



Исследование функциональности получаемых из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток кардиомиоцитов для моделирования сердечных аритмий при синдроме удлиненного интервала QT

М.М. Слотвицкий¹, В.А. Цвеляя¹, Ш.Р. Фролова¹, Е.В. Дементьева^{2, 3, 4}, К.И. Агладзе¹

¹ Московский физико-технический институт, Московская область, г. Долгопрудный, Россия

² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Россия

⁴ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Существуют факторы риска, изменяющие нормальное проведение возбуждения в сердце на хаотическое (через образование спиральной волны, т.е. реентри, и последующую фибрилляцию). К этим факторам относятся наследственные и приобретенные каналопатии. Многие опасные изменения в работе ионных каналов сердца могут быть идентифицированы с помощью электрокардиограммы пациента. К легко выявляемым изменениям относится синдром удлинения интервала QT (LQTS) на электрокардиограмме. Несмотря на весьма широкую распространенность наследственного LQTS, к которому нужно добавить и вынужденный LQTS, появляющийся под действием широкого класса фармацевтических препаратов, а также простоту выявления синдрома на ЭКГ, до сих пор не известен механизм образования реентри при этом синдроме. Следует отметить высокую вариативность синдрома (встречаемость 1 : 2500), а также факт связи увеличения частоты сердечных сокращений индивида и значительного повышения риска остановки работы сердца. После достаточно экстенсивного проведения электрофизиологических исследований на отдельных сердечных клетках, получаемых от пациентов с синдромом LQT, стало очевидно, что поиск механизма перехода нормального ритма сердца в хаотический и фибрилляцию не может ограничиваться регистрацией ионных токов в единичных клетках. Для решения такой задачи прежде всего необходима модель поведения сердечной ткани как многоклеточного ансамбля, отражающая связь различных факторов (сбой работы мембранных ионных каналов, действие лекарств, изменения процессов, межклеточные взаимодействия) с риском возникновения реентри. С целью создания экспериментальной модели LQTS в нашей работе индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) пациент-специфичной линии от здорового пациента были дифференцированы в монослой, идентифицированы при помощи иммуноцитохимии и patch-clamp исследованы параметры распространения возбуждения в зависимости от стадии дифференцировки. Показано, что стабильное значение скорости проведения и ответ на периодическую стимуляцию в диапазоне физиологических величин достигаются после 30-го дня дифференцировки.

Ключевые слова: аритмогенность; пациент-специфичность; индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК); синдром удлинения интервала QT (LQTS).

The study of the functionality of cardiomyocytes obtained from induced pluripotent stem cells for the modeling of cardiac arrhythmias based on long QT syndrome

M.M. Slotvitsky¹, V.A. Tselaya¹, S.R. Frolova¹, E.V. Dement'eva^{2, 3, 4}, K.I. Agladze¹

¹ Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow region, Dolgoprudny, Russia

² Institute of Cytology and Genetics SB RAS Novosibirsk, Russia

³ E.N. Meshalkin National Medical Research Center, Ministry of Health of Russian Federation, Novosibirsk, Russia

⁴ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

There are risk factors that lead the normal conduction of excitation in the heart into a chaotic one. These factors include hereditary and acquired channelopathies. Many dangerous changes in the work of the heart can be identified using the patient's electrocardiogram. Such relatively easily detectable changes include the long QT interval syndrome (LQTS). Despite a relatively high prevalence of hereditary LQTS, to which it is necessary to add both hereditary and induced LQTS as well as the ease of detection on the ECG, the mechanism of reentry formation in this syndrome is still unknown. What should be noted is a high variability of the hereditary syndrome and the fact of the connection between the increase in the heart rate and the risk of cardiac arrest. After an electrophysiological study on individual cardiac cells from patients with the LQT syndrome, it became apparent that the search for a mechanism for the transition of the normal heart rhythm to chaotic and fibrillation cannot be limited to recording ion currents in single cells. To solve this problem, we need a model of the behavior of cardiac tissue which reflects the relationship of various factors and the risk of reentry. In order to create an experimental model of LQTS in our work, the iPSC of a patient-specific line from a healthy patient was differentiated into a monolayer of cardiac cells and the parameters of the excitation propagation were studied depend-

Received 03.12.2017

Accepted for publication 12.01.2018

© AUTHORS, 2018

ing on the stage of differentiation. It was shown that a stable value of the propagation velocity and the response to periodic stimulation in the range of physiological values, are reached after the 30th day of differentiation.

