы показывают, что неонатальные кардиомиоциты крысы, трансфицированные канальным родопсином-2 (ChR2), способны формировать функциональные электрофизиологические контакты с тканью сердца и обеспечивать фотостимулируемое повышение частоты сердечных сокращений. Это было подтверждено результатами оптического картирования целого сердца с интегрированным на него клеточным патчем, а также статистическим анализом изменения ЧСС данного сердца в ответ на синий свет. Таким образом, можно утверждать, что после имплантации разработанного патча с фоточувствительными клетками на перфузируемое сердце крысы и установления электромеханической связи клеток патча с клетками миокарда становится возможным опосредованное синим светом (470 нм) влияние на частоту сердечных сокращений. Мы показали принципиальную возможность увеличения ЧСС при фотостимуляции сердца с использованием разработанной модели фотоуправляемого тканеинженерного биологического кардиостимулятора.

Несмотря на успешное получение фоточувствительных клеток и демонстрацию их функциональности, разработанный подход имеет ряд ограничений. Главным из них является низкая проникающая способность синего света, что ограничивает глубину стимуляции и потенциальную применимость метода у крупных животных и человека. Возможными путями решения этой проблемы являются использование опсинов, активируемых светом с большей длиной волны (в том числе ближнего инфракрасного диапазона, как, например, в работе [19]), а также разработка миниатюрных имплантируемых источников света, обеспечивающих локальную фотостимуляцию [20].

Кроме того, для клинического применения фотоуправляемых тканеинженерных биологических пейсмекеров необходимо обеспечить долговременную стабильность экспрессии опсинов,

безопасность генетической модификации и контроль за возможной иммунной реакцией организма. В этом контексте использование ИПСК представляет собой особенно перспективное направление, поскольку позволяет получать аутологичные клетки и тем самым снижать риск иммунного отторжения.

Ключевым результатом нашего исследования является установление функционального электрофизиологического контакта между трансплантатом и миокардом реципиента, которое происходило в течение 30–35 мин после имплантации. Наблюдаемая нами скорость интеграции превосходит данные, описанные для многих клеточных трансплантатов без структурной поддержки, которые часто требуют нескольких дней для формирования электрофизиологически активных соединений и при этом несут высокий риск эктопической активности [21; 22]. Мы полагаем, что достигнутая быстрая интеграция является следствием двух основных факторов. Во-первых, использование биосовместимой полимерной подложки, как и в работах [23; 24], обеспечило механическую стабильность и пространственную организацию кардиомиоцитов, что облегчило их физический и, как следствие, электрический контакт с тканью сердца. Однако в отличие от исследований, где подобные подложки использовались для поддержки нативных клеток [25; 26], наша работа впервые демонстрирует их эффективность для доставки и приживания оптогенетически модифицированных кардиомиоцитов, что добавляет принципиально новую функцию – управляемость. Во-вторых, использование неонатальных кардиомиоцитов, находящихся в определенной фазе развития [27], вероятно, способствовало их высокой пластичности и способности к быстрому формированию межклеточных контактов с миокардом реципиента [23].

После периода интеграции была достигнута возможность дистанционного управления сердечным ритмом с помощью внешней фотостимуляции, что подтверждается возникновением светоиндуцированных систол и статистически значимым увеличением частоты сердечных сокращений при освещении. Анализ стохастического доминирования подтвердил надежность и воспроизводимость стимуляции в разные моменты времени эксперимента. Полученная нами возможность управлять активностью трансплантата внешним сигналом (светом) является решающим преимуществом перед подходами, основанными на спонтанно активных клеточных массах, которые, как показывают исследования, часто выступают неконтролируемыми эктопическими очагами и провоцируют аритмии [21; 22]. Наш подход

не только ускоряет интеграцию за счет использования подложки и определенного типа клеток, но и принципиально решает проблему аритмогенности, присущую многим стратегиям биологического пейсмейкинга.

Таким образом, результаты проведенного исследования демонстрируют первый успешный шаг на пути создания гибридного фотоуправляемого тканеинженерного биологического кардиостимулятора, основанного на комбинации клеточной терапии и тканевой инженерии. Доказанная возможность фотоуправления сокращениями сердца с помощью патча из модифицированных кардиомиоцитов, а также успешное получение фоточувствительных кардиомиоцитов человека из ИПСК формируют научно-технологический фундамент для последующих исследований. Эти работы будут направлены на разработку безопасных, управляемых и биосовместимых кардиостимуляторов нового поколения, лишенных ключевых недостатков традиционных электронных имплантатов.

