

С.В. Малишева, Г.В. Будащ, Н.М. Білько, Ю. Хешлер

Диференціювання у кардіоміоцити окремих клонів індукованих плюрипотентних стовбурових клітин миші

Оцінювали ефективність диференціювання у кардіоміоцити окремих клонів індукованих плюрипотентних стовбурових клітин миші. Останні отримані у попередніх дослідженнях внаслідок репрограмування мишиних ембріональних фібробластів системою плазмід Sleeping beauty, заснованою на транспозонах. Диференціювання здійснювали у суспензійній культурі та при прикріпленні ембріюїдних тілець до культуральних планшет. Як індуктор використовували аскорбінову кислоту. Згідно з отриманими результатами, диференціювання при прикріпленні ембріюїдних тілець відбувається на порядок ефективніше. Аскорбінова кислота стимулює отримання кардіоміоцитів.

Ключові слова: індукованні плюрипотентні стовбурові клітини, ефективність диференціювання, кардіоміоцити.

ВСТУП

Серцево-судинні захворювання посідають провідне місце за смертністю серед населення [20]. Для їх корекції інтенсивно розробляються методи клітинної терапії [11]. Джерелом матеріалу для такої терапії можуть бути отримані із біопсії серця клітини. Однак доступ до такого клітинного матеріалу обмежений. Тому активно розвиваються альтернативні методи одержання кардіоміоцитів – від новонароджених близькоспоріднених видів тварин чи створення генетично-модифікованих клітин, що надекспресують бажані протеїни [16]. Усі ці методи мають недоліки та обмеження, що заключаються у фізіологічних відмінностях кардіоміоцитів людини, ресурсній затратності та етичних міркуваннях.

Потенційним джерелом отримання кардіоміоцитів можуть бути: фетальні кардіоміоцити, зрілі клітини-попередники, скелетні міобласти, стовбурові клітини кісткового мозку, жирової тканини, кордової крові та плюрипотентні стовбурові клітини (ПСК) [7].

Потенціал до диференціювання у кардіоміоцити мультипотентних фетальних і зрілих стовбурових клітин суттєво обмежується їх пластичністю [4, 18]. Єдиними клітинами дорослого організму, що мають потенціал до диференціювання у кардіоміоцити, є кардіоміоцитарні клітини-попередники [5], однак їх ресурс є вкрай обмеженим.

Нині показано, що лише ПСК можуть диференціюватися у клітини серця, що спонтанно скорочуються [10, 23]. ПСК мають практично необмежану здатність до самооновлення *in vitro* та потенціал для формування трьох зародкових шарів, утворюючи таким чином усі клітинні типи організму [3]. Показано, що нещодавно відкриті індуковані плюрипотентні стовбурові клітини (іПСК) можуть диференціюватись у кардіоміоцити [21], що не поступаються за ключовими характеристиками кардіоміоцитам, отриманим із ембріональних стовбурових клітин (ЕСК) [8, 25]. Розроблено різноманітні методики одержання кардіоміоцитів із плюрипотентних клітин [13]: спонтанне диференціювання ембріюїдних тілець (ЕТ) у суспензійній культурі

та при їх прикріпленні, кокультивування з ентодермальними клітинами миші (END-2 cells) чи через напрямлене диференціювання за допомогою визначених факторів як у суспензії, так і у моношарі [19]. Отримані *in vitro* диференційовані кардіоміоцити використовують для дослідження кардіогенезу, тестування терапевтичних засобів та у токсикологічних дослідженнях.

При диференціюванні плюрипотентних клітин у кардіоміоцити важливим аспектом є пошук хімічних сполук, що сприяють одержанню бажаного типу клітин та можуть бути застосовані для активації ендогенних кардіоспецифічних стовбурових клітин. Зокрема показано, що аскорбінова кислота сприяє диференціюванню ПСК у кардіоміоцити [6], активно розробляються протоколи із залученням регуляторів таких ключових сигнальних шляхів, як Wnt-шлях [24].

Перші іПСК репрограмовано за допомогою вірусних векторів, проте їх клінічне застосування пов'язане з певним ризиком. Серед існуючих альтернативних способів отримання іПСК [17] найбільш перспективними є репрограмуючі системи на основі транспозонів, зокрема *Sleeping beauty* [15]. Оскільки генеровані із використанням різних векторів лінії іПСК можуть відрізнятися за спектром експресії генів, диференційним потенціалом тощо [14], дослідження функціональних характеристик перспективних для клінічного застосування ПСК та їх похідних надзвичайно актуальні.

