



Моделирование наследственных кардиомиопатий человека на основе дифференцированных производных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

Байзигитов Д.Р.^{1, 2, 3}, Медведев С.П.^{1, 2, 3, 4}, Дементьева Е.В.^{1, 2, 3}, Покушалов Е.А.³, Закиян С.М.^{1, 2, 3, 4}

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, 630090, Новосибирск, пр-т академика Лаврентьева, 10

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, 630090, Новосибирск, пр-т академика Лаврентьева, 8

³ Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина Министерства здравоохранения Российской Федерации, 630055, Новосибирск, ул. Речкуновская, 15

⁴ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2

Поступила в редакцию 15 сентября 2015 г. Принята к печати 18 ноября 2015 г.

Пониманию патогенеза кардиомиопатий препятствовала недоступность образцов тканей сердца на ранних стадиях развития заболевания, что изменилось с появлением пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, из которых можно получить кардиомиоциты *in vitro*. Особенность технологии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в том, что при охвате эффектов тысяч индивидуальных генных вариантов фенотип дифференцированных производных этих клеток будет предоставлять более подробную информацию о конкретной болезни данного пациента, чем при простом генотипировании. Авторы обобщают данные о клеточных моделях кардиомиопатий *in vitro*, акцентируя внимание на выявленном молекулярном и клеточном патогенезе, потенциальной терапии и тестировании новых лекарственных веществ.

Ключевые слова Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки • Кардиомиопатия • Моделирование заболеваний

Благодаря последним достижениям в биологии стволовых клеток [1, 2] возможно получить кардиомиоциты человека из клеток, выделенных непосредственно от больных с кардиомиопатией. Новая технология позволяет исследователям изучать механизмы болезни *in vitro*, а также создавать платформы для скрининга эффективности и токсичности препаратов с высокой пропускной способностью (рисунок) [3–5]. Кардиомиоциты, полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (КМ-ИПСК), демонстрируют преимущества по сравнению с предыдущими модельными системами.

Большинство исследований *in vitro* в этой области выполняли на кардиомиоцитах грызунов, которые во многом отличаются от кардиомиоцитов человека, в том числе саркомерной структурой, экспрессией сократительных белков, частотой сокращений, электрофизиологическими

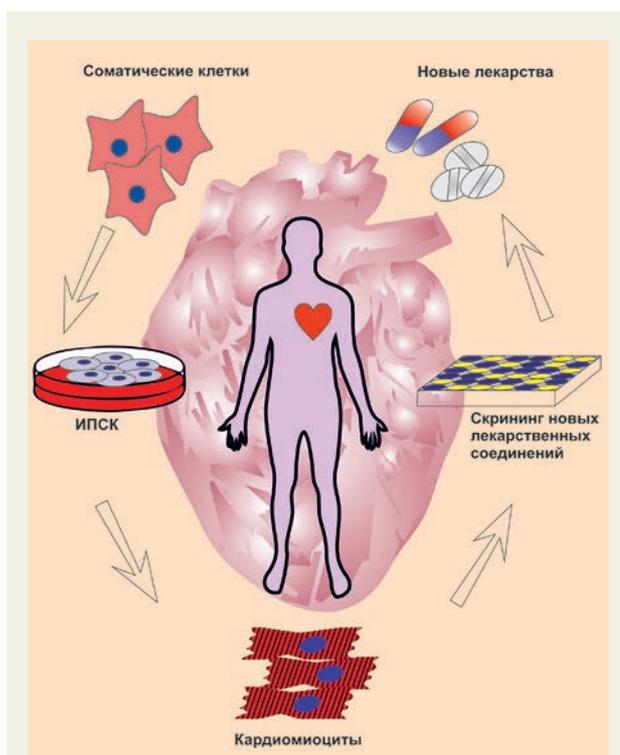
характеристиками и функцией ионных каналов, из-за чего часто трудно экстраполировать данные, полученные от грызунов, на людей. Это вызывает затруднения при изучении кардиомиопатии человека из-за мутаций в сократительных белках, таких как β -тяжелой цепи миозина, которые не экспрессируются на высоком уровне у взрослой мыши или крысы. Многие программы обнаружения новых лекарственных препаратов не дали результатов, потому что мишени, проверенные у животных, не подтвердились у человека. Исследование кардиомиоцитов человека ограничено из-за сложности выделения и наращивания этих клеток в культуре: большинство исследований тканей человека проведены на образцах, полученных во время имплантации вспомогательного устройства левого желудочка или трансплантации сердца. Осуществляют эти процедуры на последних стадиях большинства кардиомиопатий,

поэтому часто невозможно разделение первичных механизмов, вызванных конкретным вариантом гена, от вторичных и третичных механизмов, вызванных хронической нейрогуморальной стимуляцией, ремоделированием и лечением сердечной недостаточности. Таким образом, КМ-ИПСК, возможно, наиболее эффективная доступная *in vitro* модель человеческого сердца [6].

Однако в какой степени КМ-ИПСК воспроизводят структуру и функции зрелых кардиомиоцитов? Этот вопрос рассматривали, в частности, при применении КМ-ИПСК для понимания основных механизмов некоторых сердечно-сосудистых заболеваний. Наибольший успех достигли при изучении наследованных аритмий, в том числе синдромов удлиненного интервала QT и Тимоти [7–10], и аритмогенной дисплазии правого желудочка [11, 12], а также моделей дилатационной (ДКМП) [13, 14] и гипертрофической (ГКМП) кардиомиопатий [15, 16], что формирует новое представление об основных механизмах заболеваний и возможных фармакологических методах лечения (таблица). КМ-ИПСК также использованы для разработки пациент-специфичных панелей клеток для тестирования эффективности и кардиотоксичности лекарственного средства [3, 17, 18]. В сочетании исследования предоставляют более глубокое понимание механизмов этих заболеваний на уровне кардиомиоцита, что не было возможно ранее. Мы рассмотрим несколько исследований КМ-ИПСК, выполненных для моделирования кардиомиопатий, и оценим достигнутый прогресс в этой области.