## Заключение

На основе полученных результатов можно сделать следующие основные выводы.

1. Методы трансфекции позволили получить функциональные кардиомиоциты, экспрес-

сирующие канальный родопсин-2 (ChR2). Оптическое картирование подтвердило их способность генерировать потенциал действия в ответ на синий свет (470 нм).

2. Оптогенетически модифицированные кардиомиоциты были успешно закреплены на биосовместимых полимерных волокнах, что обеспечило механическую поддержку и возможность ускорения интеграции клеток в ткань реципиента.
3. Эксперименты на изолированном сердце крысы продемонстрировали, что имплантированный клеточный патч формирует функциональное соединение с миокардом реципиента.
4. Статистический анализ подтвердил, что после интеграции патча световая стимуляция является действенным инструментом управления сердечным ритмом, вызывая достоверное увеличение частоты сердечных сокращений.

Таким образом, исследование представляет собой экспериментальное подтверждение работоспособности концепции гибридного фотоуправляемого тканеинженерного биологического пейсмейкера, что служит важным шагом на пути к разработке принципиально новых биологически интегрированных систем для кардиостимуляции.

## Список литературы / References

1. Choi Y.S., Yin R.T., Pfenniger A., Koo J., Avila R., Benjamin Lee K., Chen S.W., Lee G., Li G., Qiao Y., Murillo-Berlioz A., Kiss A., Han S., Lee S.M., Li C., Xie Z., Chen Y.Y., Burrell A., Geist B., Jeong H., Kim J., Yoon H.J., Banks A., Kang S.K., Zhang Z.J., Haney C.R., Sahakian A.V., Johnson D., Efimova T., Huang Y., Trachiotis G.D., Knight B.P., Arora R.K., Efimov I.R., Rogers J.A. Fully implantable and bioresorbable cardiac pacemakers without leads or batteries. *Nat Biotechnol.* 2021;39(10):1228-1238. PMID: 34183859; PMCID: PMC9270064. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-00948-x>
2. Zhang J., Das R., Zhao J., Mirzai N., Mercer J., Heidari H. Battery-free and wireless technologies for cardiovascular implantable medical devices. *Adv Mater Technol.* 2022;7(6):2101086. <https://doi.org/10.1002/admt.202101086>
3. Li P., Zhang J., Hayashi H., Yue J., Li W., Yang C., Sun C., Shi J., Huberman-Shlaes J., Hibino N., Tian B. Monolithic silicon for high spatiotemporal translational photostimulation. *Nature.* 2024;626(8001):990-998. PMID: 38383782; PMCID: PMC11646366. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07016-9>
4. Zhang Y., Rytkin E., Zeng L., Kim J.U., Tang L., Zhang H., Mikhailov A., Zhao K., Wang Y., Ding L., Lu X., Lantsova A., Aprea E., Jiang G., Li S., Seo S.G., Wang T., Wang J., Liu J., Gu J., Liu F., Bailey K., Li Y.F.L., Burrell A., Pfenniger A., Ardashv A., Yang T., Liu N., Lv Z., Purwanto N.S., Ying Y., Lu Y., Hoepfner C., Melisova A., Gong J., Jeong J., Choi J., Hou A., Noland R., Bai W., Jin S.H., Ma Z., Torkelson J.M., Huang Y., Ouyang W., Arora R.K., Efimov I.R., Rogers J.A. Millimetre-scale bioresorbable optoelectronic systems for electrotherapy. *Nature.* 2025;640(8057):77-86. PMID: 40175757. <https://doi.org/10.1038/s41586-025-08726-4>
5. Ionta V., Liang W., Kim E.H., Rafie R., Giacomello A., Marbán E., Cho H.C. SHOX2 overexpression favors differentiation of embryonic stem cells into cardiac pacemaker cells, improving biological pacing ability. *Stem Cell Reports.* 2015;4(1):129-142. PMID: 25533636; PMCID: PMC4297875. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.11.004>
6. 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(7415):322-5. PMID: 22864415; PMCID: PMC3443324. <https://doi.org/10.1038/nature11317>
7. Kanani S., Pumir A., Krinsky V. Genetically engineered cardiac pacemaker: Stem cells transfected with HCN2 gene and myocytes-A model. *Physics Letters A.* 2008;372(2):141-7. <https://doi.org/10.1016/j.physleta.2007.07.075>
8. Wolfson D.W., Kim N.K., Lee K.H., Beyersdorf J.P., Langberg J.J., Fernandez N., Choi D., Zureick N., Kim T.Y., Bae S., Gu J.M., Kirschman J.L., Fan J., Sheng C.Y., Gottlieb Sen D., Mettler B., Sung J.H., Yoon Y.S., Park S.J., Santangelo P.J., Cho H.C. Transient pacing in pigs with complete heart block via myocardial injection of mRNA coding for the T-box transcription factor 18. *Nat Biomed*