У попередній роботі ми отримали при репрограмуванні ембріональних фібробластів миші за допомогою системи плазмід *Sleeping beauty* різні клони потенційної лінії іПСК. При спонтанному диференціюванні виявлено гетерогенність серед клонів за експресією кардіоспецифічного гена α МНС [1]. Тому метою цієї роботи було дослідити потенціал до направленого диференціювання у кардіоміоцити різних клонів потенційної лінії іПСК при індукції аскорбіновою кислотою.

МЕТОДИКА

Використані клітинні лінії та клони. α PIG44 – генетично модифікована лінія ЕСК миші, що експресує пуроміцин-N-ацетил-трансферазу та зелений флуоресцентний протеїн (GFP) під кардіоспецифічним α -МНС промотором, створена Е. Kolosov (Інститут Нейрофізіології, Кельнський університет, Німеччина) для вивчення диференціювання у кардіоміоцити ПСК миші.

Окремі клони потенційних іПСК миші одержано внаслідок індивідуального відбору активно проліферуючих ЕСК-подібних колоній. іПСК отримували репрограмуванням мишиних ембріональних фібробластів (МЕФ) системою плазмід *Sleeping beauty*, люб'язну надано її розробниками – Zoltan Ivics та Szusanna Izsvac (Макс-Дельбрук центр молекулярної медицини, Берлін, Німеччина). Вона складається із пари плазмід: на першій закодовано транспозазу SB100x, що забезпечує стабільну інтеграцію репрограмуючих генів у геном; друга містить репрограмуючу касету із генами Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc або Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc та Lin28. Для репрограмування використовували МЕФ тварин лінії c57Bl6N 13,5-ї доби гестації. Трансфекцію здійснювали за допомогою системи для трансфекції «Neon» («Invitrogen», США). На 2-гу добу після трансфекції клітини поміщали в умови культивування ПСК. Досліджували ефективність диференціювання отриманих нами клонів 6, 7 та 9 [1], лінія α PIG44 була контролем.

ПСК миші культивували у середовищі DMEM із додаваннями 20%-ї фетальної телячої сироватки, 0,1 ммоль/л NEAA, 50 мкмоль/л β -меркаптоетанолу («Invitrogen», США), LIF 1000 од/мл на фідерному шарі мітотично інактивованих МЕФ. Перед диференціюванням іПСК дисоціювали за допомогою 0,05%-го трипсину та поміщали у середовище IMDM із 20%-ю фетальною телячою сироваткою 0,1 ммоль/л NEAA по $1 \cdot 10^6$ клітин у суспензійну культуру на орбітальний шейкер. На 2-гу добу культивування підраховували кількість утворених ЕТ та розсаджували

їх по 2000 од. у 100 мм неадгезивні чашки Петрі для подальшого культивування (середовище IMDM із 20%-ю фетальною телячою сироваткою, 0,1 ммоль/л NEAA, 50 мкмоль/л β -меркаптоетанолу («Invitrogen», США). Для диференціювання у адгезивній культурі ЕТ розсаджували на 6-лункові культуральні планшети по 60 од. Склад культурального середовища однаковий для суспензійної та адгезивної культури. Для покращення диференціювання у кардіоміоцити досліджено різні варіанти: 1) аскорбінова кислота, 100 мкмоль/л («Waco», Німеччина); 2) контрольний варіант – без додавання жодних малих молекул. Аскорбінову кислоту застосовували від початку до 9-ї доби диференціювання.

Починаючи з 8-ї доби культивування,

досліджували інтактні та прикріплені ЕТ на наявність скорочень. Ефективність диференціювання визначали за співвідношенням кількості структур, що спонтанно скорочувались, до загальної кількості ЕТ.

Результати обробляли загальноприйнятими статистичними методами за допомогою пакетів стандартних прикладних програм Microsoft Office Excel для персонального комп'ютера.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Окремі клони репрограмованих за допомогою системи Sleeping beauty МЕФ та контрольна лінія ЕСК миші α PIG44 у недиференційованому стані мали однакову типову морфологію ПСК (рис. 1).