Аритмогенная дисплазия правого желудочка

Аритмогенная дисплазия правого желудочка (АДПЖ) характеризуется прогрессирующим замещением нормальной ткани сердечной мышцы, в основном правого желудочка, фиброжировой тканью, а также усиленным апоптозом кардиомиоцитов. Данные изменения в правом желудочке приводят к развитию желудочковых тахикардий и повышенной вероятности внезапной смерти. Несмотря на высокую распространенность и тяжесть болезни, данных о ее возникновении и развитии мало. В основном это связано с труднодоступностью материала (биопсии миокарда больных) для исследований и невозможностью его получения на ранних стадиях развития болезни. Около 50% пациентов с АДПЖ имеют мутации в генах, кодирующих компоненты десмосом: десмоплакин, плакоглобин, плакофилин-2, десмоглеин-2 и десмоколлин-2 [19]. Часто среди случаев АДПЖ встречаются мутации в гене *RCP2*, который кодирует белок плакофилин-2. Несколько групп исследователей получили ИПСК



Применение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток и их производных

Различные типы соматических клеток можно перепрограммировать в плюрипотентное состояние; при использовании специальных протоколов дифференциации можно получить пациент-специфичные кардиомиоциты и другие дифференцированные типы клеток. КМ-ИПСК могут быть использованы для регенеративной терапии, обнаружения новых лекарственных веществ, изучения кардиотоксичности препаратов, а также моделирования заболеваний

пациентов с АДПЖ [11, 12, 20, 21]. В одной из работ обнаружили ИПСК пациента, имеющего гомозиготную мутацию с.2484C>T в гене *RCP2* [22]. Данная мутация нарушает сплайсинг транскрипта и приводит к возникновению 7-нуклеотидной делеции в двенадцатом экзоне *RCP2*. Свои эксперименты по влиянию данной мутации на кардиомиоциты исследователи проводили на эмбриональных тельцах после кардиогенной дифференцировки. Мутация в *RCP2* вызывает ненормальную ядерную локализацию одного из компонентов десмосом – плакоглобина, а также существенное снижение активности и экспрессии бета-катенина. Это, однако, не приводило к значимому изменению липогенеза и апоптоза в мутантных кардиомиоцитах по сравнению с контрольными. Для стимуляции патологии исследователи воздействовали на энергетический метаболизм, характерный для кардиомиоцитов

Пациент-специфичные модели кардиомиопатий, полученные на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека

Заболевание	Ген	Белок	Мутация	Исходные клетки	Полученные клетки	Способ репрограммирования	Ссылки
Аритмогенная дисплазия правого желудочка	PKP2	Плакофилин-2	c.2484C>T	Фибробласты	Кардиомиоциты	PB, OSKM	[22]
			c.2013delC			Эпи, OSKM	[20]
			c.972InsT/N			PB, OSK	[11]
Дилатационная кардиомиопатия	DES	Десмин	c.940C>T, p.A285V	Фибробласты	Кардиомиоциты	PB, OSKM	[14]
	TNNT2	Сердечный тропонин Т	p.R173W			LB, OSKM	[13]
Синдром Барта (дилатационная кардиомиопатия)	TAZ1	Тафаззин	c.590G>T, p.G197V c.110-1AG>AC 170G>T, p.R57L	Фибробласты	Кардиомиоциты	LB, OSKM	[37]
Гипертрофическая кардиомиопатия	MYH7	Тяжелая цепь бета-миозина	p.R663H	Фибробласты	Кардиомиоциты	LB, OSKM	[16]
Синдром LEOPARD (гипертрофическая кардиомиопатия)	PTPN11	Тирозиновая фосфатаза SHP2	p.T468M	Фибробласты	Кардиомиоциты	PB, OSKM	[26]
Болезнь Помпе	GAA	Альфа-глюкозидаза	C1935A/C1935A; G2040+1T/C1935A; G1062G/C1935A	Фибробласты	Кардиомиоциты	PB, OSKM	[40]
Атаксия Фридрейха	FXN	Фратаксина	GAA повторы	Фибробласты	Нейроны и кардиомиоциты	LB, OSLN	[34]
Надклапанный аортальный стеноз	ELN	Эластин	Инсерция GTAT в 9-м экзоне гена ELN	Клетки гладкой мускулатуры сосудов		LB, OSKM	[45]
Синдром Вильямса – Бойрена	Делеция 26–28 генов, включая ELN		Делеция размером 1,5–1,8 млн п. н. в 7q11.23	Фибробласты	Кардиомиоциты	PB, LB OSKM	[45, 46]

PB – ретровирусы, LB – лентивирусы, Эпи – эписомы, OCT4 (O), SOX2 (S), KLF4 (K), c-MYC (M), NANOG (N), LIN28 (L)

взрослого организма. Кардиомиоциты эмбрионального типа для производства энергии используют гликолиз, в то время как кардиомиоциты взрослого организма – окисление жирных кислот. С помощью инсулина, дексаметазона и 3-изобутил-1-метилксантина исследователи стимулировали адипогенез в эмбрионных тельцах после кардиогенной дифференцировки. Данное воздействие активировало основной регулятор окисления жирных кислот на уровне транскрипции генов – PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor)-альфа, но не приводило к

статистически значимому изменению липогенеза и апоптоза кардиомиоцитов. После этого авторы применили протокол адипогенной дифференцировки, включив в состав среды химические активаторы (росиглитазон и индометацин) рецептора PPAR-гамма. Активация сигнального каскада, опосредованного PPAR-гамма и аномально активного в образцах сердечной мышцы, полученных от пациентов с АДПЖ, вызывала патологические изменения (повышенные липогенез и апоптоз) в эмбрионных тельцах, полученных из ИПСК пациента с мутацией в