Key words: arrhythmogenicity test; patient specificity; induced pluripotent stem cells (iPSC); the long QT interval syndrome (LQTS).

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Слотвицкий М.М., Цвелая В.А., Фролова Ш.Р., Деметьева Е.В., Агладзе К.И. Исследование функциональности получаемых из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток кардиомиоцитов для моделирования сердечных аритмий при синдроме удлиненного интервала QT. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(2):187-195. DOI 10.18699/VJ18.346

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Slotvitsky M.M., Tsvelaya V.A., Frolova S.R., Dement'eva E.V., Agladze K.I. The study of the functionality of cardiomyocytes obtained from induced pluripotent stem cells for the modeling of cardiac arrhythmias based on long QT syndrome. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(2):187-195. DOI 10.18699/VJ18.346 (in Russian)

Внезапная смерть из-за остановки сердца (sudden cardiac death, SCD) – одна из самых распространенных причин смерти среди активного и трудоспособного населения в мире. Основной причиной SCD, как правило, служит систолическая дисфункция сердца, вызванная нарушенной проводимостью возбуждения в миокарде с образованием спиральной волны проведения, называемой реентри (Fast, Kléber, 1997). Из-за появления вращающихся волн реентри увеличивается риск фибрилляции желудочков, приводящей к SCD. Развитие реентри начинается с возникновения тахиаритмий, происходящих на фоне определяемых на электрокардиограмме удлиненного интервала QT, сердечной недостаточности и инфаркта миокарда (El-Sherif et al., 2014). Синдром удлиненного интервала QT (long QT syndrome, LQTS) описан еще в 1957 г. и до сих пор остается одним из факторов, приводящих к SCD (Jervell, Lange-Nielsen, 1957; Schwartz et al., 1975). LQTS развивается в результате неправильной работы мембранных ионных каналов, что может быть связано с генетическими мутациями. В настоящее время известно более 1000 мутаций примерно в 20 генах, ассоциированных с LQTS (Campuzano et al., 2016). Один из наиболее распространенных типов LQTS, заболеваемость которым охватывает около 30 % общего количества пациентов с врожденным LQTS, вызван мутациями в гене *KCNH2*, кодирующем белок Kv11.1 (hERG1), α -субъединицу канала быстрого калиевого тока задержанного выпрямления IKr (Hou et al., 2010). Для изучения LQTS создано большое количество моделей. Особенно перспективными моделями считаются пациент-специфичные кардиомиоциты, полученные с помощью направленной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), открытых в 2006 г. (Takahashi, Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007). Подобные ИПСК модели зачастую основаны на генной модификации канальных белков и не являются пациент-специфичными (Itzhaki et al., 2011). Из-за разнообразия мутаций и однонуклеотидных полиморфизмов в клеточных линиях, используемых в качестве моделей, полученные из моделей данные могут варьировать в широких пределах. Более того, ИПСК, используемые для создания моделей LQTS, могут содержать примеси других клеток или просто могут быть получены различными протоколами (Horbach, Halfman, 2017). Индивидуальность синдрома LQTS, заключающаяся в различиях экспрессии белков ионных каналов, приводит к наличию индивиду-

альности набора ионных токов практически в каждом случае LQTS и не позволяет точно связать определяемые электрофизиологические свойства отдельной клетки с общим механизмом возникновения реентри в сердечной ткани. Так, только для LQTS 2-го типа (LQTS2) существует около 750 замен, вызывающих различия в экспрессии или функциональности белков ионного канала hERG. Это разнообразие каналопатий приводит к созданию новых антиаритмических средств, которые тестируются на различных индивидуальных моделях, специфичных для пациентов, что часто сводится к неправильному обобщению результатов (Matsa et al., 2011).