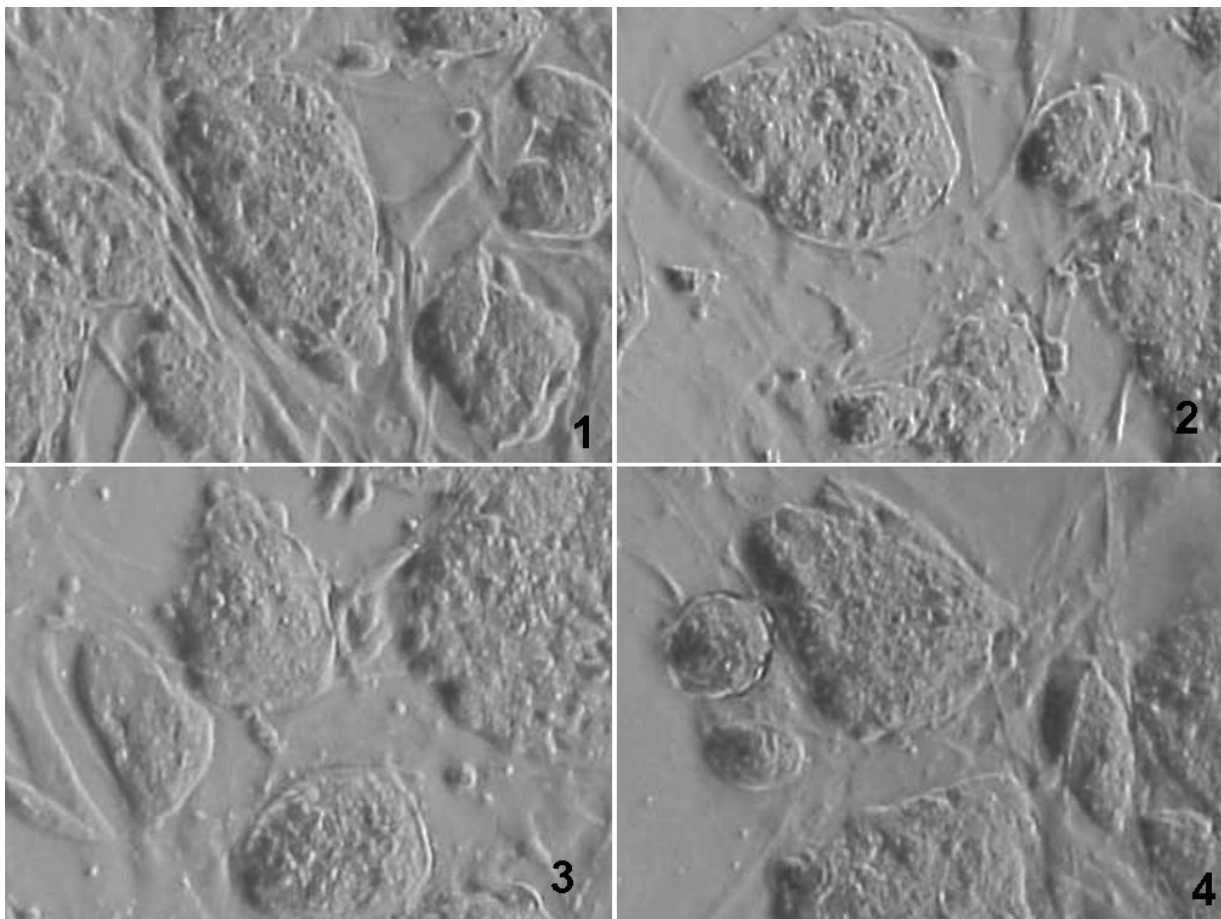


Рис. 1. Морфологія досліджуваних плюрипотентних стовбурових клітин перед початком диференціювання: 1 – клон 6, 2 – клон 7, 3 – клон 9, 4 – α PIG44 (x 10)

Дисоційовані за допомогою трипсину клітини досліджуваних клонів і клітинної лінії α PIG44 без фактора, що підтримує їх у недиференційованому стані (LIF) у суспензійній культурі при постійному перемішуванні на орбітальному шейкері формували ЕТ правильної сферичної форми. Отримані за допомогою системи Sleeping beauty репрограмовані клони МЕФ формували ЕТ, такі самі за розміром і кількістю, як ЕТ, що сформовані контрольною клітинною лінією (рис. 2).

Таким чином, за морфологічними показниками досліджувані клони не відрізнялися від контрольної клітинної лінії ЕСК як у недиференційованому стані, так і при диференціюванні.

Оскільки при спонтанному диференціюванні отриманих клонів у попередніх працях

[1] спостерігали гетерогенність в експресії кардіоспецифічного маркера α МНС, ми вирішили окремо дослідити потенціал до направленого диференціювання у кардіоміоцити клонів репрограмованих ембріональних фібробластів. Для стимулювання диференціювання використовували аскорбінову кислоту [22]. Ефективність диференціювання у кардіоміоцити оцінювали за відношенням кількості ЕТ, що скорочуються, до загальної кількості ЕТ [2]. Результати дослідження ефективності диференціювання ПСК миші у суспензійній культурі зображено на рис. 3.

