



Ключевые транскриптомные характеристики нативного ритмоводителя сердца крысы, их изменение при культивировании неонатальных кардиомиоцитов и использование для оценки пейсмекерной компетентности

О.Б. Пустовит^{1,*} , А.М. Кархов^{1,2} , В.С. Кузьмин^{1,2} 

¹Кафедра физиологии человека и животных, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

²Научно-исследовательский институт экспериментальной кардиологии имени академика В.Н. Смирнова, Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова Минздрава России, Россия, 121552, г. Москва, ул. Академика Чазова, д. 15а

*e-mail: k_pustovit@mail.ru

Важной задачей на пути создания компетентного клеточного эквивалента биологического пейсмекера сердца для терапии сердечно-сосудистых заболеваний является оценка способности культивируемых кардиомиоцитов в конгломератах, слоях или псевдоткани к автоматической спонтанной активности. Известно, что электрофизиологические и тканевые свойства культивируемых кардиомиоцитарных структур существенно отличаются от нативных. В данной работе, на основании сопоставления транскрипционного профиля, оценки уровня экспрессии ключевых генов в ткани синоатриального узла (САУ), предсердия, неонатальных и культивируемых кардиомиоцитарных конгломератов крысы, предложены индексы пейсмекерной компетентности (ИПК), характеризующие способность (компетентность) клеточных структур к функционированию в качестве ритмоводителя. С помощью анализа данных секвенирования мРНК установлено, что при культивировании неонатальных кардиомиоцитов происходит существенное изменение профиля экспрессии функционально значимых генов, которое усиливает отличие фенотипа формирующихся конгломератов как от пейсмекера САУ, так и от сократительного миокарда. Впервые показано, что удовлетворительные ИПК могут быть получены на основе оценки уровня мРНК транскриптов не более четырех генов, включающих антагонистически экспрессируемые в САУ и сократительном миокарде пары транскрипционных факторов (*Tbx3*, *Tbx18* и *Nkx2.5*, *Gata4*) либо пары ионных каналов (*Hcn4*, *Kcnj2*) и щелевых контактов (*Gjc1*, *Gja1*). Использование ИПК упрощает и ускоряет оценку функциональных свойств искусственных спонтанно-активных кардиомиоцитарных клеточных конструкций.

Ключевые слова: ритмоводитель сердца, искусственный биологический пейсмекер, транскрипционный профиль, клеточные конструкции, неонатальные кардиомиоциты, первичная культура кардиомиоцитов

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-4-1

Введение

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются лидирующей причиной смертности в мире и России. Нарушения ритма сердца – аритмии – обуславливают летальность ССЗ. Распространенными формами аритмий являются заболевания, при которых естественный, доминантный, ритмоводитель (пейсмекер) сердца – синоатриальный узел (САУ), или атрио-вентрикулярный узел – теряет способность генерировать нормальный ритм работы сердца и передавать возбуждение в рабочий

миокард, что приводит к дефициту кровоснабжения тканей организма [1, 2]. В настоящее время методы лечения дисфункции САУ основаны на малоэффективном фармакологическом, или интервенционном, подходе, при котором ритм сердца поддерживается за счет имплантации сложных, дорогостоящих и ненадежных кардиостимуляторов. В связи с вышесказанным значительные усилия направлены на создание искусственного биологического пейсмекера (ИБП) [3], замещающего САУ [4], однако проблема ИБП сердца до сих пор

не решена. Функционирование САУ как структуры, задающей момент возбуждения рабочего миокарда и ритм сердца, определяется электрофизиологическими характеристиками отдельных пейсмекерных кардиомиоцитов САУ [5, 6], а также электрофизиологическими свойствами САУ как тканевой структуры [7, 8]. Причины текущей неэффективности ИБП связаны с тем, что кардиомиоциты в составе клеточных структур, созданные с помощью профилирования индуцированных плюрипотентных стволовых клеток [9, 10], репрограммирования культивируемых кардиомиоцитов [11–13] или цитокиновой направленной дифференцировки неонатальных кардиомиоцитов, хоть и демонстрируют способность к автоматии – т.е. к спонтанному ритмическому возбуждению и сокращению [14] – но значительно отличаются по электрофизиологическим свойствам и характеру межклеточного взаимодействия от кардиомиоцитов нативного синусного узла [15, 16] и являются некомпетентными с точки зрения способности выполнять роль ритмоводителя сердца.

Важной задачей на пути создания компетентного клеточного эквивалента биологического пейсмекера сердца является оценка способности культивируемых кардиомиоцитов в конгломератах, клеточных слоях или псевдоткани к автоматической, спонтанной, активности.

Следует отметить, что, несмотря на значительный объем данных касательно истории исследования САУ [17, 18] и фенотипа кардиомиоцитов САУ [19, 20], перечень и набор ключевых маркерных генов и/или белков [21], которые высокоспецифически характеризовали бы кластеры нативных клеток, генерирующих ритм сердца, остаются размытым и не до конца определенным [22], особенно в случае САУ лабораторных животных.

Полнопрофильный транскриптомный анализ клеточных культуральных образцов является как ресурсо- так и времязатратным подходом при необходимости многократного тестирования [23]. Применение индексов, характеризующих способность к активации и генерации ритма – индексов пейсмекерной компетентности (ИПК) – может являться решением вышесказанной задачи. ИПК могут быть использованы для выявления изменений в культивируемых пейсмекероподобных структурах, а также для сопоставления свойств таких структур со свойствами нативных зрелых пейсмекеров.

В связи с вышесказанным, в данной работе впервые предложены ИПК, характеризующие способность клеточных структур к автоматии и сходство с пейсмекерными кардиомиоцитами САУ. ИПК получены на основании сопоставления транскрипционного профиля ткани САУ, сократительного миокарда левого предсердия взрослых крыс, неонатальных кардиомиоцитов и культивируемых кардиомиоцитарных конгломератов крысы.

2. Материалы и методы

2.1. Получение первичной культуры и культивирование кардиомиоцитов

Культура первичных неонатальных кардиомиоцитов (ННКМ) была получена при помощи энзиматической обработки изолированных желудочков сердца новорожденных крыс (Miltenyi Biotec, #130-105-420, согласно инструкции производителя; самцы крыс 20–24 ч после рождения, 1-е сут, P0). Использование новорожденных животных позволяет получить первичную культуру с высокой пролиферативной активностью. Для выделения клеток и получения первичных культур разные пометы объединяли так, чтобы суммарное количество животных составляло не менее 25. Полученные кардиомиоциты от отдельных животных объединяли (около 10 млн клеток), смешивали и высеивали из расчета 250 тыс. клеток на лунку (36 лунок). Клетки культивировали в 6-луночных планшетах (Corning, США) в среде DMEM/F12 (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (BioWest, Новая Зеландия), 2 мМ глутамин (ПанЭко, Россия), 100 мкг/мл стрептомицина и 100 Ед/мл пенициллина (ПанЭко, Россия) при 37°C в атмосфере с 21% O₂ и 5% CO₂, смена среды – каждые 48 ч. К 7-м сут культивирования происходило формирование кардиомиоцитарных конгломератов и клеточного псевдослоя, которые демонстрировали автоматическую, квазиритмическую, синхронную или несинхронную сократительную активность.

2.2. Транскриптомное секвенирование культивируемых кардиомиоцитов и тканевых образцов нативного САУ

Для профилирования неонатальных культивируемых кардиомиоцитов было выполнено секвенирование транскриптома клеток в момент получения (P0, n = 3, по 2 млн клеток), а также после 7-суточного периода культивирования (P7, n = 3). Для получения одного образца для секвенирования случайным образом объединяли клеточные слои из 12 лунок культуральных планшетов. Для этого клеточные слои лизировали в 1 мл extractRNA (Евроген, Россия) при +4°C и следовали дальнейшему протоколу или хранили при температуре -80°C.

Приготовление библиотек осуществляли набором RNA-seq Library Prep Kit for Illumina (Vazyme, Китай). Контроль качества библиотек проводили при помощи капиллярного электрофореза (Qsep400, High Sensitivity Cartridge Kit, Bioptic, Тайвань). Концентрацию библиотек измеряли при помощи SpectraQ HS (Raissol, Россия). Секвенирование проводили на приборе SURFSeq 5000 (GeneMind, Китай) с использованием набора SURFSeq 5000 Sequencing Kit V1.0 FCH 300cycles (GeneMind, Китай). Оценку качества секвенирования проводили при помощи программного обеспечения (ПО) FastQC.