гене *PKP2*. Инсулин, дексаметазон и 3-изобутил-1-метилксантин, используемые для активации PPAR-альфа, воспроизводят естественное действие гормонов во взрослом организме человека. При этом лигандов, активирующих PPAR-гамма и сходных по химической структуре с росиглитазоном и индометацином, нет. Тем не менее исследователи обнаружили, что 13-гидроксиокта-декадиеновая кислота, основной компонент окисленных липопротеинов низкой плотности, может заменить росиглитазон и индометацин при активации PPAR-гамма с теми же патологическими последствиями. Кроме того, применение антагонистов PPAR-гамма (GW9662 и T0070907) при индукции патологического состояния предотвращает апоптоз кардиомиоцитов и липогенез. Инактивация PPAR-альфа либо активация PPAR-гамма также подавляет патологические проявления. Для формирования патологического фенотипа необходима совместная активация сигнальных каскадов, действующих через PPAR-альфа и PPAR-гамма. Авторы подтвердили те же закономерности с использованием ИПСК пациента, имеющего другую мутацию – гетерозиготную делецию с.2013delC, вызывающую сдвиг рамки считывания и терминацию транскрипции в десятом экзоне гена *PKP2* [22].

В остальных работах, посвященных моделированию АДПЖ, исследовали кардиомиоциты, полученные из ИПСК пациента, имеющего гетерозиготную инсерцию с.972InsT/N, сдвигающую рамку считывания гена *PKP2* [20], а также пациента с миссенс-мутацией с.1841T>C (p.L614P) в *PKP2* [11]. Кардиомиоциты пациентов проявляют сходный патологический фенотип. Полученные из ИПСК кардиомиоциты пациентов имеют нарушенную локализацию одного из компонентов десмосом – плакоглобина. Однако в одной работе замечено снижение уровня коннексина-43 [20], в другой – такого изменения не выявлено [11]. Также обнаружены повышенный уровень липогенеза, нарушения структуры десмосом, активация PPAR-гамма. В одном исследовании также показано, что адипогенная стимуляция усиливает степень изменения структуры десмосом и накопление липидов, но это можно предотвратить применением специфического ингибитора гликогенсинтазы-3-бета [20].

Гипертрофическая кардиомиопатия

Наследственная гипертрофическая кардиомиопатия – аутосомно-доминантное заболевание, характеризующееся нарушением структуры саркомеров кардиомиоцитов. Пациенты с ГКМП демонстрируют аномальное утолщение стенки левого желудочка при отсутствии увеличенной гемодинамической нагрузки. Данные пациенты имеют повышенный риск таких клинических осложнений, как

прогрессирующая сердечная недостаточность, аритмия и внезапная сердечная смерть. ГКМП – распространенное наследственное сердечно-сосудистое заболевание [23–25].

В одной из работ получили КМ-ИПСК от 10 членов одной семьи, некоторым из них диагностировали гипертрофическую кардиомиопатию. Эти пациенты несли миссенс-мутацию Arg663His в гене *MYH7*, кодирующем β -МНС (миозин тяжелой цепи) [16]. КМ-ИПСК, полученные от больных пациентов, отражали несколько аспектов фенотипа ГКМП, в том числе клеточное увеличение, начиная с шестой недели после сердечной индукции, сократительную дисфункцию в ответ на β -адренергические агонисты и аритмичные сокращения на уровне одной клетки. В клетках также выявили увеличение внутриклеточного кальция.

Лечение верапамилом, блокатором Ca^{2+} канала, до наступления гипертрофии нормализовало ток ионов Ca^{2+} и предотвращало как аритмию, так и гипертрофию. Хотя блокаторы Ca^{2+} канала не были эффективны в уменьшении гипертрофии у больных с развитой ГКМП, их не испытывали в качестве превентивного лечения у пациентов, несущих мутацию гена, у которых еще не развита гипертрофия [16].

Другая группа исследователей получила КМ-ИПСК от двух пациентов с синдромом LEOPARD, несущих мутации T468M в *PTPN11*, кодирующем тирозин фосфатазу SHP2 [26]. Синдром LEOPARD характеризуется поражением кожи, гипертелоризмом, аномалией половых органов, глухотой, легочным стенозом и гипертрофической кардиомиопатией. КМ-ИПСК у пациентов с синдромом LEOPARD были больше, чем контрольные клетки, а также выявили большую степень саркомерной организации. Показано несколько изменений в сигнализации, в том числе повышенной ядерной локализации фактора транскрипции NFATC4 и повышенной активации MEK1-ERK пути, известного как медиатор ремоделирования клеток.

Дилатационная кардиомиопатия

Дилатационная кардиомиопатия – заболевание миокарда, характеризующееся растяжением полостей сердца и систолической дисфункцией без увеличения толщины стенок сердца. ДКМП является одной из распространенных причин сердечной недостаточности после болезни коронарных сосудов и повышенного артериального давления [27, 28]. Около 30–35% случаев ДКМП связаны с генными мутациями. Известно более 30 генов, кодирующих белковые компоненты цитоскелета, саркомеров и ядерной ламины, мутации в которых вызывает дилатационную кардиомиопатию [29].

В одной из работ изучили КМ-ИПСК, полученные от членов семьи с дилатационной кардиомиопатией, несущей точечную мутацию R173W в гене, кодирующем саркомерный белок, кардиальный тропонин Т [13]. По сравнению со здоровыми членами той же семьи КМ-ИПСК, полученные от пациентов с ДКМП, показали измененный ток ионов кальция, снижение сокращений и ненормальное распределение саркомерного α -актина. При стимуляции норадреналином, агонистом α - и β -адренорецепторов, КМ-ИПСК показали снижение частоты сокращений, а также большее количество клеток с аномальным распределением α -актина. При стимулировании метопрололом, блокатором β 1-адренорецепторов, а также гиперэкспрессии *SERCA2A* (кальций-зависимой аденозинтрифосфатазы саркоплазматического ретикула) наблюдали улучшение организации сократительных белков, восстановление сократительной функции [13].