При диференціюванні у суспензійній культурі в усіх досліджуваних клонах і контрольній клітинній лінії ЕСК α PIG44 спонтанне скорочення ЕТ виявляли, починаючи з 9-ї доби.

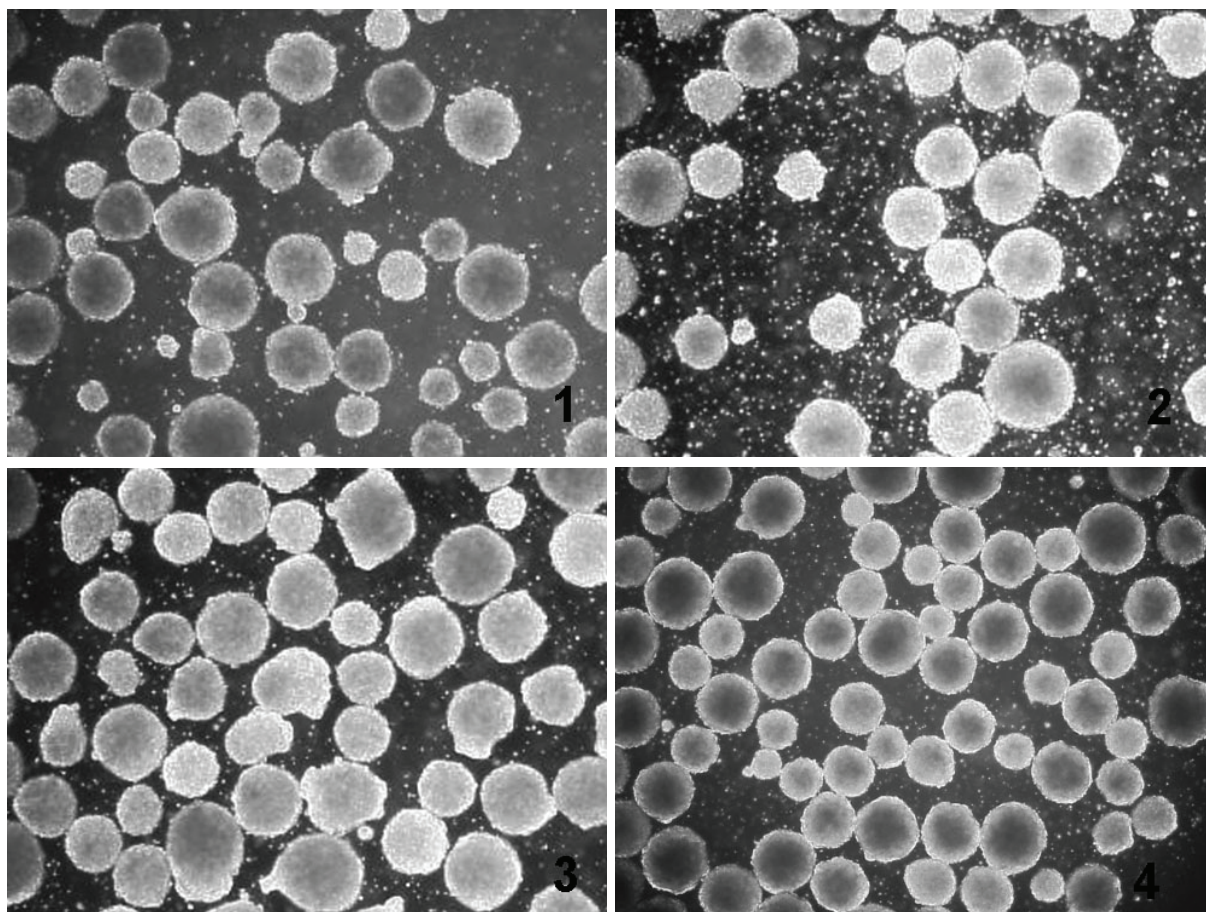


Рис. 2. Ембріодні тільця, що утворилися внаслідок диференціювання у суспензійній культурі різними клонами та клітинною лінією: 1 – клон 9; 2 – клон 7; 3 – клон 6; 4 – α PIG44 (x 2,5)