- Eng. 2024;8(9):1124-41. PMID: 38698155; PMCID: PMC11410671. <https://doi.org/10.1038/s41551-024-01211-9>
9. Bruegmann T., Malan D., Hesse M., Beiert T., Fuegemann C.J., Fleischmann B.K., Sasse P. Optogenetic control of heart muscle in vitro and in vivo. *Nat Methods*. 2010;7(11):897-900. PMID: 20881965. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1512>
  10. Nussinovitch U., Gepstein L. Optogenetics for in vivo cardiac pacing and resynchronization therapies. *Nat Biotechnol*. 2015;33(7):750-4. PMID: 26098449. <https://doi.org/10.1038/nbt.3268>
  11. Joshi J., Xu B., Rubart M., Chang Y., Bao X., Chaliki H.P., Scott L.R., Zhu W. Optogenetic control of engrafted human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in live mice: A proof-of-concept study. *Cells*. 2022;11(6):951. PMID: 35326403; PMCID: PMC8946017. <http://dx.doi.org/10.3390/cells11060951>
  12. Alex A., Li A., Tanzi R.E., Zhou C. Optogenetic pacing in *Drosophila melanogaster*. *Sci Adv*. 2015;1(9):e1500639. PMID: 26601299; PMCID: PMC4646813. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500639>
  13. Aitova A., Scherbina S., Berezhnoy A., Slotvitsky M., Tsvelaya V., Sergeeva T., Turchaninova E., Rybkina E., Bakumenko S., Sidorov I., Popov M.A., Dontsov V., Agafonov E.G., Efimov A.E., Agapov I., Zybin D., Shumakov D., Agladze K. Novel molecular vehicle-based approach for cardiac cell transplantation leads to rapid electromechanical graft-host coupling. *Int J Mol Sci*. 2023;24(12):10406. PMID: 37373555; PMCID: PMC10299342. <https://doi.org/10.3390/ijms241210406>
  14. Григорьева Е.В., Валетдинова К.Р., Устьянцева Е.И., Шевченко А.И., Медведев С.Р., Мазурок Н.А., Маретина М.А., Куранова М.Л., Киселев А.В., Баранов В.С., Закиан С.М. Дифференцировка в нейральном направлении пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток от больных с наследственной формой спинальной мышечной атрофии. *Гены и Клетки*. 2016;11(2):70-81. <https://doi.org/10.23868/gc120584>  
Grigor'eva E.V., Valetdinova K.R., Ustyantseva E.I., Shevchenko A.I., Medvedev S.P., Mazurok N.A., Maretina M.A., Kuranova M.L., Kiselev A.V., Baranov V.S., Zakian S.M. Neural differentiation of patient-specific induced pluripotent stem cells from patients with a hereditary form of spinal muscular atrophy. *Genes Cell*. 2016;11(2):70-81. (In Russ.) <https://doi.org/10.23868/gc120584>
  15. 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(1):162-75. PMID: 23257984; PMCID: PMC3612968. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.150>
  16. Slotvitsky M.M., Tsvelaya V.A., Podgurskaya A.D., Agladze K.I. Formation of an electrical coupling between differentiating cardiomyocytes. *Sci Rep*. 2020;10(1):7774. PMID: 32385315; PMCID: PMC7210299. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64581-5>
  17. Glukhov A.V., Flagg T.P., Fedorov V.V., Efimov I.R., Nichols C.G. Differential K(ATP) channel pharmacology in intact mouse heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;48(1):152-60. PMID: 19744493; PMCID: PMC2813353. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.08.026>