В другой работе получили КМ-ИПСК от одного члена семьи с мутацией R225X в ламин A/C (*LMNA*) [30], которые имели морфологические изменения, в том числе более частое формирование микроядер. У клеток, несущих мутацию, при электрической стимуляции выявили клеточное старение и апоптоз. При подавлении экспрессии *LMNA* в контрольных клетках получили такой же фенотип, как и в мутантных клетках. Фармакологическая блокада ингибиторами ERK1/2 пути ослабляет проапоптотические эффекты электрической стимуляции, что подчеркивает роль ERK-сигнализации в опосредовании дилатационной кардиомиопатии.

В другом исследовании получили КМ-ИПСК от больного с ДКМП с неизвестной наследственной этиологией. Для обнаружения мутации применили экзомное секвенирование и обнаружили ранее не описанную мутацию A285V в четвертом экзоне гена *DES*, кодирующего белок десмин [14]. Для подтверждения клетки, полученные от пациента, сравнивали с КМ-ИПСК контрольной линии, которые были трансдуцированы мутантным геном. У полученных КМ-ИПСК обнаружили нарушение структуры Z-дисков саркомеров, наличие плеоморфных плотных структур вблизи Z-диска или между миофибриллами. Семьдесят процентов клеток A285V КМ-ИПСК имеют структурные и функциональные отклонения, такие как диффузные агрегаты, содержащие десмин. Эти нарушения воспроизводятся, когда мутантный ген A285V трансдуцирован в клетки контрольной линии. Функциональный анализ показал, что у КМ-ИПСК снизились обратный захват Ca^{2+} и частота спонтанных сокращений и кардиомиоциты неадекватно отвечают на адренергический стресс, вызванный изопротеренолом. Таким образом, на гистологическом и функциональном уровнях КМ-ИПСК

может подтверждать отвечающий за развитие заболевания вариант гена, обнаруженный экзомным секвенированием.

Атаксия Фридрейха

Атаксия Фридрейха обусловлена мутациями в гене фратаксина, как правило, из-за экспансии тринуклеотидных повторов GAA в первом интроне гена фратаксина *FHN*, митохондриального белка, участвующего в транспорте железа [31]. К симптомам относятся атаксия, катаракта, гипогонадизм, гипертрофическая кардиомиопатия. Атаксия Фридрейха – наследственное нейродегенеративное заболевание, при котором сердечная недостаточность или нарушение ритма являются причиной смерти более половины больных [32, 33]. Предпринимаются попытки создать адекватные модели для поиска терапии атаксии Фридрейха, в том числе животные модели, но они не воспроизводят весь спектр симптомов болезни, наблюдаемых у пациентов.

Исследователи получили ИПСК двух пациентов с атаксией Фридрейха, затем дифференцировали ИПСК в нейроны и кардиомиоциты. Хотя аритмии распространены у пациентов с атаксией Фридрейха, КМ-ИПСК в этой работе не показали никаких признаков аномальной электрофизиологии. Тем не менее как в кардиомиоцитах, так и нейронах наблюдали ухудшение функций митохондрий, о чем свидетельствовало снижение их мембранного потенциала. Кардиомиоциты, полученные из ИПСК больных с атаксией Фридрейха, проявляют признаки дегенерации митохондрий [34].

Синдром Барта

Синдром Барта является X-сцепленной кардиальной и скелетной миопатией, вызванной мутацией гена тафазина (*TAZ*), ацилтрансферазы, участвующей в метаболизме кардиолипина, фосфолипида внутренней мембраны митохондрий. Сердечная недостаточность – наиболее распространенный клинический признак при рождении и главная причина смерти детей с синдромом Барта [35, 36]. Синдром Барта характеризуется дилатационной кардиомиопатией, синдромом некомпактного миокарда левого желудочка, эндокардиальным фиброэластозом, серьезными нарушениями сердечного ритма – фибрилляцией желудочков или тахикардией. Также к симптомам относятся нейтропения, задержка роста и экскреция с мочой 3-метилглутаконовой кислоты.

Две группы исследователей получили ИПСК пациентов с синдромом Барта [37, 38]. В ИПСК обнаружили нарушение метаболизма кардиолипина и снижение потребления кислорода митохондриями, связанные со

структурными изменениями в митохондриальных суперкомплексах дыхательной цепи, которые в результате приводили к увеличению образования активных форм кислорода. ИПСК не дифференцировали в кардиомиоциты, поэтому, в какой степени эти митохондриальные нарушения могли присутствовать в кардиомиоцитах и влиять на их функцию, не изучали [37]. В другом исследовании ИПСК пациентов дифференцировали в кардиомиоциты, в которых было увеличено образование активных форм кислорода, а подавление этого процесса нормализовало саркомерогенез, улучшало сократительный фенотип кардиомиоцитов [38]. При изучении метаболизма кардиолипина в КМ-ИПСК обнаружили истощение зрелой формы кардиолипина и накопление незрелой формы – монолизокардиолипина. Фосфолипидный профиль КМ-ИПСК, измеренный масс-спектрометрией, подтвердил аномальный процессинг кардиолипина. Соотношение монолизокардиолипина к кардиолипину превысило 0,3 клинически используемого диагностического порога для синдрома Барта. Таким образом, КМ-ИПСК повторяли нарушения биогенеза кардиолипина, соответствующего тому, что наблюдается в клинике у больных с синдромом Барта.

Для подтверждения роли кардиолипина в патогенезе синдрома Барта исследователи трансфицировали модифицированную рибонуклеиновую кислоту тафазина, что восстановило биогенез кардиолипина и нормализовало функцию митохондрий.

Также эта группа получила изогенные линии с использованием контрольной человеческой линии PGP1 при помощи системы Cas9, несущие мутации в гене *TAZ* с.517delG и с.517ins. Эти изогенные линии полностью воспроизводили фенотип, наблюдаемый в полученных КМ-ИПСК пациента и модели нокдауна *TAZ* у неонатальной крысы: дефицит кардиолипина, аденозинтрифосфата и нарушение работы митохондрий [38].