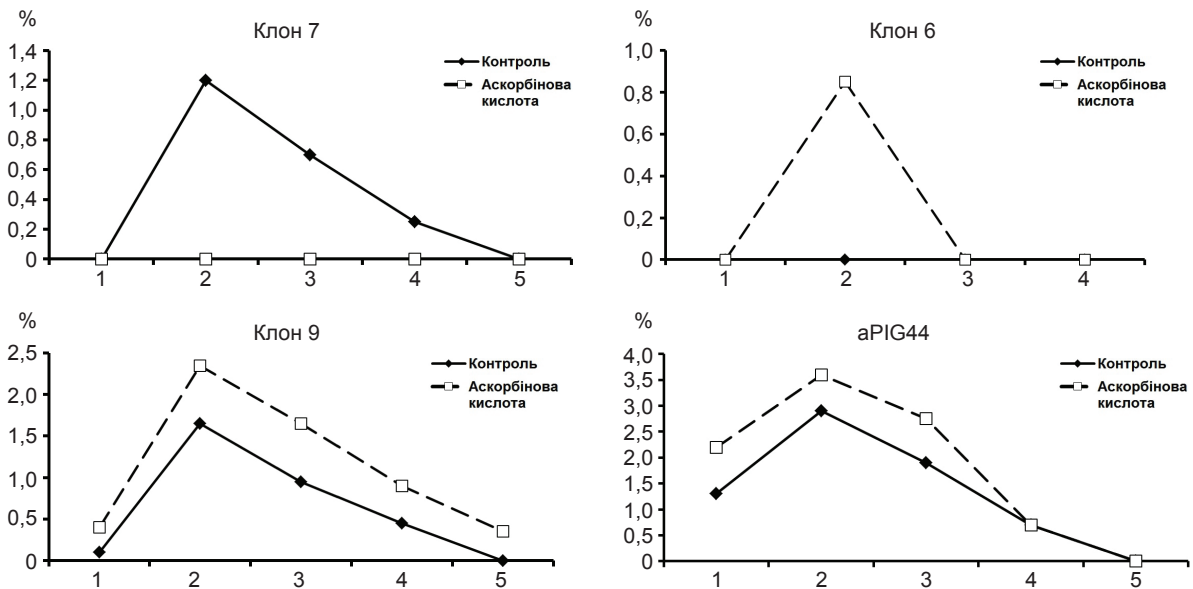


Рис. 3. Ефективність диференціювання плюрипотентних стовбурових клітин миші у кардіоміоцити в суспензійній культурі: 1 – 9-та доба; 2 – 11-та доба; 3 – 13-та доба; 4 – 15-та доба; 5 – 17-та доба диференціювання

ЕТ, що скорочуються, спостерігали ще понад тиждень, до 17-ї доби диференціювання у клоні 7, 9 та лінії α PIG44. Найбільша кількість ЕТ, що скорочуються, була на 11-ту добу. Максимальну ефективність диференціювання в суспензійній культурі спостерігали у лінії α PIG44 при стимуляції аскорбіновою кислотою – близько 3,5 %. Серед досліджуваних клонів найвищий потенціал до диференціювання у кардіоміоцити спостерігали у клона 9 також із застосуванням аскорбінової кислоти, однак цей показник становив лише 2,5 % і був на 1 % нижчий у порівнянні із контрольною клітинною лінією. Найслабша здатність до диференціювання була у клона 6: не виявлено жодного ЕТ, що скорочується у контрольному варіанті, а при стимулюванні за допомогою аскорбінової кислоти ефективність диференціювання не сягала навіть 1 %.

Згідно з отриманими результатами, загальна ефективність диференціювання є достатньо низькою, що збігається з даними літератури [9]. Краще воно відбувається при застосуванні аскорбінової кислоти. Однак відповідь на стимулятор цього процесу та його результативність є неоднорідною в окремих досліджуваних клонах.

Часто при виборі методу отримання кардіоміоцитів виходять із особливостей вихідних клітинних ліній, що визначають ефективність диференціювання [12]. З огляду на отримані низькі значення показників у суспензійній культурі, досліджено здатність до диференціювання отриманих клонів при прикріпленні ЕТ (рис. 4).

За цим протоколом скорочення ЕТ помічали починаючи із 11-ї доби культивування, що на 3 доби пізніше, ніж у суспензійній культурі. Найбільшу кількість ЕТ, що скорочувалися, виявлено на 13-ту добу у контрольній клітинній лінії та на 15-ту добу в отриманих клонах. Максимальна ефективність диференціювання становила 12, 18, 25 та 30 % для клонів 6, 7, 9 та контрольної клітинної лінії відповідно. Спонтанне скорочення ЕТ спостерігали протягом 11 діб від початку його реєстрації. Аскорбінова кислота є індуктором диференціювання досліджуваних клонів при прикріпленні ЕТ, підвищує частоту спонтанних скорочень і пролонгує її.

