

## ЗАСТОСУВАННЯ ЦИКЛОСПОРИНУ ДЛЯ ПІДВИЩЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ ПЛЮРИПОТЕНТНИХ КЛІТИН В КАРДІОМІОЦИТИ

Г.В.Будаш, Д.І.Білько, Т.Саріч, Н.М.Білько

*Центр молекулярних і клітинних досліджень Національного університету "Киево-Могилянська академія" (Київ)  
Інститут Нейрофізіологій Кельнського університету  
(Кельн, Німеччина)*

### Вступ

Людство пов'язує з клітинними технологіями вирішення проблеми лікування захворювань органів та систем організму. Серед них серцево-судинні захворювання знаходяться на першому місці. На сьогодні причиною смертності 6 з 10 мешканців України є саме серцево-судинні захворювання. Клітинна біотехнологія пропонує замінити втрачені клітини серця новими кардіоміоцитами отриманими *in vitro* поза межами організму. Не зважаючи на те, що було доведено можливість отримати кардіоміоцити з різних джерел (наприклад, кістковий мозок, біопсія серця, жирова тканина, пуповинна кров, мезенхімальні стовбурові клітини), однак ефективність отримання функціональних клітин серця і досі залишається дуже невисокою і варіабельною [1].

Стрімкий розвиток технологій застосування індукованих плюрипотентних стовбурових клітин (іПСК), які так само як і ембріональні стовбурові клітини (ЕСК) можуть бути диференційовані в кардіоміоцити, дав надію отримати в майбутньому пацієнтспецифічні клітини, використання яких не викликає етичних суперечок та не провокує імунну відповідь організму під час їх трансплантацій. Індуковані плюрипотентні клітини вперше були отримані Шинья Яманака у 2006 році за допомогою вірусної трансдукції коктейлем з чотирьох транскрипційних факторів (Oct4, Sox2, Klf4, c-myc) дорослих клітин організму [2, 3]. Однак перш ніж застосовувати іПСК в медичній практиці необхід-

но їх детально дослідити та розробити ефективний протокол їх диференціювання в напрямку клітин серця, який дасть змогу отримати велику кількість новоутворених клітин. На сьогодні основними підходами до диференціювання в кардіоміоцити є утворення ембріодних тілець, ко-культивування з клітинами строми та диференціювання в моношаровій культурі [4-8].

В попередніх дослідах найбільш придатним для розробки ефективного протоколу диференціювання нами було визначено метод утворення ембріодних тілець клітинний в суспензії, який дає можливість не лише отримати велику кількість кардіоміоцитів, а й паралельно перевірити та порівняти кілька хімічних сполук, здатних до індукції диференціювання, що є ще одним піл ходом до оптимізації процесу диференціювання плюрипотентних клітин в кардіоміоцити.

### Матеріали і методи дослідження

**Умови культивування ЕСК та іПСК.** Дослідження проводили на генетично модифікованих лініях ЕСК та іПСК, які під контролем кардіоспецифічного  $\alpha$ -МНС промотора експресували зелений флюорисцентний протеїн (GFP). Обидві лінії: лінія ЕСК  $\alpha$ -PIG44 та лінія іПСК AT25 були отримані та модифіковані в інституті Нейрофізіології м. Кьольн. Для підтримання недиференційованого стану ЕСК та іПСК клітинні лінії культивували на фідерному шарі виготовленому з ембріональних мишиних фібробластів. До складу середовища культивування входили: середовище DMEM з додавання 15% фетальної бичачої сироватки, 1% незамінних аміно кислот, 0,1 мМ  $\beta$ -меркаптоетанол (всі реактиви виробництва Invitrogen, Німеччина), та 1000 Од/мл ЛІФ (виробництва Esrgo, Millipore, США). Фідерні клітини готували з ембріонів отриманих на 14 день запліднення з мишиної лінії Him:OF1, отримані клітини інактивували мітоміцином С (10 мг/мл виробництва SERVA Electrophoresis, Німеччина). Псажування ЕСК та іПСК проводили кожного 2 дня. Для цього клітини трипсинізували протягом 5 хвилин під дією 0,05% трипсина, відмивали та рахували в Гемоцитометрі. Одноклітинну суспензію з розрахунку  $5 \times 10^5$  клітин додавали на кожен 6 см чашку Петрі, попередньо вкриту шаром фідерних клітин (з розрахунку  $0,8 \times 10^5$  фідерних клітин на кожен 6 см чашку Петрі).