Болезнь Помпе

Болезнь Помпе (болезнь хранения гликогена II типа, гликогеноз II типа) – заболевание с аутосомно-рецессивным типом наследования, который на клеточном уровне проявляется в накоплении гликогена, нарушении работы митохондрий и аутофагии клеток [39]. Основной тип клеток, на котором проявляется патогенез болезни Помпе, – мышечные клетки, в том числе кардиомиоциты. Причиной болезни являются мутации в гене *GAA*, кодирующем один из ферментов лизосом – альфа-глюкозидазу. Группа исследователей получила КМ-ИПСК от двух пациентов с болезнью Помпе [40]. КМ-ИПСК имели низкую активность *GAA*, высокое содержание гликогена и многочисленные ультраструктурные аномалии. Анализ транс-

криптома позволил определить измененную экспрессию генов, участвующих в метаболизме гликогена, функционировании лизосом и митохондрий. При применении рекомбинантного человеческого *GAA* и L-карнитина частично снижается проявление патологических симптомов *in vitro*. Таким образом, этот подход дает возможность расширить исследование патогенеза и поиск способов лечения других заболеваний накопления.

Надклапанный аортальный стеноз

Надклапанный аортальный стеноз – тяжелое заболевание, связанное с повышенной пролиферацией клеток гладкой мускулатуры сосудов, которая приводит к сужению и закупорке восходящей артерии и других крупных артерий. Пациенты с данным заболеванием имеют высокий риск внезапной сердечной смерти, а терапия сводится к хирургической коррекции сосудов, протезированию сосудов и трансплантации сердца [41, 42]. Причинами развития стеноза являются гетерозиготные мутации в гене *ELN*, кодирующем эластин, либо делеции в q-плече седьмой хромосомы (7q11.23, синдром Вильямса – Бойрена), которые также захватывают ген *ELN*. Поскольку делеции в 7q11.23, как правило, включают до 28 генов, больные с синдромом Вильямса – Бойрена имеют тяжелый комплексный фенотип, включающий черепно-лицевые дефекты и нейроповеденческие нарушения. Несмотря на то что частота синдрома Вильямса – Бойрена 1:10000, он относится к распространенным заболеваниям сосудов, имеющим подтвержденную наследственную природу [43, 44].

Ген *ELN* кодирует мономерный белок-предшественник, тропоэластин, который секретируют клетки гладкой мускулатуры артерий. После полимеризации тропоэластин образует эластин – основной компонент внеклеточного матрикса клеток гладкой мускулатуры и компонент, определяющий упругость сосудов, их устойчивость к постоянным динамическим воздействиям. Известны модели надклапанного аортального стеноза, полученные у лабораторных животных [44], однако их использование ограничено функциональными различиями клеток гладкой мускулатуры животных и человека. Изучение стеноза у человека затруднено недостаточной доступностью биопсийного материала больных, а также низкой жизнеспособностью клеток гладкой мускулатуры.

Получение и исследование моделей надклапанного аортального стеноза является крайне перспективным направлением, поскольку позволяет получать пациент-специфичные плюрипотентные клетки с неограниченным пролиферативным потенциалом, способные дать в результате направленной дифференцировки клетки гладкой

мускулатуры сосудов. Две исследовательские группы получили ИПСК пациента, имеющего 4-нуклеотидную инсерцию GTAT в гене *ELN*, которая сдвигает рамку считывания и вызывает преждевременную терминацию транскрипции в десятом экзоне, а также ИПСК больных с синдромом Вильямса – Бойрена [45, 46]. Клетки гладкой мускулатуры, полученные в результате дифференцировки пациент-специфичных ИПСК, имеют нарушения в организации альфа-актиновых филаментов, большую скорость пролиферации и миграции, низкую восприимчивость к вазоактивным препаратам, карбахолу и эндотелину-1, сниженную способность к формированию сосудоподобных структур по сравнению с контрольными клетками [45, 46]. Кроме того, использование рекомбинантного эластана, а также стимуляция активности малых ГТФаз RhoA с помощью тропомиозина позволяют скорректировать нарушения формирования актиновых филаментов [45]. Применение специфического ингибитора киназы ERK1/2 либо рапамицина (ингибитора сигнального каскада mTOR) позволяет существенно снизить аномальную скорость пролиферации мутантных клеток [45, 46].

Ограничения КМ-ИПСК в моделировании болезней

Несмотря на успех в моделировании заболеваний с помощью индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, КМ-ИПСК не отражают все аспекты зрелого кардиомиоцита и поэтому не всегда подходят для всех моделей сердечно-сосудистых заболеваний.

Хотя КМ-ИПСК экспрессируют множество кардиомиоцит-специфичных генов, таких как тропонин Т, α -актинин и α - и β -миозин тяжелой цепи, и спонтанно сокращаются в культуре, их фенотип заметно отличается от зрелых кардиомиоцитов. КМ-ИПСК, как правило, круглой формы с миофиламентами, расположенными под разными углами, которые скорее отражают кардиомиоциты на незрелой стадии (эмбриональной). Зрелые кардиомиоциты имеют форму стержня с высоко упорядоченными миофиламентами. КМ-ИПСК также экспрессируют несколько генов (коннексин 45, актин гладких мышц), что более характерно для незрелых кардиомиоцитов. Также есть заметные различия в адренергической сигнализации во время развития кардиомиоцитов: помимо увеличения инотропии и хронотропии, β -адренергические агонисты вызывают кардиотоксический и проапоптотический сигналинг у зрелых кардиомиоцитов [47]. Напротив, β -адренергическая стимуляция индуцирует кардиопротективную сигнализацию в неонатальных кардиомиоцитах [48]. Важно знать эти различия и учитывать их при тестировании новых β -блокаторов с использованием карди-

омиоцитов, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека.