Загалом, ефективність диференціювання у кардіоміоцити окремих клонів досліджуваних нами ПСК миші та контрольної клітинної

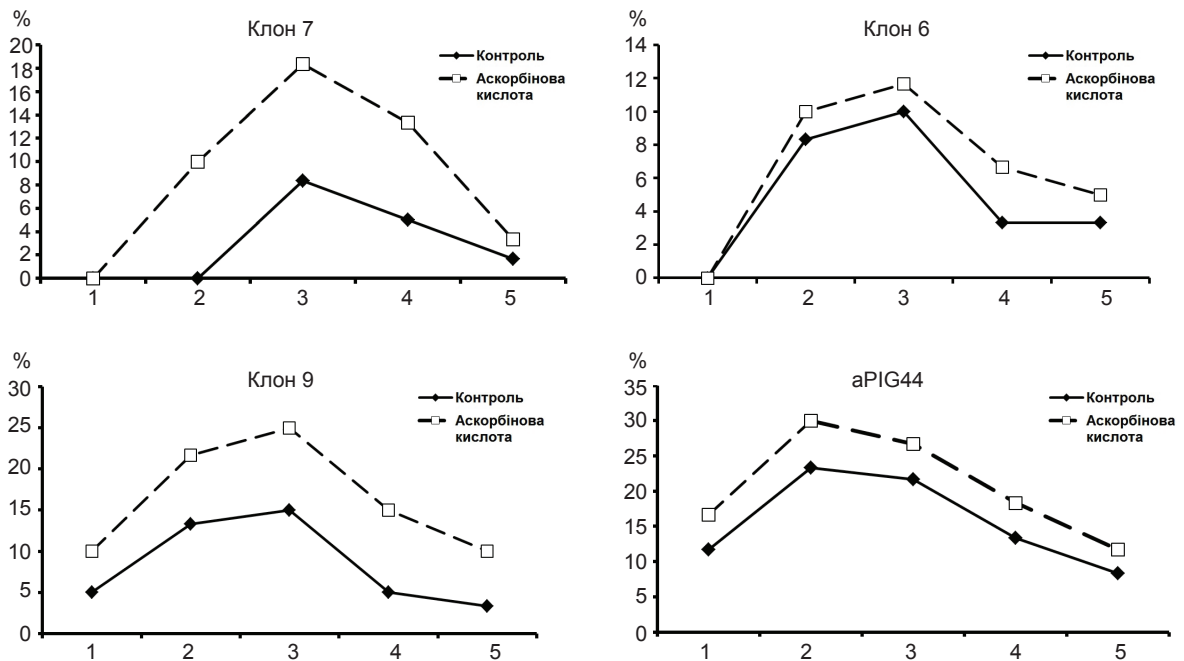


Рис. 4. Ефективність диференціювання плюрипотентних стовбурових клітин миші у кардіоміоцити при прикріпленні ембріодних тілець: 1 – 11-та; 2 – 13-та; 3 – 15-та; 4 – 17-та; 5 – 22-га доба

лінії на порядок вища при прикріпленні ЕТ, ніж у суспензійній культурі. Це може бути пов'язане із цілісністю ЕТ, що не пошкоджуються на орбітальному шейкері, більш природними умовами формування кардіоміоцитів, а також лінієспецифічними особливостями отриманих клонів. Також підрахунок ЕТ і частоти їх скорочень у статичній культурі є більш точним і відтворювальним.

Таким чином, отримані внаслідок репрограмування ембріональних фібробластів за допомогою системи *Sleeping beauty* транспозоніндуковані ПСК миші здатні до диференціювання у кардіоміоцити в культурі *in vitro*. При прикріпленні ембріодних тілець ефективність диференціювання на порядок вища, ніж у суспензійній культурі. Однак пік спонтанного скорочення у суспензійній культурі спостерігали на 2 доби раніше. Також виявлено гетерогенність в ефективності диференціювання та відповіді на стимулятор серед окремих клонів ПСК миші, однак це явище потребує подальшого дослідження.

Автори статті висловлюють особливу подяку доктору Томо Сарічу за наукове керівництво у виконанні експериментальної роботи в Інституті Нейрофізіології Кельнського університету (Німеччина).