Создание адекватной экспериментальной модели сердечной ткани с LQTS, объясняющей появление реентри, должно основываться на общих для этого синдрома свойствах проведения электрического возбуждения в ансамбле сердечных клеток – сердечной ткани. Первым шагом на пути ее создания должно быть определение сроков, в течение которых культивируемая в условиях *in vitro* пациент-специфичная сердечная ткань становится функционально развившейся. Кроме того, в работе выявлены электрофизиологические различия между кардиомиоцитами, полученными при направленной кардиальной дифференцировке ИПСК от пациента с врожденным LQTS и пациента, не страдающего этим заболеванием.

Материалы и методы

Поиск мутаций, вызывающих LQTS. Геномную ДНК выделяли из образца крови пациента с LQTS и использовали в качестве матрицы для амплификации экзонов *KCNQ1* и *KCNH2* с помощью полимеразной цепной реакции. ПЦР-продукты, связанные с экзонами *KCNQ1* и *KCNH2*, секвенированы в ЦКП «Геномика» СО РАН. Нуклеотидные последовательности сравнивали с последовательностями экзонов *KCNQ1* и *KCNH2* из базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, NM_000218.2 и NM_000238.3), чтобы идентифицировать мутации, вызывающие LQTS. В результате у пациента в одном из аллелей гена *KCNH2* обнаружена мутация T613M, приводящая к врожденному LQTS 2-го типа.

Культуры клеток и репрограммирование в плюрипотентное состояние. Фибробласты пациента, несущего мутацию T613M в *KCNH2*, выделены из операционного материала (фрагмента кожи), полученного в ходе имплантации кардиовертера-дефибриллятора в Национальном

медицинском исследовательском центре им. академика Е.Н. Мешалкина Минздрава России. Фибробласты культивировали в среде DMEM: F12 1 : 1, содержащей 15 % эмбриональной бычьей сыворотки (Autogene Bioclear), 1 × GlutaMAX™ Supplement, 1 × пенициллин-стрептомицин.

Фибробласты нуклеофицировали эпизомными векторами, экспрессирующими транскрипционные факторы OCT4, SOX2, KLF4, L-MYC и LIN28 (Addgene IDs #41855-41858, # 41813-41814) с помощью Lonza Nucleofector 2b. Репрограммирование к плюрипотентному состоянию проводили согласно протоколу к EPS5 Episomal iPSC Reprogramming Kit (ThermoFisher Scientific, https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/epi5_episomal_ipsc_reprogramming_man.pdf). Клеточные кластеры, сходные по морфологии с колониями плюрипотентных клеток человека, появлялись начиная с 15-го дня после нуклеофекции. Кластеры переносили при помощи капилляра на фидер (митотически инактивированные фибробласты мыши) и культивировали до получения стабильных линий ИПСК в среде, содержащей 85 % Knockout DMEM, 15 % Knockout Serum Replacement, 1 × GlutaMAX™, 1 × пенициллин-стрептомицин, 1 × раствор незаменимых аминокислот, 0,05 мМ β-меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich), 10 нг/мл основного фактора роста фибробластов (bFGF) (Biologend).

Все реагенты получены от ThermoFisher Scientific (в противном случае поставщик указан отдельно).

Характеристика линий ИПСК. Анализ экспрессии щелочной фосфатазы и генов, участвующих в поддержании плюрипотентного состояния в полученных клеточных линиях, проводили, как описано ранее (Medvedev et al., 2010).

Спонтанная дифференцировка клеточных линий осуществлялась в эмбрионидных тельцах (Medvedev et al., 2010). 14-дневные эмбрионидные тельца дезагрегировали 0,25 % трипсином. Клеточную суспензию высевали на 4-луночные планшеты и культивировали в течение семи дней. Иммунофлуоресцентный анализ дифференцированных клеток выполняли по описанному далее протоколу.