Выводы

Кардиомиоциты, полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, предоставляют уникальную возможность изучения механизмов развития сердечно-сосудистых заболеваний с использованием клеточного компонента тканей человека. Эти данные уже встречаются в исследованиях, посвященных наследственным кардиомиопатиям. Тем не менее КМ-ИПСК, получение которых стало доступно, по-прежнему незрелая версия кардиомиоцитов и, таким образом, не могут быть единственной моделью для всех сердечно-сосудистых заболеваний. Если клетки предназначены для скрининга лекарственных средств, особое внимание необходимо уделять различиям в развитии, рецепторах клеточной поверхности. Исследования сердечно-сосудистой патологии с использованием ИПСК наращивают темп и проводятся одновременно с испытанием новых систем для получения зрелых кардиомиоцитов из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Okita K., Yamakawa T., Matsumura Y., Sato Y., Amano N., Watanabe A., Goshima N., Yamanaka S. An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells // *Stem Cells*. 2013. Vol. 31. № 3. P. 458–66.
- Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // *Cell*. 2006. Vol. 126. № 4. P. 663–76.
- Doherty K.R., Talbert D.R., Trusk P.B., Moran D.M., Shell S.A., Bacus S. Structural and functional screening in human induced-pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes accurately identifies cardiotoxicity of multiple drug types // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2015. Vol. 285. № 1. P. 51–60.
- Gieseck R.L. 3rd, Vallier L., Hannan N.R. Generation of Hepatocytes from Pluripotent Stem Cells for Drug Screening and Developmental Modeling // *Methods Mol. Biol.* 2015. Vol. 1250. P. 123–42.
- Shinde V., Klima S., Sureshkumar P.S., Meganathan K., Jagtap S., Rempel E., Rahnenführer J., Hengstler J.G., Waldmann T., Hescheler J., Leist M., Sachinidis A. Human Pluripotent Stem Cell Based Developmental Toxicity Assays for Chemical Safety Screening and Systems Biology Data Generation // *J. Vis. Exp.* 2015. Vol. 100. P. e52333.
- Eschenhagen T., Mummery C., Knollmann B.C. Modelling sarcomeric cardiomyopathies in the dish: from human heart samples to iPSC cardiomyocytes // *Cardiovasc. Res.* 2015. Vol. 105. № 4. P. 424–38.
- Itzhaki I., Maizels L., Huber I, Zwi-Dantsis L., Caspi O., Winterstern A., Feldman O., Gepstein A., Arbel G., Hammerman H., Boulos M., Gepstein L. Modeling the Long QT Syndrome with Human