Прочтения картировали на геном *R. norvegicus* с использованием программного обеспечения (ПО) STAR (версия 2.7.11b, mRatBN7.2) [24]. В качестве эталонного генома и аннотационной информации по генам использовали файлы fasta и gtf mRatBN7.2, полученные из базы данных Ensemble [25]. Секвенирование проводилось с использованием двухстороннего (paired-end) чтения, обеспечивающего среднюю глубину покрытия $42,35 \pm 3,59$ млн прочтений на образец. Количественные значения (TPM, transcripts per million) для каждого гена были определены по результатам выравнивания с помощью ПО featureCounts. Нормализацию данных проводили методом медианы отношений (relative log expression, RLE), при помощи программного пакета DESeq2 [26].

Для оценки степени сходства культивируемых кардиомиоцитов с нативными пейсмекерными кардиомиоцитами осуществляли транскриптомное секвенирование ткани нативного САУ ($n = 5$) и рабочего (сократительного) миокарда левого предсердия (ЛП, $n = 5$) самцов взрослых (P60, 250 г) крыс стока Wistar. Секвенирование тканевых образцов осуществляли вышеописанным способом. Эвтаназию и препаровку осуществляли согласно ранее описанному методу [27]. Тканевые образцы САУ (участок ткани «гладкостенной» ткани в межвенной области правого предсердия, окружающий бифуркацию артерии синусного узла, $6,9 \pm 1,1$ мг) и ЛП (трабекуляризованная ткань сегмента ушка левого предсердия, $9,5 \pm 2,1$ мг) помещали в 2 мл RNAlater (Евроген, Россия, 48 ч, $+4^{\circ}\text{C}$), после чего гомогенизировали и осуществляли пробоподготовку по инструкции производителя (GeneMind, Китай).

Исходя из нормализованных значений прочтений (нормализация с помощью RLE и ПО DESeq2) оценивали изменение экспрессии генов ключевых для кардиомиоцитов ионных каналов (*Hcn4* («пейсмекерные» каналы, активируемые гиперполяризацией и управляемые [цАМФ]), *Cacna1d* (CaV1.3), *Cacna1g* (CaV3.1)), *Scna5* (NaV1.5), *Kenj2* (Kir2.1), *Kenj12* (Kir2.2), *Cacna1c* (CaV1.2), *Cacna2d2* ($\alpha\Delta 2$ -Cav1.2), щелевых контактов *Gjc1* (Cx45), *Gjc3* (Cx29)), *Gja1* (Cx43), *Gja5* (Cx40), транскрипционных факторов (ТФ) – *Isl1*, *Shox2*, *Tbx3*, *Tbx18*, *Pitx2*, *Tbx5*, *Tbx20*, *Nkx2.5*, *GATA4*, регуляторных факторов (*Fxyd2* (γ -субъединица NKA), *Nppa* (NPA)), гена тяжелых цепей миозина (*Mylh6*).

Используя значения прочтений для определенного набора генов, экспрессируемых антагонистически (реципрочно) в САУ и предсердном миокарде, рассчитывали индексы, характеризующие свойства миокардиальных структур – ИПК. Из множества комбинаторно полученных индексов отбирали те, которые соответствуют основным условиям: включение в состав индекса не более пары антагонистически экспрессируемых генов; не сложные алгебраические операции; подгонка

целочисленных коэффициентов таким образом, чтобы значение индекса для САУ было равно 1.

Сконструировано четыре типа индексов: (1) учитывающие экспрессию ТФ ключевых для эмбриогенеза САУ; (2) учитывающие экспрессию ТФ, контролирующих гены ионных каналов и коннексинов; (3) учитывающие экспрессию генов, определяющих электрофизиологический фенотип ткани; (4) учитывающие гены, не влияющие напрямую на электрофизиологические свойства, но характеризующие тип миокардиальной ткани. В индексы включали пары или наборы генов, для которых ранее установлена и подтверждена «антагонистическая» или реципрочная экспрессия в двух типах миокардиальной ткани: САУ и рабочем (сократительный) миокарде (примером такой пары являются ТФ *Shox2* и *Pitx1*).

2.3. Статистическая обработка

Анализ дифференциальной экспрессии был проведен с помощью ПО DESeq2 [28]. В анализ дифференциальной экспрессии генов вошли 7068 белок-кодирующих генов с выраженной экспрессией. Средний уровень экспрессии аннотированных генов составлял 5220 TPM (transcripts per million). Поправку на множественность сравнений при выявлении дифференциально экспрессируемых генов проводили методом Бенджамини-Хохберга. При статистической значимости различий $\text{padj} < 0,01$ и разнице в уровне экспрессии более четырех раз (логарифм кратности различий – $\log_2(\text{fold change} > 2)$) гены считали дифференциально экспрессируемыми (дифференциальные гены) в САУ и ЛП.

Для выявления биологических путей и процессов, в которых обнаруживается наибольшее количество дифференциальных генов, проводили анализ обогащения связанных групп генов – т.н. «генных онтологий» (GO, gene ontology). Для анализа обогащения GO использовали функции ПО EnrichGO пакета clusterProfiler [29]. В качестве референтного набора использовали экспрессируемые в образцах гены после удаления низкоэкспрессируемых генов. Группу генов или генную онтологию считали статистически значимо измененной (обогащенной) при $\text{padj} < 0,01$ (с поправкой на множественное сравнение Бенджамини-Хохберга).

Непараметрический критерий Мана-Уитни ($p(U) < 0,05$) использовали для выявления различий значения ИПК для САУ и ЛП.

3. Результаты

3.1. Особенности транскрипционного профиля САУ крыс

В зрелом САУ крысы обнаруживается экспрессия ключевых ТФ, участвующих в дифференцировке и определении фенотипа кардиомиоцитов. Экспрессия эмбрионального ТФ *Isl1* составляет лишь

1,48 ± 0,91 TPM (единицы нормализации DESeq2 – 136 ± 11), тогда как для САУ взрослых крыс характерен крайне высокий уровень ключевого «пейсмекерного» ТФ *Shox2*, в то время как экспрессия ТФ рабочего миокарда *Pitx2* в САУ существенно ниже, чем *Shox2*. Уровень репрессоров транскрипции в САУ, способствующих поддержанию пейсмекерного фенотипа в кардиомиоцитах – *Tbx3* и *Tbx18* – является значимым. Важно, что экспрессия в САУ всех «рабочих» ТФ (*Tbx5*, *Tbx20*, *Nkx2.5*, *GATA4*) также значимо выше фонового уровня, но существенно ниже, чем в ЛП (табл. 1).

В САУ крысы высока экспрессия генов ионных каналов, необходимых для формирования пейсмекерных ионных токов в кардиомиоцитах и функционирования ритмоводителя – *Hcn4*, *Cacna1g* и *Cacna1d*. Также высок уровень экспрес-

сии генов щелевых контактов низкой проводимости *Gjc1* (*Cx45*) и *Gjc3* (*Cx29*).

На удивление, в САУ обнаруживается высокий, хотя и меньший, чем в ЛП, уровень мРНК транскриптов «рабочих» щелевых контактов *Gja1* (*Cx43*), а также высокий, сопоставимый со значениями в ЛП, уровень мРНК транскриптов генов натриевых (*Scn5a*, *Nav1.5*), калиевых *Kcnj2*, *Kcnj12* (*Kir2.1/2.2*) и кальциевых (*Cacna1c*, *CaV1.2*) ионных каналов сократительных («непейсмекерных») кардиомиоцитов.

Важно, что в ткани САУ крысы крайне высоко количество мРНК транскриптов гена (*Nppa*) предсердного натрийуретического пептида (ANP, atrial natriuretic peptide): уровень *Nppa* в ЛП является наибольшим для всех выбранных генов (табл. 1).