Присутствие эпизомных векторов в линиях ИПСК выявляли с помощью ПЦР. Использовали праймеры rEP4-SF2-oriP (5'-ATCGTCAAAGCTGCACACAG-3') и rEP4-SR2-oriP (5'-CCCAGGAGTCCCAGTAGTCA-3') (Epi5™ Episomal iPSC Reprogramming Kit). Условия ПЦР: 95 °C в течение 15 мин, затем 35 циклов (95 °C, 30 с, 58 °C, 30 с, 72 °C, 40 с), 72 °C в течение 5 мин.

Направленная дифференцировка ИПСК в кардиомиоциты проводилась в соответствии с опубликованным ранее протоколом (Lian et al., 2013). ИПСК культивировали в течение нескольких пассажей в бесфидерных условиях (в среде Essential 8™ Medium на Geltrex LDEV-Free hESC-Qualified Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix (ThermoFisher Scientific)). За три-четыре дня до дифференцировки ИПСК пересаживали на 12-луночные планшеты, диаметр каждой лунки составляет 15 мм. Дифференцировка запускалась при плотности клеток 80–90 % добавлением среды RPMI 1640, содержащей добавку B27-insulin (Thermo Fisher Scientific) и 10 мкМ CHIR99021 (Sigma-Aldrich), на 24 ч. Дальнейшие этапы дифференци-

ровки более подробно описаны в обзоре (Lian et al., 2013), в протоколе GiWi.

Для исследований с иммунофлуоресцентным окрашиванием и patch-clamp дифференцированные клетки дезагрегировали TrypLE™ Express (Thermo Fisher Scientific) и пересаживали на поверхности, покрытые 0,1 % фактором адгезии (AF Gibco) в среду, содержащую 80 % RPMI 1640, 20 % эмбриональной бычьей сыворотки и 10 мкМ Y-27632 (StemRD). Для выделения чистой популяции кардиомиоцитов выполнялась метаболическая селекция дифференцированных клеток в течение семи дней (Burrige et al., 2014) в среде RPMI 1640 без глюкозы (ThermoFisher Scientific), содержащей 213 мкг/мл L-аскорбиновой кислоты, 500 мкг/мл рекомбинантного человеческого альбумина, экспрессированного в рисе, и 5 мМ DL-лактата натрия (Sigma-Aldrich).

Иммунофлуоресцентное окрашивание. Клетки фиксировали в течение 10 мин в 4 % растворе параформальдегида, далее на 10 мин помещали в 0,4 % раствор тритона-X100 или 96 % этанола (для TRA-1-60 и TRA-1-81). Иммуноокрашивание антителами к SSEA-4 проводили без стадии пермеабилзации. Клетки инкубировали 30 мин в блокирующем буфере (1 % бычьего сывороточного альбумина в фосфатном буферном растворе, PBS), далее 16 ч при 4 °C с первыми антителами, затем в течение 1 часа – при комнатной температуре со вторыми антителами. Отмывки от несвязавшихся антител проводили в PBS два раза по 15 мин. ДНК клеток была окрашена DAPI (VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI, Vector, USA, Cat. No. H-1200). Для неспецифического окрашивания на f-актин использовали фаллоидин Alexa Fluor 488. Образцы анализировали с помощью инвертированных флуоресцентных микроскопов (Zeiss LSM 710 и Nikon Eclipse Ti-E).

Первичные антитела и рабочие разведения: TRA-1-60 (Abcam, ab16288) 1:200, TRA-1-81 (Abcam, ab16289) 1:200, SSEA-4 (Abcam, ab16287) 1:50, NANOG (ReproCELL, RCAB003P) 1:200, OCT4 (Santa Cruz, sc-5279) 1:200, нейрофиламент 200 (Sigma, N0142) 1:500, CD31 (Cell Marque, 131M) 1:100, гладкомышечный α-актин (Dako, M0851) 1:50, HNF4α (Santa Cruz, sc-8987) 1:200, сердечный тропонин T (Abcam, ab8295) 1:100, саркомерный α-актинин (Abcam, ab9465) 1:100, миозин (Abcam, ab15) 1:100, NKX2.5 (Санта-Крус, sc-14033). Вторичные антитела (ThermoFisher Scientific, рабочее разведение 1:400) – Alexa Fluor 568 anti-mouse IgG (H+L) highly cross adsorbed (A11031), Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG (H+L) highly cross adsorbed (A11029), Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG1 (A21121), Alexa Fluor 568 anti-rabbit IgG (H+L) (A11011), Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG (H+L) (A11008).