- Induced Pluripotent Stem Cells // *Circulation*. 2010. Vol. 122. № 21. P. 225–9.
8. Ma D.R., Wei H.M., Lu J., Loh L.J., Islam O., Liew R., Shim W., Cook S.A. Characterization of a novel KCNQ1 mutation for type 1 long QT syndrome and assessment of the therapeutic potential of a novel IKs activator using patient-specific induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes // *Stem Cell Research & Therapy*. 2015. Vol. 6. P. 39.
 9. Ma D.R., Wei H.M., Zhao Y.X., Lu J., Li G., Sahib N.B., Tan T.H., Wong K.Y., Shim W., Wong P., Cook S.A., Liew R. Modeling type 3 long QT syndrome with cardiomyocytes derived from patient-specific induced pluripotent stem cells // *International Journal of Cardiology*. 2013. Vol. 168. № 6. P. 5277–86.
 10. Yazawa M., Hsueh B., Jia X., Pasca A.M., Bernstein J.A., Hallmayer J., and Dolmetsch R.E. Using induced pluripotent stem cells to investigate cardiac phenotypes in Timothy syndrome // *Nature*. 2011. Vol. 471. № 7337. P. 230–4.
 11. Ma D., Wei H., Lu J., Ho S., Zhang G., Sun X., Oh Y., Tan S.H., Ng M.L., Shim W., Wong P., Liew R. Generation of patient-specific induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes as a cellular model of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy // *Eur. Heart J*. 2013. Vol. 34. №15. P. 1122–33.
 12. Wen J.Y., Wei C.Y., Shah K., Wong J., Wang C., Chen H.S. Maturation-Based Model of Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells // *Circ. J*. 2015. Vol. 79. № 7. P. 1402–8.
 13. Sun N., Yazawa M., Liu J., Han L., Sanchez-Freire V., Abilez O.J., Navarrete E.G., Hu S., Wang L., Lee A., Pavlovic A., Lin S., Chen R., Hajjar R.J., Snyder M.P., Dolmetsch R.E., Butte M.J., Ashley E.A., Longaker M.T., Robbins R.C., Wu J.C. Patient-specific induced pluripotent stem cells as a model for familial dilated cardiomyopathy // *Sci. Transl. Med*. 2012. Vol. 4. № 130. P. 130ra47.
 14. Tse H.F., Ho J.C., Choi S.W., Lee Y.K., Butler A.W., Ng K.M., Siu C.W., Simpson M.A., Lai W.H., Chan Y.C., Au K.W., Zhang J., Lay K.W., Esteban M.A., Nicholls J.M., Colman A., Sham P.C. Patient-specific induced-pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes recapitulate the pathogenic phenotypes of dilated cardiomyopathy due to a novel DES mutation identified by whole exome sequencing // *Hum. Mol. Genet*. 2013. Vol. 22. № 7. P. 1395–403.
 15. Han L., Li Y., Tchoa J., Kaplan A.D., Lin B., Li Y., Mich-Basso J., Lis A., Hassan N., London B., Bett G.C., Tobita K., Rasmuson R.L., Yang L. Study familial hypertrophic cardiomyopathy using patient-specific induced pluripotent stem cells // *Cardiovasc. Res*. 2014. Vol. 104. № 2. P. 258–69.
 16. Lan F., Lee A.S., Liang P., Sanchez-Freire V., Nguyen P.K., Wang L., Han L., Yen M., Wang Y., Sun N., Abilez O.J., Hu S., Ebert A.D., Navarrete E.G., Simmons C.S., Wheeler M., Pruitt B., Lewis R., Yamaguchi Y., Ashley E.A., Bers D.M., Robbins R.C., Longaker M.T., Wu J.C. Abnormal calcium handling properties underlie familial hypertrophic cardiomyopathy pathology in patient-specific induced pluripotent stem cells // *Cell Stem Cell*. 2013. Vol. 12. № 1. P. 101–13.
 17. Liang P., Lan F., Lee A.S., Gong T., Sanchez-Freire V., Wang Y., Diecke S., Sallam K., Knowles J.W., Wang P.J., Nguyen P.K., Bers D.M., Robbins R.C., Wu J.C. Drug screening using a library of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes reveals disease-specific patterns of cardiotoxicity // *Circulation*. 2013. Vol. 127. № 16. P. 1677–91.
 18. Lu J., Wei H., Wu J., Jamil M.F., Tan M.L., Adenan M.I., Wong P., Shim W. Evaluation of the cardiotoxicity of mitragynine and its analogues using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes // *PLoS One*. 2014. Vol. 9. № 12. P. e115648.
 19. Awad M.M., Calkins H., Judge D.P. Mechanisms of disease: molecular genetics of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/ cardiomyopathy // *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med*. 2008. Vol. 5. № 5. P. 258–67.
 20. Caspi O., Huber I., Gepstein A., Arbel G., Maizels L., Boulos M., Gepstein L. Modeling of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with human induced pluripotent stem cells // *Circ. Cardiovasc. Genet*. 2013. Vol. 6. № 6. P. 557–68.
 21. Fatima A., Dittmann S., Kaifeng S., Xu G., Lehmann M., Linke M., Zechner U., Hennies H. C., Stork I., Rosenkranz S., Farr M., Milting H., Hescheler J., Horstkotte D., Šarić T. Derivation of induced pluripotent stem (iPS) cells from a patient with an arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) // *J. Stem. Cells. Regen. Med*. 2010. Vol. 6. № 2. P. 97.
 22. Kim C., Wong J., Wen J., Wang S., Wang C., Spiering S., Kan N.G., Forcales S., Puri P.L., Leone T.C., Marine J.E., Calkins H., Kelly D.P., Judge D.P., Chen H.S. Studying arrhythmogenic right ventricular dysplasia with patient-specific iPSCs // *Nature*. 2013. Vol. 494. № 7435. P. 105–10.
 23. Hensley N., Dietrich J., Nyhan D., Mitter N., Yee M.S., Brady M. Hypertrophic cardiomyopathy: a review // *Anesth. Analg*. 2015. Vol. 120. № 3. P. 554–69.
 24. Houston B.A., Stevens G.R. Hypertrophic cardiomyopathy: a review // *Clin. Med. Insights. Cardiol*. 2014. Vol. 8. Suppl. 1. P. 53–65.
 25. Semsarian C., Ingles J., Maron M.S., Maron B.J. New perspectives on the prevalence of hypertrophic cardiomyopathy // *J. Am. Coll. Cardiol*. 2015. Vol. 65. № 12. P. 1249–54.
 26. Carvajal-Vergara X., Sevilla A., D'Souza S.L., Ang Y.S., Schaniel C., Lee D.F., Yang L., Kaplan A.D., Adler E.D., Rozov R., Ge Y., Cohen N., Edelmann L.J., Chang B., Waghray A., Su J., Pardo S., Lichtenbelt K.D., Tartaglia M., Gelb B.D., Lemischka I.R. Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome // *Nature*. 2010. Vol. 465. № 7299. P. 808–12.
 27. Luk A., Ahn E., Soor G.S., Butany J. Dilated cardiomyopathy: a review // *J. Clin. Pathol*. 2009. Vol. 62. № 3. P. 219–25.
 28. Petretta M., Pirozzi F., Sasso L., Paglia A., Bonaduce D. Review and metaanalysis of the frequency of familial dilated cardiomyopathy // *Am. J. Cardiol*. 2011. Vol. 108. № 8. P. 1171–6.
 29. Hershberger R.E., Morales A., Siegfried J.D. Clinical and genetic issues in dilated cardiomyopathy: a review for genetics professionals // *Genet. Med*. 2010. Vol. 12. №11. P. 655–67.
 30. Siu C.W., Lee Y.K., Ho J.C., Lai W.H., Chan Y.C., Ng K.M., Wong L.Y., Au K.W., Lau Y.M., Zhang J., Lay K.W., Colman A., Tse H.F. Modeling of lamin A/C mutation premature cardiac aging using patient-specific induced pluripotent stem cells // *Aging (Albany NY)*. 2012. Vol. 4. № 11. P. 803–22.
 31. Palau F. Friedreich's ataxia and frataxin: molecular genetics, evolution and pathogenesis (Review) // *Int. J. Mol. Med*. 2001. Vol. 7. № 6. P. 581–9.
 32. Albano L.M., Nishioka S.A., Moyses R.L., Wagenführ J., Bertola D., Sugayama S.M., Chong A.K. Friedreich's ataxia: cardiac evaluation of 25 patients with clinical diagnosis and literature review // *Arq. Bras. Cardiol*. 2002. Vol. 78. № 5. P. 444–51.
 33. Bourke T., Keane D. Friedreich's Ataxia: a review from a cardiology perspective // *Ir. J. Med. Sci*. 2011. Vol. 180. № 4. P. 799–805.
 34. Hick A., Wattenhofer-Donze M., Chintawar S., Tropel P., Simard J.P., Vaucamps N., Gall D., Lambot L., André C., Reutenauer L., Rai M., Teletin M., Messaddeq N., Schiffmann S.N., Viville S., Pearson C.E., Pandolfo M., Puccio H. Neurons and cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells as a model for mitochondrial defects in Friedreich's ataxia // *Dis Model Mech*. 2013. Vol. 6. № 3. P. 608–21.
 35. Reynolds S. Successful management of Barth syndrome: a systematic review highlighting the importance of a flexible and