С.В. Малишева, Г.В. Будащ, Н.М. Білько, Ю. Хешлер

ДИФФЕРЕНЦИРОВАНИЕ В КАРДИОМИОЦИТЫ ОТДЕЛЬНЫХ КЛОНОВ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ

Оценивали эффективность дифференцирования в кардиомиоциты отдельных клонов индуцированных плюрипотентных стволовых клеток мыши. Последние получены в предыдущей работе вследствие репрограммирования эмбриональных фибробластов мыши с помощью системы плазмид *Sleeping beauty*, основанной на транспозонах. Дифференцирование осуществляли в суспензионной культуре и при прикреплении эмбриодных телец к культуральным планшетам. В качестве индуктора использовали аскорбиновую кислоту. Согласно полученным данным, дифференцирование при прикреплении эмбриодных телец на порядок эффективнее. Аскорбиновая кислота осуществляют стимулирующее действие на получение кардиомиоцитов. Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, эффективность дифференцирования, кардиомиоциты.

S.V. Malysheva, G.V. Budash, N.M. Bilko, J. Hescheller

CARDIOMYOCYTE DIFFERENTIATION OF INDIVIDUAL CLONES MURINE INDUCTD PLURIPOTENT STEM CELLS

Cardiomyocyte differentiation of certain clones of murine induced pluripotent stem cells (iPS) was estimated. iPS were obtained due to reprogramming of murine embryonic fibroblasts with transposon-based *Sleeping beauty* plasmids as gene delivery systems. Differentiation was performed in suspension culture and in attached to tissue-culture plates embryoid bodies (EBs). Ascorbic acid was applied as inductor. According to the obtained results, the differentiation was ten-fold more effective in attached EBs. Ascorbic acid stimulated the generation of cardiomyocytes.

Key words: induced pluripotent stem cells, efficiency of differentiation, cardiomyocytes.

Institute of Neurophysiology, University of Cologne (Germany);

National University of Kyiv-Mohyla academy (Ukraine)