*Диференціювання в кардіоміоцити.* Диференціювання в кардіоміоцити проводили методом культивування іПСК та ЕСК в суспензійній культурі на шейкері. Для того щоб ініціювати процес диференціювання з середовища культивування вилучали ЛІФ та змінювали середовище культивування на диференційне середовище. До складу якого входили: середовище IMDM, 20% ембріональна бичача сироватка, 1% незамінних аміно кислот, 0,1 мМ  $\beta$ -меркаптоетанол (всі реактиви виробництва Invitrogen, Німеччина). Недиференційовані ЕСК та іПСК трипсинізували в одноклітинну культуру.  $1 \times 10^6$  клітин преносили в 10 см чашки Петрі і додавали диференційне середовище. До складу диференційного середовища також додавали такі індуктори диференціювання в кардіоміоцитарному напрямку як: аскорбінову кислоту, циклоспорін та кардіженол за відповідними схемами. Суспензійну культуру клітин залишали на шейкері в  $\text{CO}_2$  інкубаторі протягом 2 днів для формування ембріодних тілець. На другий день культивування ембріодні тільца рахували і додавали 2000 тілець на кожну 10 см неадгезивну чашку Петрі. Подальше культивування проводили на орбітальному шейкері в  $\text{CO}_2$  інкубаторі. Середовище культивування замінювали на 9 день культивування. Після заміни середовища жодних додаткових факторів не додавали.

Аскорбінову кислоту додавали в середовище культивування починаючи з першого дня культивування. На другий день культивування після підрахунку та розподілу ембріодних тілець вміст аскорбінової кислоти поновлювали. Використовували 100 мМ аскорбінову кислоту (виробництво WAKO).

Кардіженол (25  $\mu\text{M}$ ) додавали за такою ж схемою як і аскорбінову кислоту: з першого до 9 дня культивування.

Циклоспорин (10 мМ) додавали за трьома схемами. Перша - починали додавати в середовище культивування за три дні до початку формування ембріодних тілець і до третього дня культивування ембріодних тілець, друга схема - з першого до 3 дня культивування ембріодних тілець, і третя схема - з 4 до 9 дня культивування ембріодних тілець.

Культивування ембріодних тілець проводили протягом 15 днів. Весь час культура перебувала в неперервному русі на орбітальному шейкері.

*Мікроскопія та флуорисцентна мікроскопія.* Оскільки експресія GFP корелює з появою кардіоспецифічних маркерів, то даний параметр може бути використаний для кількісного визначення утворених клітин серця методами проточної цитофлуориметрії та флуорисцентної мікроскопії. З метою моніторингу процесу диференціювання плюрипотентних клітин в кардіоміоцити використовували флуорисцентний мікроскоп Arotome Axiovert Zies, з набором фільтрів FITC (AF Analysentechnik, Німеччина) та камерою Canon EOS 300D.

*Проточна цитофлуориметрія.* Експресію GFP+ використовували для кількісного визначення отриманих клітин серця. Для цього готували одноклітинну суспензію, яку пропускали через клітинний фільтр з метою позбавитись від клітинних агрегатів. Пропідій йодиди (Sigma) використовували для визначення кількості мертвих клітин в популяції з 10000 клітин. Дослідження проводили на FACS SCAN (BD Biosciences), аналізували результати за допомогою програми FSC Express 4 Flow Edition (De Novo).

Всі експерименти проводили в трьох повторностях мінімум тричі.