Таблица 1

Нормализованное количество прочтений фрагментов мРНК ключевых генов, определяющих фенотип кардиомиоцитов в САУ и ЛП, а также в неонатальных кардиомиоцитах (P0) и в культивируемых в течение 7 сут кардиомиоцитах (P7)

	Ген	САУ (P60), n = 5	ЛП (P60), n = 5	неонат. кмц. (P0)	культ. кмц. (P7)
1	<i>Gjc1*</i>	2703 ± 189	2542 ± 229	4097 ± 328	2305 ± 184
	<i>Gja1</i>	62287 ± 4983	125822 ± 8808	27916 ± 2512	21531 ± 1722
	<i>Gja5</i>	3098 ± 248	428 ± 30	3442 ± 275	32619 ± 2610
	<i>Gjc3*</i>	215 ± 17	61 ± 4	17 ± 1	11 ± 1
2	<i>Tbx3*</i>	2719 ± 190	213 ± 15	664 ± 60	136 ± 10
	<i>Tbx18*</i>	4262 ± 384	2975 ± 208	6165 ± 493	2596 ± 182
	<i>Nkx2-5</i>	400 ± 36	462 ± 37	926 ± 74	517 ± 41
	<i>Gata4</i>	11639 ± 815	12625 ± 1010	12835 ± 1027	8458 ± 677
	<i>Tbx5</i>	14256 ± 1141	21002 ± 1680	438 ± 31	306 ± 28
	<i>Tbx20</i>	166 ± 12	386 ± 31	12191 ± 853	4141 ± 290
	<i>Isl1*</i>	136 ± 11	0	16 ± 1	26 ± 2
	<i>Pitx2</i>	652 ± 52	2230 ± 178	129 ± 12	118 ± 9
	<i>Shox2*</i>	19256 ± 1348	211 ± 15	100 ± 8	231 ± 18
3	<i>Hcn4*</i>	12735 ± 1146	1842 ± 166	222 ± 20	86 ± 7
	<i>Scn5a</i>	37258 ± 2608	20193 ± 1615	4903 ± 343	1566 ± 110
	<i>Kcnj2</i>	2514 ± 201	3499 ± 245	3562 ± 249	1709 ± 120
	<i>Kcnj12</i>	6400 ± 576	7407 ± 667	470 ± 38	158 ± 14
	<i>Cacna1g*</i>	20532 ± 1437	19080 ± 1336	4282 ± 300	2418 ± 169
	<i>Cacna2d2</i>	14784 ± 1331	10498 ± 945	2388 ± 215	1274 ± 102
	<i>Cacna1d*</i>	2245 ± 180	1467 ± 117	159 ± 11	341 ± 24
	<i>Cacna1c</i>	4822 ± 434	4998 ± 350	2145 ± 193	1627 ± 146
4	<i>Nppa</i>	959723 ± 76778	2645636 ± 211651	26562 ± 2391	78428 ± 6274
	<i>Fxyd2</i>	1616 ± 129	802 ± 72	105 ± 8	7475 ± 598
	<i>Myh6</i>	1443580 ± 129922	1804878 ± 162439	83357 ± 5835	90854 ± 8177
	<i>Rplp0</i>	5000 ± 450	0	93064 ± 6514	150768 ± 12061

Примечание: 1 – щелевые контакты; 2 – транскрипционные факторы, 3 – ионные каналы, 4 – регуляторные факторы. * – ключевые гены кардиомиоцитов с пейсмекерным электрофизиологическим фенотипом. Неонат. кмц. – неонатальные кардиомиоциты; культ. кмц. – культивируемые кардиомиоциты и формируемые ими клеточные структуры

3.2. Особенности транскрипционного профиля и функциональные свойства неонатальных кардиомиоцитов крысы

Ключевые ТФ (*Isl1*, *Shox2*), определяющие дифференцировку клеток по пейсмерному типу в неонатальных кардиомиоцитах, обнаруживаются на фоновом уровне. Тем не менее, количество мРНК транскриптов гена ТФ – *TBX3*, значимо выше фоновой, а экспрессия другого ТФ, критически значимого для реализации пейсмерной программы – *TBX18* – сравнима с таковой в нативном САУ. Экспрессия в неонатальных кардиомиоцитах «рабочих» ТФ (*Tbx5*, *Tbx20*, *Nkx2.5*, *GATA4*) значимо выше фонового уровня: для *Nkx2.5* и *GATA4* уровень экспрессии сопоставим с таковым в зрелом миокарде, а для *TBX20* значения существенно выше, чем в тканевых образцах САУ и ЛВ взрослых крыс.

Для неонатальных кардиомиоцитов крысы характерно значительное количество мРНК транскриптов генов пейсмерных щелевых контактов и ионных каналов – *Gjc1* (*Cx45*), *Cacna1g* (*CaV3.1*). Тем не менее, для неонатальных кардиомиоцитов характерна крайне низкая экспрессия гена *Hcn4*.

Неонатальные кардиомиоциты демонстрируют значительный уровень экспрессии гена высокопроводящих «рабочих» щелевых контактов *Gja1*, заметный уровень экспрессии генов *Snc5a* и *Cacna1c*, характерных для сократительных кардиомиоцитов, а также сопоставимый с уровнем экспрессии *Kcnj2* (*Kir2.1*) в зрелых тканях.

Для неонатальных кардиомиоцитов характерна высокая экспрессия *Nppa*. Следует отметить, что этот уровень почти на два порядка ниже, чем в ЛП, и более чем на порядок ниже, чем в САУ (табл. 1).

3.3. Изменение профиля экспрессии генов при культивировании кардиомиоцитов крысы

При культивировании (P0 → P7) ННКМ происходит существенное изменение транскрипционного профиля, сопровождаемое как значимым повышением (270 генов), так и понижением (196 генов) экспрессии (рис. 1А). Дифференциальные гены относятся к множеству групп. Сопоставление транскриптома в группах P0 и P7 позволило обнаружить ГО, что указывает на упорядоченное изменение экспрессии. В частности, анализ функционального обогащения выявил группы, связанные с контро-