Подготовка образцов и растворов для оптического картирования и patch-clamp. Все стекла для оптического картирования и рабочие камеры для patch-clamp были автоклавируются и помещены в 12-луночные планшеты или чашки Петри, предварительно стерилизованные ультрафиолетом. Стекла для высаживания клеток были покрыты Geltrex, согласно описанию в руководстве (Gibco, Geltrex® hESC-qualified Ready-To-Use Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix). ИПСК высевали на стекла в концентрации 40000 клеток/см² и далее диф-

ференцировали в кардиомиоциты. Для исследований на patch-clamp 13-миллиметровые стекла были покрыты специальным фактором адгезии (AF, Gibco). Концентрация дифференцированных клеток для patch-clamp составляла 10000 клеток/см².

Оптическое картирование. Перед процедурой оптического картирования все химические растворы нагревали до 37 °С. Процесс осуществлялся в соответствии с протоколом: образец окрашивали кальций-зависимым флуоресцентным красителем fluo-4 (AM) в течение 30–40 мин при 37 °С в CO₂-инкубаторе, далее его промывали раствором Tyrode (Sigma-Aldrich Co., США, T2145-10L) и помещали на термоплет для поддержания температуры 37 °С. Визуализация волн возбуждения и видеозапись реализованы с помощью установки, состоящей из флуоресцентного микроскопа Olympus MVX-10 Macro-View и высокоскоростной Andor EM-CCD Camera 897-U. Файл конфигурации был загружен с фиксированными параметрами видеонаблюдения (130 кадров в секунду). Обработка данных выполнена с использованием программы ImageJ и плагинов для этой программы (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Экспериментальный сигнал оптического отображения обработан для уменьшения шума и лучшего представления волновых фронтов с использованием программы Wolfram Mathematica 9. Процедура оптического картирования проводилась менее 30 мин во избежание чрезмерного стресса для клеток. После процедуры картирования образец дважды промывали раствором PBS. После этого раствор Tyrode заменяли средой RPMI 1640 с добавкой B27. Образец помещали обратно в инкубатор до следующих исследований.

Электрофизиологические записи (patch-clamp). Ионные токи регистрировали в одиночных изолированных кардиомиоцитах методом перфорированного patch-clamp в конфигурации whole-cell. В качестве перфорирующего агента использовали амфотерицин Б в ДМСО (диметилсульфоксид) в концентрации 0.24 мг/мл (Lipriat, 2009). Эксперименты проводили при комнатной температуре (22–24 °С). Покровные стекла с посаженными на них сердечными клетками помещали в камеру, установленную на предметном столике инвертированного микроскопа Olympus IX71. В камере постоянно обновляли внеклеточный раствор.

Растворы и протоколы для patch-clamp. Камерный раствор, используемый для регистрации потенциала действия (ПД), содержал 150 мМ NaCl, 5.4 мМ KCl, 1.8 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, 15 мМ D-глюкозы, 15 мМ HEPES/NaOH, 1 мМ Na-пирувата (значение pH раствора доведено до 7.4 с помощью раствора NaOH). Пипеточный (внутриклеточный) раствор состоял из 150 мМ KCl, 5 мМ NaCl, 2 мМ CaCl₂, 5 мМ EGTA, 10 мМ HEPES/NaOH, 5 мМ MgATP (pH = 7.2, аналогично при использовании раствора KOH).