#### **Отримані результати та їх обговорення**

Для того щоб довести що методи диференціювання розроблені для ЕСК можуть бути застосовані для диференціювання іПСК нами було отримано криві диференціації двох типів клітин - ЕСК та іПСК методом культивування клітин на шейкері. Максимальну кількість диференційованих кардіоміоцитів фіксували вимірюючи кількість GFP+ клітин, яка корелює з кількістю диференційованих кардіоміоцитів, на проточному цитофлуориметрі. Для обох типів клітин спостерігалась однакова крива диференціювання. Перші флуорисцентні клітини можна було помітити під флуорисцентним мікроскопом на 8 день диференціювання, в поодиноких випадках скоротливі ділянки ембріодних тілець з'являлись на 6 день культивування. Максимальну кількість клітин серця фіксували на 11 день культивування, а починаючи з 13 дня культивування кількість клітин серця поступово скорочувалась.

Як було зазначено раніше циклоспорин додавали за трьома схемами - за три дні до початку диференціювання, з нульового дня до третього дня диференціювання, і з четвертого до дев'я-

того дня. Ефективним виявилось застосування лише третьої схеми додавання циклоспорину.

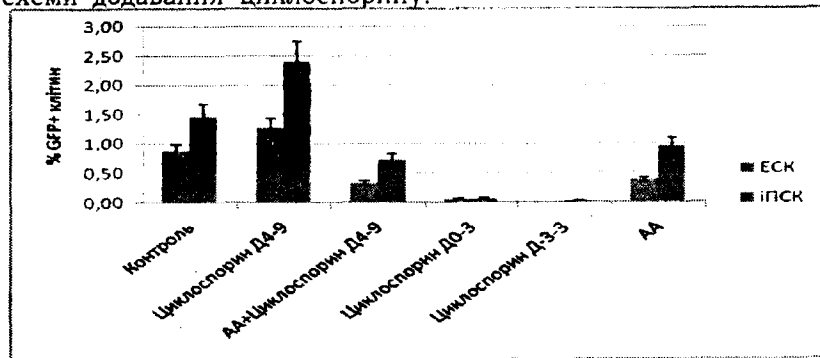


Рис.1. Вплив циклоспорину на диференціацію ЕСК та іПСК в кардіоміоцити на 11 день диференціювання.

Загалом під час додавання циклоспорину до ЕСК утворювалось майже вдвічі більше кардіоміоцитів ніж під час культивування без додавання індукторів диференціювання. На дев'ятий день диференціювання утворювалось в 1,74 рази більше кардіоміоцитів в порівнянні з контролем, на 11 день диференціювання отримали в 1,5 рази більше кардіоміоцитів, а на 13 день різниця становила в 1,9 раз більше ніж за відсутності індукуючого фактора.

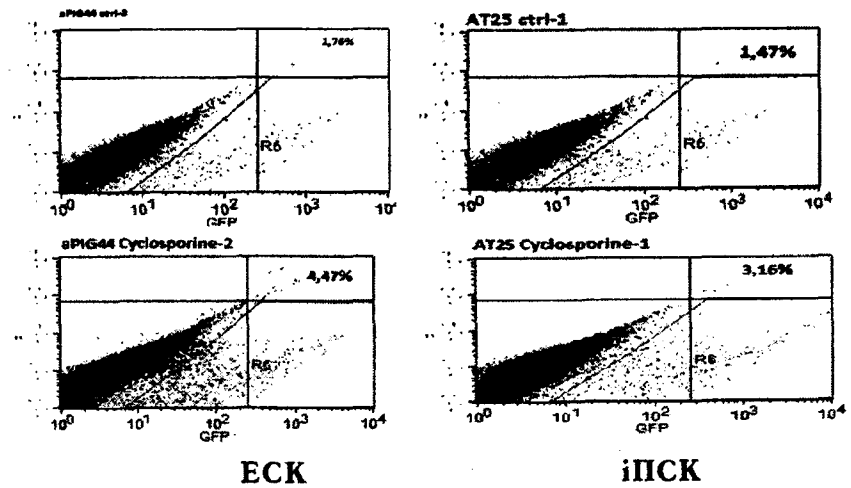


Рис.2. Різниця виходу кардіоміоцитів при додаванні та за відсутності циклоспорину в ЕСК та іПСК