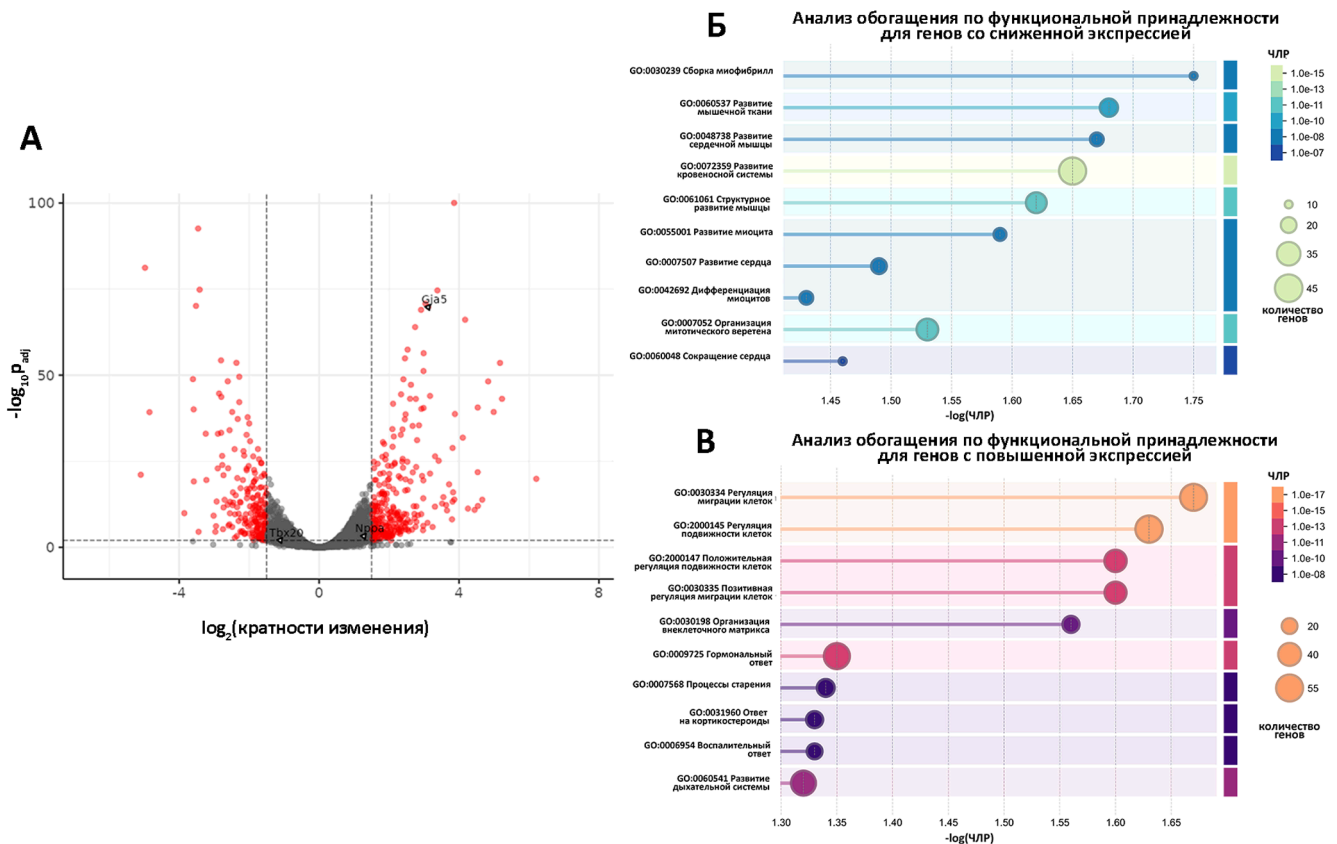


Рис. 1. Изменение профиля экспрессии генов в ходе культивирования митотически активных неонатальных кардиомиоцитов крысы. **(А)** Диаграмма рассеяния (вулкан-плот), демонстрирующая дифференциально-экспрессируемые гены в неонатальных кардиомиоцитах крысы (P1) и на 7-е сут (P7) культивирования. По оси абсцисс – величина различия (логарифм кратности изменений), по оси ординат – значимость различий (отрицательный логарифм p_{adj}). Красным цветом показаны гены, экспрессия которых значимо изменена ($p_{adj} < 0,01$ или $-\log(p_{adj}) > 2$, а кратность изменения > 2 , P7 vs P1). **(Б)** Анализ обогащения групп генов со значимо уменьшенной (P7 vs P1) экспрессией, вовлеченных в регуляцию указанных биологических процессов (GO). **(В)** Анализ обогащения групп генов со значимо увеличенной экспрессией (P7 vs P1), вовлеченных в регуляцию указанных биологических процессов (GO). По оси абсцисс – индекс обогащения, рассчитываемый как \log_{10} (доля дифференциальных генов группы). ЧЛР – частота ложноположительных результатов. Размер маркеров пропорционален количеству генов в аннотированной категории.

лем дифференцировки кардиомиоцитов, индукцией мышечного фенотипа и контролем морфогенеза сердца (рис. 1Б). Среди групп генов, экспрессия которых увеличена, обнаруживаются группы, связанные с подвижностью клеток и продукцией внеклеточного матрикса (рис. 1В).

При рассмотрении отдельных генов, являющихся ключевыми для определения электрофизиологического фенотипа кардиомиоцитов, обнаружили, что недельное культивирование ННКМ сопровождается снижением количества мРНК транскриптов большинства как «пропейсмекерных» (*Isl1*, *Shox2*, *Tbx3*, *Tbx18*, *Hcn4*, *Cacna1g* (*CaV3.1*)), *Gjc1* (*Cx45*), *Gjc3* (*Cx29*)), так и «рабочих» генов (*Pitx2*, *Tbx5*, *Tbx20*, *Nkx2.5*, *GATA4*, *Scna5* (*NaV1.5*)), *Kcnj2* (*Kir2.1*)), *Kcnj12* (*Kir2.2*)), *Cacna1c* (*CaV1.2*)), *Cacna2d2* ($\alpha2\Delta2$ -*Cav1.2*)), *Gja1* (*Cx43*) (рис. 2А–В). Уровень эмбрионального ТФ *Isl1* в ННКМ (P7) близок к фоновому значению, схожему с этим показателем для нативной ткани ЛП.

Особенностью ННКМ является заметное увеличение уровня мРНК транскриптов ТФ *Shox2*, генов ANP (*Nppa*) и *Cx40* (*Gja5*) и регулятора активности Na/K-АТФазы (*Fxyd2*) (табл. 1). В целом, соотношение экспрессии «пропейсмекерных» генов для культивируемых спонтанно активных ННКМ (P7/P0) существенно отличается от такового, наблюдаемого в нативных тканях (САУ/ЛП, рис. 2Г).

3.4. Индексы, характеризующие пейсмекерную компетентность культивируемых миокардиальных структур

Индексы, основанные на экспрессии таких ТФ, как *Isl1*, *Shox2* и *Pitx1*, и их соотношении, позволяют дискриминировать пейсмекерный миокард САУ и рабочий миокард, некоторые – с высокой степенью значимости ($p < 0,001$, табл. 2, строка 1). Однако между значениями для кардиомиоцитов (P0) и культивируемых клеточных структур (P7) не выявлено различий.

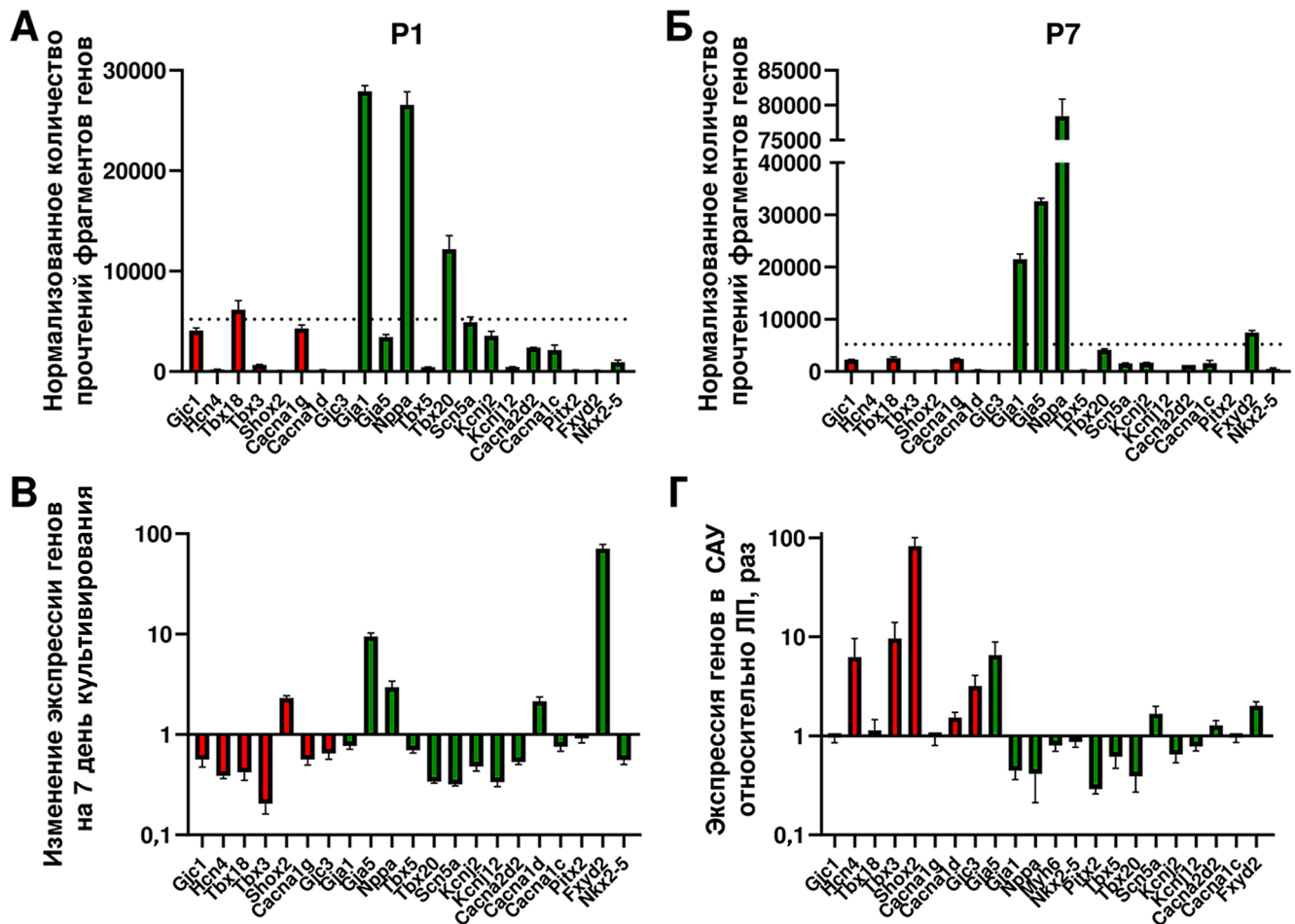


Рис. 2. Экспрессия ключевых генов, определяющих электрофизиологические свойства, пейсмекерных и рабочих кардиомиоцитов в ткани нативного САУ и культивируемых неонатальных кардиомиоцитах. (А, Б) Экспрессия генов ионных каналов (*Hcn4*, *Cacna1d* (*CaV1.3*)), *Cacna1g* (*CaV3.1*)), щелевых контактов (*Gjc1* (*Cx45*)), *Gjc3* (*Cx29*)), транскрипционных факторов (*Shox2*, *Tbx3*, *Tbx18*), критически важных для реализации автоматической пейсмекерной активности, а также экспрессия ключевых генов «рабочего» (сократительного) фенотипа (*Scna5* (*NaV1.5*)), *Kcnj2* (*Kir2.1*)), *Kcnj12* (*Kir2.2*)), *Cacna1c* (*CaV1.2*)), *Cacna2d2* ($\alpha2\Delta2$ -*Cav1.2*)), *Fxyd2* (γ -субъединица NKA), *Gja1* (*Cx43*)), *Gja5* (*Cx40*)), *Pitx2*, *Tbx5*, *Tbx20*, *Nppa* (NPA) в неонатальных кардиомиоцитах крысы (А, P1) и на 7-е сут (Б) культивирования. Пунктиром показан средний уровень экспрессии аннотированных генов, определяемый в образцах. (В) Кратность изменения экспрессии ключевых генов «пейсмекерного», а также «рабочего» фенотипа, обнаруживаемая после недельного культивирования неонатальных кардиомиоцитов. (Г) Соотношение экспрессии генов, определяющих электрофизиологический фенотип кардиомиоцитов в САУ и рабочем миокарде левого предсердия (ЛП) взрослых крыс.