  18. Laughner J.I., Ng F.S., Sulkin M.S., Arthur R.M., Efimov I.R. Processing and analysis of cardiac optical mapping data obtained with potentiometric dyes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;303(7):H753-65. PMID: 22821993; PMCID: PMC3469699. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00404.2012>
  19. Lin J.Y., Knutsen P.M., Muller A., Kleinfeld D., Tsien R.Y. ReaChR: a red-shifted variant of channelrhodopsin enables deep transcranial optogenetic excitation. *Nat Neurosci*. 2013;16(10):1499-508. PMID: 23995068; PMCID: PMC3793847. <https://doi.org/10.1038/nn.3502>
  20. Ausra J., Madrid M., Yin R.T., Hanna J., Arnott S., Brennan J.A., Peralta R., Clausen D., Bakall J.A., Efimov I.R., Gutruf P. Wireless, fully implantable cardiac stimulation and recording with on-device computation for closed-loop pacing and defibrillation. *Sci Adv*. 2022;8(43):eabq7469. PMID: 36288311; PMCID: PMC9604544. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abq7469>
  21. Chong J.J.H., Yang X., Don C.W., Minami E., Liu Y.W., Weyers J.J., Mahoney W.M., Van Biber B., Cook S.M., Palpant N.J., Gantz J.A., Fugate J.A., Muskheli V., Gough G.M., Vogel K.W., Astley C.A., Hotchkiss C.E., Baldessari A., Pabon L., Reinecke H., Gill E.A., Nelson V., Kiem H.P., Laflamme M.A., Murry C.E. Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature*. 2014;510(7504):273-7. PMID: 24776797; PMCID: PMC4154594. <https://doi.org/10.1038/nature13233>
  22. Liu Y.W., Chen B., Yang X., Fugate J.A., Kalucki F.A., Futakuchi-Tsuchida A., Couture L., Vogel K.W., Astley C.A., Baldessari A., Ogle J., Don C.W., Steinberg Z.L., Seslar S.P., Tuck S.A., Tsuchida H., Naumova A.V., Dupras S.K., Lyu M.S., Lee J., Hailey D.W., Reinecke H., Pabon L., Fryer B.H., MacLellan W.R., Thies R.S., Murry C.E. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes restore function in infarcted hearts of non-human primates. *Nat Biotechnol*. 2018;36(7):597-605. PMID: 29969440; PMCID: PMC6329375. <https://doi.org/10.1038/nbt.4162>
  23. Alagarsamy K.N., Yan W., Srivastava A., Desiderio V., Dhirga S. Application of injectable hydrogels for cardiac stem cell therapy and tissue engineering. *Rev Cardiovasc Med*. 2019;20(4):221-30. PMID: 31912713. <https://doi.org/10.31083/j.rcm.2019.04.534>
  24. Slotvitsky M., Berezhnoy A., Scherbina S., Rims kaya B., Tsvelaya V., Balashov V., Efimov A.E., Agapov I., Agladze K. Polymer kernels as compact carriers for suspended cardiomyocytes. *Micromachines (Basel)*. 2022;14(1):51. PMID: 36677111; PMCID: PMC9865253. <https://doi.org/10.3390/mi14010051>
  25. Engelmayr G.C. Jr, Cheng M., Bettinger C.J., Borenstein J.T., Langer R., Freed L.E. Accordion-like honeycombs for tissue engineering of cardiac anisotropy. *Nat Mater*. 2008;7(12):1003-10. PMID: 18978786; PMCID: PMC2613200. <https://www.nature.com/articles/nmat2316>
  26. Deng C., Zhang P., Vulesevic B., Kuraitis D., Li F., Yang A.F., Griffith M., Ruel M., Suuronen E.J. A collagen-chitosan hydrogel for endothelial differentiation and angiogenesis. *Tissue Engineering Part A*. 2010;16(10):3099-109. PMID: 20586613. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2009.0504>
  27. Lin J., Keener J.P. Ephaptic coupling in cardiac myocytes. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2013;60(2):576-82. PMID: 23335235. <https://doi.org/10.1109/tbme.2012.2226720>