Додавання циклоспорину до іПСК також стимулювало утворення кардіоміоцитів, однак різниця в середньому була більшою лише в півтора рази. Так на 9 день диференціювання вона становила 1,5 раз, на 11 день - 1,64, а на 13 день - 1,54. Максимальний рівень отриманих GFP+ клітин спостерігали на одинадцятий день і він становив 2,4 % в порівнянні з контрольним рівнем який становив 1,46%.

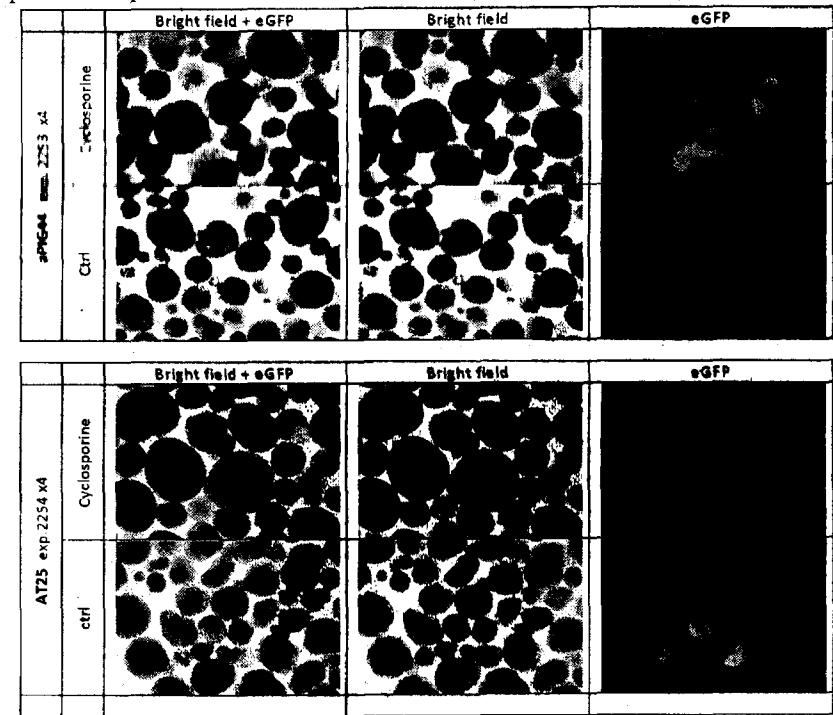


Рис.3. Застосування циклоспорину покращує вихід кардіоміоцитів як в ЕСК так і в іПСК (11 день диференціювання).

Також були проведені експерименти в яких поєднували застосування циклоспорину та відомого індуктора диференціювання кардіоміоцитарному напрямку - аскорбінової кислоти. Однак в наших досліджах виявилось, що аскорбінова кислота, навпаки, пригнічувала процес диференціювання, що можна пояснити лінієспецифічною дією аскорбінової кислоти. Так

кількість отриманих клітин серця за умов додавання аскорбінової кислоти в середньому була майже вдвічі меншою ніж в контрольних умовах і становила на 9 день диференціювання в контрольних умовах - 0,47% в контрольних дослідах та 0,17% GFP+ клітин - в умовах додавання аскорбінової кислоти, на 11 день диференціювання - 0,88% та 0,57% кардіоміоцитів відповідно, а на 13 день диференціювання становила 0,84% та 0,54% GFP+ клітин. Додавання циклоспорину разом з аскорбіновою кислотою спочатку стимулювало утворення кардіоміоцитів в такій же кількості як в контролі, та згодом зменшувалось.