- multidisciplinary approach // J. Multidiscip. Health. 2015. Vol. 8. P. 345–58.
36. Yen T.Y., Hwu W.L., Chien Y.H., Wu M.H., Lin M.T., Tsao L.Y., Hsieh W.S., Lee N.C. Acute metabolic decompensation and sudden death in Barth syndrome: report of a family and a literature review // Eur. J. Pediatr. 2008. Vol. 167. № 8. P. 941–4.
 37. Dudek J., Cheng I.F., Balleininger M., Vazd F.M., Streckfuss-Bömeke K., Hübscher D., Vukotica M., Wandersd R.J.A., Rehling P., Guan K. Cardiolipin deficiency affects respiratory chain function and organization in an induced pluripotent stem cell model of Barth syndrome // Stem Cell Res. 2013. Vol. 11. № 2. P. 806–19.
 38. Wang G., McCain M.L., Yang L., He A., Pasqualini F.S., Agarwal A., Yuan H., Jiang D., Zhang D., Zangi L., Geva J., Roberts A.E., Ma Q., Ding J., Chen J., Wang D.Z., Li K., Wang J., Wanders R.J., Kulik W., Vaz F.M., Laflamme M.A., Murry C.E., Chien K.R., Kelley R.I., Church G.M., Parker K.K., Pu W.T. Modeling the mitochondrial cardiomyopathy of Barth syndrome with induced pluripotent stem cell and heart-on-chip technologies // Nat. Med. 2014. Vol. 20. № 6. P. 616–23.
 39. Taglia A., Picillo E., D'Ambrosio P., Cecio M.R., Viggiano E., Politano L. Genetic counseling in Pompe disease // Acta Myol. 2011. Vol. 30. № 3. P. 179–81.
 40. Huang H.P., Chen P.H., Hwu W.L., Chuang C.Y., Chien Y.H., Stone L., Chien C.L., Li L.T., Chiang S.C., Chen H.F., Ho H.N., Chen C.H., Kuo H.C. Human Pompe disease-induced pluripotent stem cells for pathogenesis modeling, drug testing and disease marker identification // Hum. Mol. Genet. 2011. Vol. 20. № 24. P. 4851–64.
 41. Merla G., Brunetti-Pierrri N., Piccolo P., Micale L., Loviglio M.N. Supravalvular aortic stenosis: elastin arteriopathy // Circ. Cardiovasc. Genet. 2012. Vol. 5 № 6. P. 692–6.
 42. Morris C.A. Genetic aspects of supravalvular aortic stenosis // Curr. Opin. Cardiol. 1998. Vol. 13. № 3. P. 214–9.
 43. Samanich J.M., Levin T.L., Berdon W.E. The clinical and genetic distinction between familial supravalvular aortic stenosis (Eisenberg syndrome) and Williams-Beuren syndrome // Pediatr. Radiol. 2012. Vol. 42. № 10. P. 1269.
 44. Urban Z., Riazi S., Seidl T.L., Katahira J., Smoot L.B., Chitayat D., Boyd C.D., Hinek A. Connection between elastin haploinsufficiency and increased cell proliferation in patients with supravalvular aortic stenosis and Williams-Beuren syndrome // Am. J. Hum. Genet. 2002. Vol. 71. № 1. P. 30–44.
 45. Ge X., Ren Y., Bartulos O., Lee M.Y., Yue Z., Kim K.Y., Li W., Amos P.J., Bozkulak E.C., Iyer A., Zheng W., Zhao H., Martin K.A., Kotton D.N., Tellides G., Park I.H., Yue L., Qyang Y. Modeling supravalvular aortic stenosis syndrome with human induced pluripotent stem cells // Circulation. 2012. Vol. 126. № 14. P. 1695–704.
 46. Kinnear C., Chang W.Y., Khattak S., Hinek A., Thompson T., de Carvalho Rodrigues D., Kennedy K., Mahmut N., Pasceri P., Stanford W.L., Ellis J., Mital S. Modeling and rescue of the vascular phenotype of Williams-Beuren syndrome in patient induced pluripotent stem cells // Stem Cells Transl. Med. 2013. Vol. 2. № 1. P. 2–15.
 47. Communal C., Singh K., Pimentel D.R., Colucci W.S. Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of the beta-adrenergic pathway // Circulation. 1998. Vol. 98. № 13. P. 1329–34.
 48. Wu C.F., Bishopric N.H., Pratt R.E. Atrial natriuretic peptide induces apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes // J. Biol. Chem. 1997. Vol. 272. № 23. P. 14860–6.

Modeling of inherited cardiomyopathies based on human differentiated induced pluripotent stem cells derivatives

Baizigitov D.R.^{1,2,3*}, Medvedev S.P.^{1,2,3,4}, Dement'eva E.V.^{1,2,3}, Pokushalov E.A.³, Zakiyan S.M.^{1,2,3,4}

¹ The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, The Siberian Branch of the Russian Federation Academy of Sciences, 10 Lavrentieva Avenue, 630090 Novosibirsk, Russian Federation

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, The Siberian Branch of the Russian Federation Academy of Sciences, 8 Lavrentieva Avenue, 630090 Novosibirsk, Russian Federation

³ Academician Ye. Meshalkin Novosibirsk Research Institute of Circulation Pathology, Ministry of Health Care of Russian Federation, 15 Rechkunovskaya St., 630055 Novosibirsk, Russian Federation

⁴ Novosibirsk National Research State University, 2 Pirogova St., 630090 Novosibirsk, Russian Federation

* Corresponding author. Email: baizigit@bionet.nsc.ru

One of the obstacles on the way to a better understanding of the pathogenesis of cardiomyopathies has been unavailability of tissue samples from the heart in the early stages of the disease. This has been changed with the emergence of patient-specific induced pluripotent stem cells (iPSC), from which cardiomyocytes *in vitro* can be derived. The feature of iPSC technology is that given the effects of thousands of individual gene variants, a phenotype of differentiated derivatives of these cells will provide more information about a specific disease of the patient than by simple genotyping. This article summarizes what is known about the models of cardiomyopathies *in vitro*, with an emphasis on identifying the molecular and cellular pathogenesis mechanisms, treatment and testing of new drugs.

Key words: iPSC; cardiomyopathy; disease modeling

Received 15 September 2015. Accepted 18 November 2015.