Среди остальных типов индексов отбирали те, значение которых для САУ стремились к 1, а значение для ЛП < 0,4. Среди всех протестированных индексов для САУ и ЛП отобрано восемь, попадающих в пределы заданных диапазонов и позволяющих значимо дискриминировать САУ и ЛП ($p < 0,05$).

Среди отобранных дискриминирующих индексов некоторые индексы обладали крайне низкими значениями для неонатальных кардиомиоцитов (P0) или культивируемых НКМ (P7). Таким образом, вышеуказанная группа индексов не позволяет оценить функциональные свойства клеточных структур. Тем не менее, вышеуказанная группа индексов позволяет оценить степень сходства транскрипционного профиля (СТП) (табл. 1, СТП) нативного пейсмекера и клеточных структур, проявляющих способность к автоматии. Другая часть дискриминирующих индексов принимала для групп P0 и P7 значения меньшие, чем для САУ, но существенно большие, чем для рабочего миокарда. Индексы этой группы рассматри-

вались как валидные индексы пейсмекерной компетентности (табл. 2, ИПК №1 – №3), поскольку их значения соотносятся как с транскрипционным профилем, так и с функциональными свойствами нативных и культивируемых структур.

4. Обсуждение

4.1. Особенности транскрипционного профиля ткани нативного зрелого ритмоводителя сердца крысы

Впервые для зрелого нативного САУ крысы определено соотношение экспрессия ключевых генов, участвующих в эмбриогенезе, морфогенезе САУ, дифференцировке кардиомиоцитов по «пейсмекерному» типу и поддерживающих пейсмекерный электрофизиологический фенотип кардиомиоцитов.

Установлено, что для ткани САУ крысы, помимо экспрессии типичных «пейсмекерных» генов (*Hcn4*, *Cacna1d*, *Cacna1g*, *Gjc1*) характерны такие особенности, как достаточно высокий уровень мРНК транскриптов ТФ *Shox2* и *TBX3*, ассоциируемых с эмбриональными структурами сердца [30];

Таблица 2

Индексы пейсмекерной компетентности (ИПК) и индексы сходства транскрипционного профиля (СТП) для кардиомиоцитов крысы

N	Тип	Индекс	САУ (P60)	ЛП (P60)	Неонат. кмц. (P0)	Культ. кмц. (P7)
1	–	$\frac{Isl1}{Rplp0}$	0,027 ± 0,001	0	0,0002 ± 0,00001	0,0002 ± 0,00001
		$\frac{Shox2}{Pitx2}$	29,5 ± 1,6	0,095 ± 0,006	0,77 ± 0,21	1,95 ± 0,44
2	ИПК1*	$\frac{(3Tbx3 + TBX18)}{(Nkx2.5 + GATA4)}$	1,032 ± 0,081	0,276 ± 0,031	0,592 ± 0,039	0,334 ± 0,029
	СТП1	$\frac{(Tbx3 + TBX18)}{TBX20}$	1,050 ± 0,120	0,276 ± 0,033	0,014 ± 0,006	0,016 ± 0,09
3	ИПК2*	$\frac{(Hcn4 + Gjc1)}{(Kcnj2 + 0,2Gja1)}$	1,031 ± 0,09	0,153 ± 0,09	0,472 ± 0,09	0,397 ± 0,09
	СТП2	$\frac{(Hcn4 + Cacna1d)}{(Kcnj2 + 0,2Gja1)}$	1,001 ± 0,091	0,115 ± 0,018	0,042 ± 0,005	0,071 ± 0,007
		$\frac{(Hcn4 + Cacna2d2)}{10Kcnj2}$	1,094 ± 0,120	0,353 ± 0,044	0,073 ± 0,008	0,079 ± 0,011
4	ИПК3*	$\frac{Hcn4 \times Gjc1}{100\sqrt{Gja1} \times Nppa}$	1,408 ± 0,151	0,081 ± 0,009	0,334 ± 0,029	0,048 ± 0,010
	–	$\frac{Cacna1d \times Gjc1}{25\sqrt{Gja1} \times Nppa}$	0,993 ± 0,098	0,258 ± 0,021	0,956 ± 0,018	0,765 ± 0,088

Примечание: 1–4 – тип индекса. (1) – индексы, учитывающие экспрессию ключевых эмбриональных транскрипционных факторов САУ; (2) – индексы, основанные на ТФ, контролирующими гены ионных каналов и переносчиков; (3) – индексы, учитывающие экспрессию только генов ионных каналов и щелевых контактов; (4) – гибридные индексы, учитывающие экспрессию гена натрий-уретического пептида. СТП1-2 – индексы сходства с транскрипционным профилем САУ, характеризующий «пейсмекероподобность» клеток или структур. САУ – синоатриальный узел, ЛП – левое предсердие, неонат.кмц. – неонатальные кардиомиоциты, культ.кмц. – культивируемые кардиомиоциты и формируемые ими клеточные структуры. * – $p(U) < 0,05$ (САУ vs ЛП).

высокий уровень генов нетипичных щелевых контактов *Gjc3* (Cx29), генов «рабочих» кальциевых *Cacna1c* (CaV1.2) и других каналов, а также высокий уровень мРНК транскриптов гена ANP (*Nppa*), рассматриваемого как типичный маркер сократительного предсердного миокарда. Наличие мРНК транскриптов вышеперечисленных генов в ткани САУ может быть связано с крайней гетерогенностью клеточной организации пейсмекера и «вкраплением» групп клеток с рабочим фенотипом. Вероятно, такие особенности организации являются необходимыми для реализации пейсмекерной функции САУ и должны быть учтены при моделировании ИБП.

4.2. Особенности транскрипционного профиля неонатальных кардиомиоцитов и его смещение при культивировании клеток

Секвенирование мРНК впервые позволило установить, что для неонатальных кардиомиоцитов характерна экспрессия генов, типичных для «рабочего» миокарда (*Scna5*, *Kcnj2*, *Kcnj12*, *Cacna1c*, *Gja1*). Для ННКМ характерен высокий уровень экспрессии мРНК некоторых ТФ, стимулирующих «рабочий» фенотип и индуцирующих гены сократительного аппарата (*Tbx20*, *GATA4*), что, в целом, характерно для клеток, проходящих физиологическую гипертрофию и развивающихся в кардиомиоциты желудочкового миокарда. Тем не менее, в неонатальных кардиомиоцитах количество мРНК транскриптов типичного «пропейсмекерного» ТФ *TBX18* значительно выше среднего уровня экспрессии, что может способствовать активации «пейсмекерных» генов. Действительно, в ННКМ высок уровень *Cacna1g* (CaV3.1) и *Gjc1* (Cx45) – типичных для кардиомиоцитов САУ, демонстрирующих спонтанную автоматическую активность.

Важно, что количество мРНК транскриптов гена *Hcn4*, который рассматривается как основной маркер клеток «истинного» ритмоводителя сердца, в ННКМ крайне низко [31]. Таким образом, ННКМ обладают признаками, характерными для пейсмекерных кардиомиоцитов, демонстрируют «пейсмекерный» потенциал, но существенно отличаются от кардиомиоцитов САУ.

Хорошо известно, что ННКМ после периода адгезии (1–3-е сут культивирования) демонстрируют спонтанную ритмическую активность, проявляющуюся в колебаниях $[Ca^{2+}]_i$ и сокращениях. Учитывая низкий уровень мРНК ТФ (*Isl1*, *Shox2*, *Tbx3*), а также *Hcn4*, можно предположить, что способность ННКМ к ритмической активности обусловлена, преимущественно, механизмом, связанным с осцилляциями $[Ca^{2+}]_i$ – так называемыми «кальциевыми часами» автоматии [32]. Вероятно, спонтанные колебания $[Ca^{2+}]_i$ обусловлены его поступлением в цитоплазму через Ca-каналы *CaV3.1* (*Cacna1g*), экспрессия которых в ННКМ выше, чем *Cacna1d* (CaV1.3).