Застосування циклоспорину за іншими двома схемами (починаючи за 3 дні до формування ембріодних тілець і до третього дня диференціювання, з першого до третього дня диференціювання) не мало позитивного ефекту на процес диференціації. Якщо додавання циклоспорину з першого по третій день диференціювання пригнічувало розвиток клітин серця, то додавання циклоспорину до початку формування ембріодних тілець повністю гальмувало диференціювання.

Також було перевірено дію кардіодженолу на процес формування кардіоміоцитів, однак він пригнічував утворення клітин серця як в ЕСК так і в іПСК.

Отже придатним для розробки ефективного протоколу диференціювання було визначено метод культивування клітин в суспензії, який дає можливість паралельно перевірити та порівняти кілька сполук одночасно. Саме він може стати основою для розробки пацієнтспецифічної терапії серцево-судинних захворювань іПС клітинами в майбутньому із застосуванням циклоспорину.

Серед перевірених індукторів найбільш ефективним як під час диференціації ЕСК та іПСК, був циклоспорин. Додавання цієї речовини з 4-го по 9-ий день формування ЕТ сприяло стабільному диференціюванню стовбурових клітин у клітини серця. Дія циклоспорину збільшувала кількість GFP+ клітин та площу скоротливих кластерів ембріодних тілець. Загальна кількість кардіоміоцитів в групі з додаванням циклоспорину в 1,5-2 рази перевищувала кількість кардіоміоцитів отриманих в контрольній групі. Більш ефективна дія циклоспорину спосте-

рігалась при його застосуванні до ЕСК, однак загальний рівень отриманих клітин серця був вищим в іПСК, де рівень кардіоміоцитів в контрольних експериментах без застосування додаткових факторів був також більшим.

Молекулярний механізм дії циклоспорину поки невідомий. Згідно до літературних даних дія таких інгібіторів кальційневрину як FK-506, та інгібітора NF-TA 11R-VIVIT, не виявляли кардіогенної дії. Одже механізм дії циклоспорину має бути відмінним від його імуносупресивних властивостей.

Також нещодавно було показано, що циклоспорин може захищати кардіоміоцити від процесів апоптозу. Подальше застосування циклоспорину в лікуванні серцево-судинних захворювань може позитивно впливати на ендогенні попередники кардіоміоцитів та призводити до регенерації власних клітин серця пацієнта [9]. Однак данні твердження потребую подальшого дослідження механізмів дії циклоспорину.

*Особлива подяка науковому керівнику д.мед.н., проф. Бірко Надії Михайлівні та Інституту Нейрофізіології (м. Кельн).*

#### Висновки

1. Методи диференціювання розроблені для отримання кардіоміоцитів з ЕСК можна застосовувати для диференціювання іПСК.
2. Додавання циклоспорину з 4 по 9 день диференціювання збільшувало вихід кардіоміоцитів вдвічі для ЕСК та в півтора рази для іПСК. Однак кількість отриманих кардіоміоцитів була більшою в іПСК і становила 2,46% в порівняння з 1,28% отриманих з ЕСК.

#### Література

1. *In vitro differentiation of mouse embryonic stem cells into cardiac cells / P. Emoke, S. Lichner, E. Gosca [et al.] // Romanian Biotechnological Letters. - 2011. - Vol.16, № 3. - P.6170-6180.*
2. *Takahashi K. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors / K. Takahashi // Cell. - 2008. - Vol. 131. - P.861-872.*
3. *Takahashi K. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors / K. Takahashi, S. Yamanaka // Stem Cell. - 2006. - Vol. 1. - P. 39-49.*

4. *Cardiogenic differentiation and transdifferentiation of progenitor cells / H. Reinecke [et al.] // Circ. Res. - 2005. - Vol. 103. - P. 1058-1071.*

5. *Kurosawa H. Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cell / H. Kurosawa // Journal of Bioscience and Bioengineering. - 2007. - Vol. 103. - P. 389-398.*

6. *Laflamme M.A. Regenerating the heart / M.A. Laflamme, C.E. Murry // Nat. Biotechnol. - 2005. - Vol. 23. - P. 845-856.*

