

Лінійна селекція кардіоміоцитів, отриманих із ембріональних та індукованих плюрипотентних стовбурових клітин

М. ДЯЧЕНКО, Д. БІЛЬКО, І. БОРБУЛЯК, Н. БІЛЬКО

Центр молекулярних та клітинних досліджень

Національний університет «Києво-Могилянська академія», м. Київ

Linear Selection of Cardiomyocytes Derived from Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells

М. DYACHENKO, D. BIL'KO, I. BORBULYAK, N. BIL'KO

Center for Molecular and Cell Research, National University of Kyiv-Mohyla Academy, Kyiv, Ukraine

Отримання індукованих плюрипотентних стовбурових клітин (iPS) відкрило нові перспективи для клітинної терапії. Проте, все ще залишається ряд запитань, які необхідно вирішити перш ніж клінічне застосування плюрипотентних клітин стане можливим. Основною перешкодою є здатність ембріональних стовбурових (ES) та iPS-клітин формувати тератоми при введенні в організм реципієнта. Метою дослідження було розробити ефективну методику селекції резидуальних недиференційованих стовбурових клітин із тератомогенними властивостями від пулу зрілих лінійноспецифічних клітин у процесі диференціювання.

Для проведення дослідження використовували клітини ES та iPS ліній aPig44 та AT25 відповідно. Це плюрипотентні клітини миші, що експресують ген зеленого флуоресцентного білка (GFP) та ген резистентності до пуроміцину під контролем промотора важкого ланцюга альфа-міозину. Клітини рутинно підтримувались на фідерному шарі ембріональних фібробластів миші. Для диференціювання клітини культивували на горизонтальному шейкері у середовищі IMDM із додаванням 20% FCS. Культивування утворених ембріонічних тілець (EBs) продовжували до появи GFP-позитивних EBs на 8-й день диференціювання, після чого у живильне середовище додавали пуроміцин (8 мкг/мл) та цитостатики у відповідних концентраціях (етопозид фосфат, 5-флюоурацил, блеоміцин та цисплатин).

Концентрація напівмаксимального інгібування росту клітин складала для блеоміцину 10 мкг/мл, для етопозиду фосфату – 1 мкг/мл, для цисплатини – 5 мкг/мл, для 5-флюоурацилу – 2 мкмоль. Такі концентрації препаратів не мали токсичного впливу на зрілі кардіоміоцити. Виявлено різницю у чутливості двох досліджуваних ліній клітин. Так, рівень GFP-позитивних клітин після додавання цитостатиків для кардіоміоцитів, отриманих із лінії AT25, був у 2,51–3,09 рази вищим від контрольних значень ($p < 0,05$). Статистично достовірне зростання кількості GFP-позитивних кардіоміоцитів, отриманих із клітин лінії aPig44, виявлено лише при додаванні блеоміцину (1,86 проти 0,57% у контрольній групі, $p < 0,05$), який не лише дозволяв провести селекцію зрілих кардіоміоцитів, але й підвищував рівень скорочень EBs (100% EBs скорочувались, інтенсивність 1,4 уд. порівняно з 0,8 уд. для контрольної групи, $p < 0,05$).

Отримані результати дозволяють зробити висновок, що цитостатики можуть використовуватись як нетоксичний та ефективний засіб для елімінації незрілих тератомогенних клітин у процесі диференціації. Відсутність маніпуляцій із генетичним матеріалом клітин для проведення лінійної селекції дозволить застосовувати запропонований метод для клітин, що будуть використовуватись у терапевтичних цілях.

Derivation of induced pluripotent stem cells (iPS) has opened new perspectives for cell therapy. However there are several problems have to be solved before the clinical application of pluripotent cells will be possible. The main difficulty is the ability of embryonic stem (ES) and iPS cells to form teratoma when injecting them into recipient's organism. The research aim was to develop an effective selection method of residual non-differentiated stem cells with teratomogenic properties of pool of mature linear-specific cells during differentiation.

In the research there were used ES and iPS cells of aPig44 and AT25 lines, respectively. They are mice pluripotent cells expressing gene of green fluorescent protein (GFP) and puromycin resistance gene under the control of alpha-myosin heavy chain promoter. The cells were routinely maintained on feeder layer of mice embryonic fibroblasts. For differentiation the cells were cultured in a horizontal shaker in IMDM with addition of 20% FCS. Culturing of the formed embryoid bodies (EBs) was continued until appearance of GFP-positive EBs to the 8th differentiation day, after that puromycin (8 mg/ml) and cytostatic agents in appropriate concentrations (etoposide phosphate, 5-fluouracyl, bleomycin and cisplatin) were added to the nutritional medium.

Concentration of semi-maximum inhibition of cell growth for bleomycin was 10 mg/ml, 1 mg/ml for etoposide phosphate, 5 mg/ml for cisplatin, 2 μ mol for 5-fluouracyl. The substances in such concentrations had no toxic effect on mature cardiomyocytes. It was revealed sensitivity difference of two studied cell lines. Herewith, level of GFP-positive cells after addition of cytostatic agents to cardiomyocytes derived from AT25 line was in 2.51–3.09 times higher than the control values ($p < 0.05$). A statistically significant increase of GFP-positive cardiomyocytes number derived from aPig44 cell line was revealed only after bleomycin addition (1.86 vs. 0.57% in the control group, $p < 0.05$), allowing not only selection of mature cardiomyocytes, but also increasing contractions level of EBs (100% EBs contracted, intensity was 1.4 beats if compared with 0.8 ones for the control group, $p < 0.05$).

The obtained results suggest that cytostatic agents can be used as non-toxic and effective means for eliminating teratomogenic immature cells during differentiation. Linear selection without manipulations with cell genetic material will enable to apply the proposed method for cells to be used for therapy.