Формирование кардиомиоцитарных конгломератов и клеточного слоя приводит к существенному изменению транскрипционного профиля неонатальных кардиомиоцитов. При анализе обогащенных функциональных категорий установлено, что при культивировании оказываются изменены гены, связанные с развитием и дифференцировкой ткани миокарда. Подавление экспрессии отдельных генов наблюдается в категориях, ассоциированных с развитием мышечных компонентов миоцитов, что могло бы указывать на сдвиг фенотипа клеток к «пейсмекерному». С другой стороны, культивирование сопровождается снижением уровня мРНК транскриптов «пейсмекерных» генов (за исключением *Shox2*), а также большинства генов, определяющих электрофизиологические свойства. Таким образом, наблюдаемое изменение транскрипционного профиля при культивировании можно рассматривать как признак дедифференцировки клеток либо как смещение от условной антагонистической оси, полюсами которой являются «пейсмекерный» и «рабочий» транскриптом.

Несмотря на снижение уровня экспрессии пейсмекерных генов, ННКМ к P7 сохраняют и демонстрируют устойчивую автоматическую активность. Следует отметить, что при культивировании ННКМ существенно возрастает уровень мРНК транскриптов таких генов, как *Gja5* (Cx40), *Nppa* (ANP) и *Fxyd2*.

ТФ *GATA4*, *NKX2.5* и *TBX5* известны как «трансаktиваторы», способствующие усилению экспрессии *Nppa*. Высокий уровень *GATA4* в ННКМ на P0/P7 согласуется с достаточно высоким уровнем мРНК транскриптов *Nppa*.

Предсердный натрийуретический пептид хорошо известен как маркер гипертрофии и дифференцировки кардиомиоцитов по «желудочковому» сократительному фенотипу [33, 34]. В таком контексте нарастание уровня мРНК *Nppa* могло бы служить признаком дифференцировки и гипертрофии культивируемых в течение 7 сут клеток [35–38]. Как указано выше, анализ транскриптома не позволяет подтвердить дифференцировку и манифестацию желудочкового фенотипа. Ранее показано, что накопление ANP в культуре или увеличение его продукции нативной тканью связано с гипоксией, закислением среды, повреждением кардиомиоцитов [39]. Таким образом, одним из факторов, обуславливающих увеличение уровня мРНК *Nppa* в ходе культивирования, может являться повышение плотности клеток в среде и снижение доступности кислорода.

Рост экспрессии *Gja5* – гена щелевых контактов, характерных для проводящей системы желудочков [40, 41] – установлен в ходе культивирования кардиомиоцитов впервые в представленной работе. Известно, что дифференцировка $Cx40^+$ -кардиомиоцитов, являющихся структурными элементами

волокон Пуркинье, происходит под действием эндотелиальных и целого ряда других факторов [42]. Одним из стимуляторов преобразования эмбриональных кардиомиоцитов в клетки волокон Пуркинье является ANP [43]. Наши данные позволяют предположить, что уровень мРНК транскриптов *Nppa* и *Gja5* при культивировании кардиомиоцитов коррелирует. Вероятно, повышение количества мРНК транскриптов *Gja5*, сопровождающееся снижением экспрессии *Gja1* (Cx43) в ходе культивирования, является результатом продукции и накопления значительного количества ANP. Экспрессия *Gja5* может приводить к повышению количества функционального белка щелевых контактов Cx40 в мембране культивируемых клеток. Полученные данные о повышении экспрессии мРНК *Nppa/Gja5* позволяют сформулировать гипотезу, согласно которой культивирование неонатальных кардиомиоцитов может сопровождаться манифестацией фенотипа, характерного для волокон Пуркинье.

4.3. Индексы пейсмекерной компетентности

Поскольку способность к автоматической активности и электрофизиологический фенотип кардиомиоцитов определяются набором экспрессируемых в них транскрипционных факторов, то логичным начальным подходом для конструирования ИПК могло бы быть использование уровня мРНК ТФ. Одним из основных ТФ, управляющих эмбриогенезом САУ, является *Isl1* [14, 44]. Значительная часть предшественников кардиомиоцитов САУ происходит из пула мезодермальных клеток $Isl1^+/Nkx2.5^-$. Тем не менее, уровень мРНК транскриптов *Isl1* в изолированных неонатальных и культивируемых кардиомиоцитах, а также в рабочем миокарде сравним с фоновым, что не позволяет использовать этот ТФ в качестве ИПК.

Известно, что *Shox2* и *Pitx2* являются ключевой антагонистической парой ТФ, определяющих тип развивающегося миокарда, экспрессию других ТФ и электрофизиологический фенотип кардиомиоцитов [14]. Действительно, экспрессия *Shox2* в нативном САУ в 90 раз выше экспрессии *Shox2* в ЛП. Для *Pitx2* наблюдается обратное: его уровень в ЛП существенно выше фонового, а также в 3 раза выше, чем в САУ. Соотношение *Shox2/Pitx2* могло бы быть идеальным ИПК, поскольку для нативных САУ и ЛП различается более, чем в 300 раз. Однако количество прочтений как *Shox2*, так и *Pitx2* в культивируемых кардиомиоцитах является крайне низким и сходным, что делает соотношение *Shox2/Pitx2* ненадежным ИПК при оценке модельных клеточных структур.

Shox2 контролирует активность таких «пропейсмекерных» ТФ как *Tbx3* и *Tbx18* [45], служит репрессором для «рабочих» ТФ *Nkx2.5/GATA4/Tbx5* и *Tbx20* (трансактиватором для которых яв-

ляется *Pitx2*) [46, 47]. Комбинирование пар антагонистических ТФ позволяет получить индексы, адекватно отражающие свойства САУ, предсердного миокарда, культивируемых кардиомиоцитарных конгломератов. Как указано выше, автоматия любых кардиомиоцитоподобных клеток невозможна без такого смещения профиля ТФ, при котором возникает преобладание «пропейсмекерных» и подавление экспрессии «рабочих» ТФ. В данном контексте разработанные индексы, учитывающие соотношение уровня мРНК ТФ (ИПК1, СТП1, табл. 2), могут использоваться для оценки пейсмекерной компетентности разного рода клеток, индуцированных из плюрипотентных стволовых, мезенхимальных, эмбриональных и прочих клеток.

Количество «фенотипических» ИПК, учитывающих экспрессию генов, кодирующих ионные каналы, щелевые контакты и другие структуры, напрямую определяющие электрофизиологические свойства ткани, может быть гораздо большим, чем количество ИПК вышеуказанных двух типов. Тем не менее, нам удалось сконструировать только три индекса, позволяющих удовлетворительно ранжировать САУ, ЛП, НК (табл. 2, СТП2, ИПК2). Вероятно, причиной сложности создания индексов данного типа является некогерентное смещение экспрессии генов внутри группы, ответственной за «пейсмекерный» или «рабочий» фенотип, как показано в наших экспериментах с культивированием НКМ.

Наконец, нами показано, что приемлемыми могут являться гибридные индексы, включающие гены, напрямую не касающиеся электрофизиологических характеристик кардиомиоцитов. Щелевые контакты необходимы для синхронизации активности клеток и передачи волны возбуждения к сократительным кардиомиоцитам, т.е. являются ключевыми молекулами, обуславливающими функцию ритмоводителя как тканевой структуры. Вероятно, культивирование искусственных тканеподобных кардиомиоцит-содержащих структур всегда сопровождается экспрессией *Nppa*, которая, к тому же, регулирует экспрессию генов щелевых контактов. Таким образом, наиболее удачными в этой категории оказались индексы, учитывающие экспрессию генов «антагонистических» щелевых контактов (*Cx43/Cx45*) и *Nppa* (табл. 2, ИПК3).

5. Ограничения расчета и применимости ИПК

«Конструирование» ИПК, очевидно, имеет ограничения и требует учета нескольких факторов. Во-первых, уровень детектирования факторов (экспрессируемых генов), включаемых в ИПК, должен быть существенно выше фонового уровня. Оценка абсолютного значения экспрессии гена (количество прочтений) зависит от качества образцов, сохранности и качества мРНК, метода анализа и пр. Поэтому для норми-

ровки в ИПК должны быть включены гены, которые экспрессируются реципрокно или антагонистически в пейсмекерном и непейсмекерном миокарде. Использование для ИПК «антагонистических» генов позволяет соблюсти принцип дифференциальности, применимый для анализа данных РНК-секвенирования и полимеразной цепной реакции.