7. *Fukuda K. Stem cell as a source of regenerative cardiomyocytes / K. Fukuda, S. Yuasa // Cir. Res. - 2006. - Vol. 98. - P. 1002-1013.*

8. *Cyclosporine A potently induce highly cardiogenic progenitors from embryonic stem cells / P. Yan [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 2009. - Vol. 379. - P. 115-120.*

9. *Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction / C. Piot [et al.] // N. Engl. J. Med. - 2008. - Vol. 359. - P. 473-481.*

#### Резюме

**Будаш Г.В., Білько Д.І., Саріч Т., Білько Н.М.** Застосування циклоспорину для підвищення ефективності диференціювання плюрипотентних клітин в кардіоміоцити.

Основним методом диференціювання ембріональних стовбурових клітин в кардіоміоцити є формування ембріодних тілець - агрегатів клітин, які відображають ранні етапи розвитку ембріона. Одним з методів отримання ембріодних тілець є культивування суспензійної культури ЕСК на орбитальному шейкері в неадгезивному культуральному пластику. Аналіз отриманих клітин серця проводили спостерігаючи в світловому мікроскопі за розвитком ембріодних тілець, що спонтанно скорочувались, а також визначаючи кількість GFP+ клітин методом проточної цитофлюориметрії, візуалізацію кардіоміоцитів проводили під флуорисцентним мікроскопом. В роботі було доведено, що застосування методів диференціації розроблених для ембріональних стовбурових клітин можна застосовувати для диференціації індукованих плюрипотентних клітин. Застосування циклоспорину 1,5-2 рази покращує вихід кардіоміоцитів.

**Ключові слова:** ембріональні стовбурові клітини, індуквані плюрипотентні клітини, кардіоміоцити, циклоспорин.

#### Резюме

**Будаш Г.В., Білько Д.И., Сарич Т., Билько Н.М.** Применение циклоспорина для повышения эффективности дифференцирования плюрипотентных клеток в кардиомиоциты.

Основним методом диференціювання ембріональних стовбурових кліток в кардіоміоцити являється формування ембріодних тілець - агрегатів кліток, які відображають ранні етапи розвитку ембріона. Одним з методів отримання ембріодних тілець являється культивування суспензійної культури ЕСК на орбитальному шейкері в неадгезивному культуральному пластику. Аналіз отриманих кліток серця проводили спостерігаючи за розвитком спонтанно скорочуються ембріодних тілець, також визначали кількість GFP+ кліток методом проточної цитофлюориметрії, візуалізацію кардіоміоцитів проводили під флуорисцентним мікроскопом. В роботі було доведено, що застосування методів диференціації розроблених для ембріональних стовбурових кліток можна використовувати для диференціації індукованих плюрипотентних кліток. Застосування циклоспорину в 1,5-2 рази покращує вихід кардіоміоцитів.

**Ключевые слова:** эмбриональные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные клетки, кардиомиоциты, циклоспорин.

#### Summary

**Budash G.V., Bilko D.I., Sarich T., Bilko N.M.** Application of cyclosporine for the rise of efficiency of differentiation of pluripotent cells into cardiomyocytes.

The main method for differentiation of embryonic stem cells into cardiomyocytes is formation of embryoid bodies - aggregates of cells that express the early stages of embryo development. One method of obtaining embryoid bodies is the cultivation of embryonic stem cells in suspension culture on orbital shaker at nonadherent culture dish. Analysis of the cardiomyocytes were performed by observing the development of embryonic bodies which were contracting spontaneously under the light microscopy, the number of GFP+ cells was measured by FACS, visualization of cardiomyocytes was performed under fluorescent microscope. It was proved that the use of methods developed for the differentiation of embryonic stem cells can be used for differentiation of induced pluripotent cells. Addition of cyclosporine could improve the yield of cardiomyocytes up to 1.5-2 times.

**Key words:** embryonic stem cells, induced pluripotent stem cells, cardiomyocytes, cyclosporine.

**Рецензент:** д.біол.н., проф. С.М.Смірнов