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Малишева С.В., Білько Н.М., Білько Д.І., Сарич Т. Диференційний потенціал отриманих за допомогою системи транспозонів індукованих плюрипотентних стовбурових клітин миші // Пробл. екол. та мед. генетики і клін. імунології. – 2012. – 4, № 112. – С. 37–46.
2. Ada A., Williams C.H., Hao J., Hong C.C. Modified mouse embryonic stem cell based assay for quantifying cardiogenic induction efficiency // J. Vis. Exp. – 2011. – 50. – e2656.
3. Ameen C., R. Strehl, Bjorquist P., Lindahl A., Hyllner J., Sartipy P. Human embryonic stem cells: current technologies and emerging industrial applications // Crit. Rev. Oncol. Hematol. – 2008. – 65, № 1. – P. 54–80.
4. Anversa P., Leri A., Rota M., Hosoda T., Bearzi C., Urbanek K., Kajstura J., Bolli R. Concise review: stem cells, myocardial regeneration, and methodological artifacts // Stem Cells. – 2007. – 25, № 3. – P. 589–601.
5. Blin G., Nury D., Stefanovic S., Neri T., Guillevic O., Brinon B., Bellamy V., Rücker-Martin C., Barbry P., Bel A., Bruneval P., Cowan C., Pouly J., Mitalipov S., Gouadon E., Binder P., Hagège A., Desnos M., Renaud J.F., Menasché P., Pucéat M. A purified population of multipotent cardiovascular progenitors derived from primate pluripotent stem cells engrafts in postmyocardial infarcted nonhuman primates // J. Clin. Invest. – 2010. – 120, № 4. – P. 1125–1139.
6. Cao N., Liu Z., Chen Z., Wang J., Chen T., Zhao X., Ma Y., Qin L., Kang J., Wei B., Wang L., Jin Y., Yang H.T. Ascorbic acid enhances the cardiac differentiation of induced pluripotent stem cells through promoting the proliferation of cardiac progenitor cells // Cell Res. – 2012. – 22, № 1. – P. 219–236.
7. Dimmeler S., Burchfield J., Zeiher A.M. Cell-based therapy of myocardial infarction // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2008. – 28, № 2. – P. 208–216.
8. Fuegmann C.J., Samraj A.K., Walsh S., Fleischmann B.K., Jovine S., Breitbach M. Differentiation of mouse embryonic stem cells into cardiomyocytes via the hanging-drop and mass culture methods // Curr. Protoc. Stem. Cell. Biol. – 2010. – 1, № 1F.11.
9. Hao J., Sawyer D.B., Hatzopoulos A.K., Hong C.C. Recent progress on chemical biology of pluripotent stem cell self-renewal, reprogramming and cardiomyogenesis // Rec. Pat. Regen. Med. – 2011. – 1, № 3. – P. 263–274.
10. He J. Q., Ma Y., Lee Y., Thomson J. A., Kamp T. J. Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization // Circ. Res. – 2003. – 93, № 1. – P. 32–39.
11. Huu A.L., Prakash S., Shum-Tim D. Cellular cardiomyoplasty: current state of the field // Regen. Med. – 2012. – 7, № 4. – P. 571–582.
12. Kaichi S., Hasegawa K., Takaya T., Yokoo N., Mima T., Kawamura T., Morimoto T., Ono K., Baba S., Doi H., Yamanaka S., Nakahata T., Heike T. Cell line-dependent differentiation of induced pluripotent stem cells into cardiomyocytes in mice // Cardiovasc. Res. – 2010. – 88, № 2. – P. 314–323.
13. Keller G. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine // Genes Dev. – 2005. – 19, № 10. – P. 1129–1155.
14. Kuijk E.W., Chuva de Sousa Lopes S.M., Geijsen N., Macklon N., Roelen B.A. The different shades of mammalian pluripotent stem cells // Hum. Reprod. Update. – 2011. – 17, № 2. – P. 254–271.
15. Malysheva S., Saric T., Hescheler J., Budash G., Bilko D., Bilko N. Expression of SSEA-1 in different clones of reprogrammed murine embryonic fibroblasts // Hayk. zapiski NaUKMA: Biologiya ta ekologiya. – 2011. – № 119. – С. 21–25.
16. Meyer T., Sartipy P., F. Blind, Leisgen C., Guenther E. New cell models and assays in cardiac safety profiling // Expert Opin. Drug. Metab. Toxicol. – 2007. – 3, № 4. – P. 507–517.
17. Mochiduki Y., Okita K. Methods for iPS cell generation for basic research and clinical applications // Biotechnol. J. – 2012. – 7, № 6. – P. 789–797.
18. Murry C.E., Field L.J., Menasch P. Cell-based cardiac repair reflections at the 10-year point // Circulation. – 2005. – 112, № 20. – P. 3174–3183.
19. Ni T.T., Rellinger E.J., Mukherjee A., Xie S., Stephens L., Thorne C.A., Kim K., Hu J., Lee E., Marnett L., Hatzopoulos A.K., Zhong T.P. Discovering small molecules that promote cardiomyocyte generation by modulating Wnt signaling // Chem. Biol. – 2011. – 18, № 12. – P. 1658–1668.
20. Schwappach D.L.B., Boluarte T.A., Suhcke M. The economics of primary prevention of cardiovascular diseases – a systematic review of economic evaluations // Cost. Eff. Resour. Alloc. – 2007. – 5. – P. 1–12.

21. So K.H., Han Y.J., Park H.Y., Kim J.G., Sung D.J., Bae Y.M., Yang B.C., Park S.B., Chang S.K., Kim E.Y., Park S.P. Generation of functional cardiomyocytes from mouse induced pluripotent stem cells // Int. J. Cardiol. – 2011. – **153**, № 3. – P. 277–285.
22. Takahashi T., Lord B., Schulze P.C., Fryer R.M., Sarang S.S., Gullans S.R., Lee R.T. Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes // Circulation. – 2003. – **107**, № 14. – P. 1912–1916.
23. Xu C., Police S., Rao N., Carpenter M. K. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells // Circ. Res. – 2002. – **91**, № 6. – P. 501–508.
24. Zhang Q., Major M.B., Takanashi S., Camp N.D., Nishiya N., Peters E.C., Ginsberg M.H., Jian X., Randazzo P.A., Schultz P.G., Moon R.T., Ding S. Small-molecule synergist of the Wnt/beta-catenin signaling pathway // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2007. – **104**, № 18. – P. 7444–7448.
25. Zwi-Dantsis L., Gepstein L. Induced pluripotent stem cells for cardiac repair // Cell Mol. Life Sci. – 2012. – **69**, № 19. – P. 3285–3299.

*Ин-т Нейрофізіології Кельн. ун-ту (Німеччина);
Нац. ун-т «Києво-Могилянська академія» (Україна)
E-mail: smalysheva@gmail.com*

*Матеріал надійшов до
редакції 17.12.2012*