Как установлено в наших экспериментах, в клеточных моделях может наблюдаться сильное подавление одного из ключевых «пейсмекерных» генов (например, *Isl1* или *Hcn4*), а также усиление экспрессии других генов (*Tbx18*) с сохранением способности к автоматии. Вероятно, несмотря на необходимость максимального упрощения, ИПК должен включать более двух параметров. Значения ИПК должны различаться в несколько раз (> 3) при его расчете для нативного САУ и рабочего сократительного миокарда. Так как культивируемые, модельные, структуры могут отличаться по транскрипционному профилю и свойствам от нативной ткани САУ и рабочего сократительного миокарда, только значительный диапазон различий позволит их дифференцировать и классифицировать. Очевидно, что в предполагаемом индексе должны быть учтены особенности экспрессии генов, являющихся ключевыми для пейсмекерных кардиомиоцитов САУ и значимыми для реализации пейсмекерной функции. То есть включение в ИПК того или иного фактора (гена ТФ или ионного канала) должно быть функционально обосновано.

6. Заключение

В работе выявлены особенности транскрипционного профиля ткани ритмоводителя взрослых крыс. Ткань САУ, неонатальные и культивируемые кардиомиоциты значительно различаются по соотношению экспрессии генов, участвующих

в морфогенезе, дифференцировке и контроле электрофизиологических свойств. Неонатальные кардиомиоциты, экспрессируя такие гены, как *Shox2*, *Tbx18* и *Gjc1*, демонстрируют «пейсмекерный потенциал». Культивирование неонатальных кардиомиоцитов, сопровождаемое формированием ими тканеподобных структур, приводит к существенному смещению транскрипционного профиля. Это смещение затрагивает группы генов, участвующих в гипертрофии клеток, контроле сократимости, способствует появлению признаков, характерных для кардиомиоцитов проводящей системы желудочков.

На основе сопоставления экспрессии группы генов в культивируемых кардиомиоцитах, предсердной ткани и ткани САУ впервые предложены индексы «пейсмекерной компетентности», позволяющие оценить сходство нативной ткани САУ и псевдоткани, а также ее способность функционировать как искусственный биологический пейсмекер.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 24-75-00023). В работе было использовано оборудование, приобретенное МГУ имени М.В. Ломоносова в рамках федерального проекта «Развитие инфраструктуры для научных исследований и подготовки кадров» национального проекта «Наука и университеты» от 29.12.2022г №15-пр/42 (соглашение №355 от 15.03.2024 г.). Все процедуры осуществляли в соответствии с нормами биоэтики (решение комиссии по биоэтике Национального медицинского исследовательского центра кардиологии имени академика Е.И. Чазова, председатель комиссии по биоэтике докт. мед. наук Т.И. Арефьева, регистрационный номер «ЛЭС/18.10.24» от 18.10.24 г.). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Csepe T.A., Kalyanasundaram A., Hansen B.J., Zhao J., Fedorov V.V. Fibrosis: a structural modulator of sinoatrial node physiology and dysfunction. *Front. Physiol.* 2015;6:37.
2. Dobrzynski H., Boyett M.R., Anderson R.H. New insights into pacemaker activity: promoting understanding of sick sinus syndrome. *Circulation.* 2007;115(14):1921–1932.
3. Cingolani E., Goldhaber J.I., Marbán E. Next-generation pacemakers: from small devices to biological pacemakers. *Nat. Rev. Cardiol.* 2018;15(3):139–150.
4. Naumova N., Iop L. Bioengineering the cardiac conduction system: advances in cellular, gene, and tissue engineering for heart rhythm regeneration. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021;(9):673477.
5. Воронина Я.А., Кархов А.М., Кузьмин, В.С. Современные представления о структурной основе и молекулярных механизмах трансмембранного транспорта С1 в кардиомиоцитах. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16: Биология.* 2024;79(2S):22–36.
6. Park D.S., Fishman G.I. The cardiac conduction system. *Circulation.* 2011;123(8):904–915.
7. Boyett M.R., Honjo H., Kodama I. The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovasc. Res.* 2000;47(4):658–687.
8. Dobrzynski H., Li J., Tellez J., Greener I.D., Nikol'ski V.P., Wright S.E., Parson S.H., Jones S.A., Lancaster M.K., Yamamoto M., Honjo H., Takagishi Y., Kodama I., Efimov I.R., Billeter R., Boyett M.R. Computer three-dimensional reconstruction of the sinoatrial node. *Circulation.* 2005;111(7):846–854.
9. Schweizer P.A., Darche F.F., Ullrich N.D., Geschwill P., Greber B., Rivinius R., Seyler C., Müller-Decker K., Draguhn A., Utikal J., Koenen M., Katus H.A., Thomas D. Subtypespecific differentiation of cardiac pacemaker cell clusters

- ters from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* 2017;8(1):229.
10. Protze S.I., Liu J., Nussinovitch U., Ohana L., Backx P.H., Gepstein L., Keller G.M. Sinoatrial node cardiomyocytes derived from human pluripotent cells function as a biological pacemaker. *Nat. Biotechnol.* 2017;35(1):56–68.
11. Zhao H., Wang F., Zhang W., Yang M., Tang Y., Wang X., Zhao Q., Huang C. Overexpression of TBX3 in human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) increases their differentiation into cardiac pacemaker-like cells. *Biomed. Pharmacother.* 2020;130:110612.
12. Gorabi A.M., Hajjghasemi S., Khorri V., Soleimani M., Rajaei M., Rabhani S., Atashi A., Ghiaseddin A., Saeid A.K., Ahmadi Tafti H., Sahebkar A. Functional biological pacemaker generation by T-Box18 protein expression via stem cell and viral delivery approaches in a murine model of complete heart block. *Pharmacol. Res.* 2019;141:443–450.
13. Bakker M.L., Boink G.J.J., Boukens B.J., Verkerk A.O., van den Boogaard M., den Haan A.D., Hoogaars W.M., Buermans H.P., de Bakker J.M., Seppen J., Tan H.L., Moorman A.F., 't Hoen P.A., Christoffels V.M. T-box transcription factor TBX3 reprogrammes mature cardiac myocytes into pacemaker-like cells. *Cardiovasc. Res.* 2012;94(3):439–449.
14. Кузьмин В.С., Каменский А.А. Молекулярные механизмы онтогенеза ритмоводителя сердца у позвоночных животных. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16: Биология.* 2021;76(4):183–201.
15. Muñoz V., Campbell K., Shibayama J. Fibroblasts: modulating the rhythm of the heart. *J. Physiol.* 2008;586(10):2423–2424.
16. Fahrenbach J.P., Mejia-Alvarez R., Banach K. The relevance of non-excitabile cells for cardiac pacemaker function. *J. Physiol.* 2007;585(Pt. 2):565–578.
17. James T.N. Anatomy of the human sinus node. *Anat. Rec.* 1961;141:109–139.
18. Chandler N.J., Greener I.D., Tellez J.O., Inada S., Musa H., Molenaar P., Difrancesco D., Baruscotti M., Longhi R., Anderson R.H., Billeter R., Sharma V., Sigg D.C., Boyett M.R., Dobrzynski H. Molecular architecture of the human sinus node: insights into the function of the cardiac pacemaker. *Circulation.* 2009;119(12):1562–1575.
19. Dobrzynski H., Anderson R.H., Atkinson A., et al. Structure, function and clinical relevance of the cardiac conduction system, including the atrioventricular ring and outflow tract tissues. *Pharmacol. Ther.* 2013;139(2):260–288.
20. Chandler N.J., Greener I.D., Tellez J.O., Inada S., Musa H., Molenaar P., Difrancesco D., Baruscotti M., Longhi R., Anderson R.H., Billeter R., Sharma V., Sigg D.C., Boyett M.R., Dobrzynski H. Molecular architecture of the human sinus node: insights into the function of the cardiac pacemaker. *Circulation.* 2009;119(12):1562–1575.
21. Aminu A.J., Petkova M., Atkinson A.J., Yanni J., Morris A.D., Simms R.T., Chen W., Yin Z., Kuniewicz M., Holda M.K., Kuzmin V.S., Perde F., Molenaar P., Dobrzynski H. Further insights into the molecular complexity of the human sinus node – The role of ‘novel’ transcription factors and microRNAs. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2021;166:86–104.
22. Mommersteeg M.T.M., Hoogaars W.M.H., Prall O.W.J., de Gier-de Vries C., Wiese C., Clout D.E., Papaioannou V.E., Brown N.A., Harvey R.P., Moorman A.F., Christoffels V.M. Molecular pathway for the localized formation of the sinoatrial node. *Circ. Res.* 2007;100(3):354–362.
23. Goodyer W.R., Beyersdorf B.M., Paik D.T., Tian L., Li G., Buikema J.W., Chirikian O., Choi S., Venkatraman S., Adams E.L., Tessier-Lavigne M., Wu J.C., Wu S.M. Transcriptomic. Transcriptomic profiling of the developing cardiac conduction system at single-cell resolution. *Circ. Res.* 2019;125(4):379–397.
24. de Jong T.V., Pan Y., Rastas P., et al. A revamped rat reference genome improves the discovery of genetic diversity in laboratory rats. *Cell. Genom.* 2024;4(4):100527.
25. Ensembl [Электронный ресурс]. 2025. URL: <https://www.ensembl.org> (дата обращения: 01.02.2025).
26. Love M.I., Huber W., Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome. Biol.* 2014;15(12):550.
27. Pustovit O.B., Samoilova D.V., Abramochkin D.V., Filatova T.S., Kuzmin V.S. α 1-adrenergic receptors accompanied by GATA4 expression are related to proarrhythmic conduction and automaticity in rat interatrial septum. *J. Physiol. Biochem.* 2022;78(4):793–805.
28. Bioconductor [Электронный ресурс]. 2025. URL: <https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html> (дата обращения: 01.02.2025).
29. Bioconductor [Электронный ресурс]. 2025. URL: <https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/clusterProfiler.html> (дата обращения: 01.02.2025).
30. van Eif V.W.W., Devalla H.D., Boink G.J.J., Christoffels V.M. Transcriptional regulation of the cardiac conduction system. *Nat. Rev. Cardiol.* 2018;15(10):617–630.
31. DiFrancesco D. The role of the funny current in pacemaker activity. *Circ. Res.* 2010;106(3):434–446.
32. Lakatta E.G., Maltsev V.A., Vinogradova T.M. A coupled SYSTEM of intracellular Ca^{2+} clocks and surface membrane voltage clocks controls the timekeeping mechanism of the heart's pacemaker. *Circ. Res.* 2010;106(4):659–673.
33. Man J., Barnett P., Christoffels V.M. Structure and function of the Nppa-Nppb cluster locus during heart development and disease. *Cell. Mol. Life. Sci.* 2018;75(8):1435–1444.
34. Samad M., Malempati S., Restini C.B.A. Natriuretic peptides as biomarkers: Narrative review and considerations in cardiovascular and respiratory dysfunctions. *Yale. J. Biol. Med.* 2023;96(1):137–149.
35. Hotchkiss A., Feridooni T., Baguma-Nibasheka M., McNeil K., Chinni S., Pasumarthi K.B. Atrial natriuretic peptide inhibits cell cycle activity of embryonic cardiac progenitor cells via its NPRA receptor signaling axis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2015;308(7):C557–C569.
36. Eppenberger-Eberhardt M., Messerli M., Eppenberger H.M., Reinecke M. New occurrence of atrial natriuretic factor and storage in secretorily active granules in adult rat ventricular cardiomyocytes in long-term culture. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1993;25(7):753–757.
37. Gassanov N., Er F., Zagidullin N., Hoppe U.C. Endothelin induces differentiation of ANP-EGFP expressing embryonic stem cells towards a pacemaker phenotype. *FASEB J.* 2004;18(14):1710–1712.
38. Houweling A.C., van Borren M.M., Moorman A.F., Christoffels V.M. Expression and regulation of the atrial natriuretic factor encoding gene Nppa during development and disease. *Cardiovasc. Res.* 2005;67(4):583–593.

39. Fu S., Ping, P., Wang F., Luo L. Synthesis, secretion, function, metabolism and application of natriuretic peptides in heart failure. *J. Biol. Eng.* 2018;12(1):2.
40. Kanter H.L., Laing J.G., Beau S.L., Beyer E.C., Saffitz J.E. Distinct patterns of connexin expression in canine Purkinje fibers and ventricular muscle. *Circ. Res.* 1993;72(5):1124–1131.
41. Saffitz J.E., Schuessler R.B. Connexin-40, bundle-branch block, and propagation at the Purkinje-myocyte junction. *Circ. Res.* 2000;87(10):835–836.
42. Harris B.S., Spruill L., Edmonson A.M., Rackley M.S., Benson D.W., O'Brien T.X., Gourdie R.G. Differentiation of cardiac Purkinje fibers requires precise spatiotemporal regulation of Nkx2-5 expression. *Dev. Dyn.* 2006;235(1):38–49.
43. Govindapillai A., Hotchkiss A., Baguma-Nibasheka M., Rose R.A., Miquerol L., Smithies O., Maeda N., Pasumarthi K.B.S. Characterizing the role of atrial natriuretic peptide signaling in the development of embryonic ventricular conduction system. *Sci. Rep.* 2018;8(1):6939.
44. Snarr B.S., O'Neal J.L., Chintalapudi M.R., Wirrig E.E., Phelps A.L., Kubalak S.W., Wessels A. Isl1 expression at the venous pole identifies a novel role for the second heart field in cardiac development. *Circ. Res.* 2007;101(10):971–974.
45. Wiese C., Grieskamp T., Airik R., Mommersteeg M.T., Gardiwal A., de Gier-de Vries C., Schuster-Gossler K., Moorman A.F., Kispert A., Christoffels V.M. Formation of the sinus node head and differentiation of sinus node myocardium are independently regulated by Tbx18 and Tbx3. *Circ. Res.* 2009;104(3):388–397.
46. Stefanovic S., Christoffels V.M. GATA-dependent transcriptional and epigenetic control of cardiac lineage specification and differentiation. *Cell. Mol. Life Sci.* 2015;72(20):3871–3881.
47. Ma Q., Zhou B., Pu W.T. Reassessment of Isl1 and Nkx2-5 cardiac fate maps using a Gata4-based reporter of Cre activity. *Dev. Biol.* 2008;323(1):98–104.

Поступила в редакцию 23.04.2025

После доработки 18.10.2025

Принята в печать 21.11.2025

RESEARCH ARTICLE

Key transcriptomic characteristics of the native rat heart pacemaker, their changes during cultivation of neonatal cardiomyocytes and their use to assess pacemaker competence

O.B. Pustovit^{1,*} , A.M. Karhov^{1,2} , V.S. Kuzmin^{1,2} 

¹Department of Human and Animal Physiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²Institute of Experimental Cardiology, National Medical Research Centre of Cardiology, Academician Chazov str. 15a, Moscow, 121552, Russia

*e-mail: k_pustovit@mail.ru

An important task on the way to creating a competent cellular equivalent of a biological heart pacemaker for the treatment of cardiovascular diseases is to assess the ability of cultured cardiomyocytes in conglomerates, layers or pseudo-tissues to automatic, spontaneous activity. It is known that the electrophysiological and tissue properties of cultured cardiomyocyte structures differ significantly from native ones. In this work, based on a comparison of the transcription profile and an assessment of the expression level of key genes in the tissues of the sinoatrial node (SAN), atrium, neonatal cardiomyocytes and cultured cardiomyocyte conglomerates of rats, pacemaker competence indices (PCI) are proposed, characterizing the ability (competence) of cellular structures to function as a pacemaker. Based on the analysis of mRNA sequencing data, it was found that during neonatal cardiomyocytes cultivation, there is a significant change in the expression profile of functionally significant genes, which enhances the difference in the phenotype of emerging cardiomyocyte conglomerates from both the pacemaker of SAN and the contractile myocardium. It has been shown for the first time that satisfactory PCIs can be obtained based on an assessment of the transcript level of no more than four genes, including pairs of transcription factors (*Tbx3*, *Tbx18* and *Nkx2.5*, *Gata4*) or pairs of ion channels (*Hcn4*, *Kcnj2*) and gap junctions (*Gjc1*, *Gja1*) antagonistically expressed in the SAN and contractile myocardium. The PCI simplifies and accelerates the assessment of the functional properties of artificial spontaneously active cardiomyocyte cell structures.

Keywords: heart pacemaker, artificial biological pacemaker, transcription profile, cellular constructs, neonatal cardiomyocytes, primary cardiomyocyte culture

Funding: The research was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (project No. 24-75-00023). The equipment purchased by Lomonosov Moscow State University as part of the federal project “Development of Infrastructure for scientific research and Training” of the national project “Science and Universities” dated 12/29/2022 No. 15-pr/42 (Agreement No. 355 dated 03/15/2024) was used in the work.

Сведения об авторах

Пустовит Оксана Борисовна – канд. биол. наук., ст. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: k_pustovit@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5137-2187>

Кархов Андрей Михайлович – студент магистратуры кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: akarchoff@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0919-0712>

Кузьмин Владислав Стефанович – докт. биол. наук., проф. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: ku290381@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3075-4834>