Раствор внеклеточный, используемый для записи Na⁺ тока: 50 мМ NaCl, 1.8 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, 110 мМ CsCl₂, 10 мМ D-глюкозы, 10 мМ HEPES/NaOH (pH = 7.4 с помощью CsOH). Пипеточный (внутриклеточный) раствор для регистрации Na⁺ тока: 135 мМ CsCl₂, 10 мМ NaCl, 2 мМ CaCl₂, 5 мМ EGTA, 10 мМ HEPES/NaOH, 5 мМ MgATP (pH 7.2 с помощью CsOH).

Камерный раствор для регистрации тока Ca²⁺: 160 мМ TEA-Cl, 5 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, 10 мМ D-глюкозы,

10 мМ HEPES/NaOH (pH = 7.4 CsOH). Пипеточный раствор содержал 145 мМ CsCl₂, 5 мМ NaCl, 5 мМ EGTA, 10 мМ HEPES/NaOH, 5 мМ MgATP (pH = 7.2 с помощью CsOH).

Для регистрации токов I_{Kr} камерный раствор содержал 150 мМ NaCl, 5.4 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 1.8 мМ CaCl₂, 15 мМ D-глюкозы, 15 мМ HEPES/KOH (pH = 7.4 с помощью NaOH) и пипеточный раствор: 150 мМ KCl, 2 мМ CaCl₂, 5 мМ NaCl, 5 мМ MgATP, 5 мМ EGTA, 10 мМ HEPES/KOH (pH 7.2 с помощью KOH) (Ma et al., 2011).

Пипетки для patch-clamp вытягивали из боросиликатного стекла (BF150-86-10 Sutter Instrument, США) сопротивлением ~3 МΩ в экспериментальном растворе. После формирования гигаомного сопротивления (GΩ) емкостные компоненты компенсировали с помощью настроек усилителя. По мере перфорации мембраны, заключенной в кончике пипетки, с помощью антибиотика медленные емкостные компоненты увеличивались. После компенсации сопротивления R_a начинались детектирования токов и потенциала действия с помощью установленных протоколов. При необходимости компенсировалось последовательное сопротивление.

Потенциал действия был вызван применением фиксированного тока амплитудой 1 нА в течение 2.5 мс.

Токи целой клетки для детектирования натриевого тока Na⁺ были вызваны по протоколу, представляющему собой нарастающий стимул от –120 до +50 мВ длительностью 200 мс при поддерживающем потенциале –80 мВ (с использованием ступеньки в начале протокола: от –80 до –120 мВ длительностью 100 мс) (Estacion, Waxman, 2013).

Для записи тока Ca²⁺ L-типа без помехи Na⁺ тока использовали ступенчатый протокол с препульсом от поддерживаемого потенциала от –80 до –40 мВ длительностью 100 мс. Пик тока I_{Ca, L} измеряли при 0 мВ (Pelzmann et al., 1998). Быстрая (I_{Ks}) и медленная (I_{Kr}) компоненты калиевого тока задержанного выпрямления получены 5-секундным деполяризующим импульсом от –40 до +50 мВ с шагом 10 мВ (при поддерживаемом потенциале –70 мВ). Как правило, емкость мембран, измеренная с помощью программного обеспечения pCLAMP10.2, варьировалась 20–50 пФ.

Результаты

Образование и характеристика монослоев кардиомиоцитов. Использовали две линии: if31-5 (полученная от пациента с LQTS с мутацией T613M в гене *KCNH2*) и в качестве контроля – iSMA6L (от пациента без LQTS) (Григорьева и др., 2016). Поиск мутации у пациента с LQTS, получение и характеристика пациент-специфичных ИПСК приведены в разделе «Материалы и методы». Показано, что линия if31-5 экспрессирует все основные маркеры плюрипотентного состояния (щелочная фосфатаза, поверхностные антигены), а также способна спонтанно дифференцироваться в производные трех зародышевых листков, что подтверждает успешность репрограммирования к плюрипотентному состоянию.

После начала направленной дифференцировки ИПСК в кардиомиоциты клетки с восьмого дня (с момента первых сокращений) ежедневно исследовали на предмет образования функционального синцития и основных

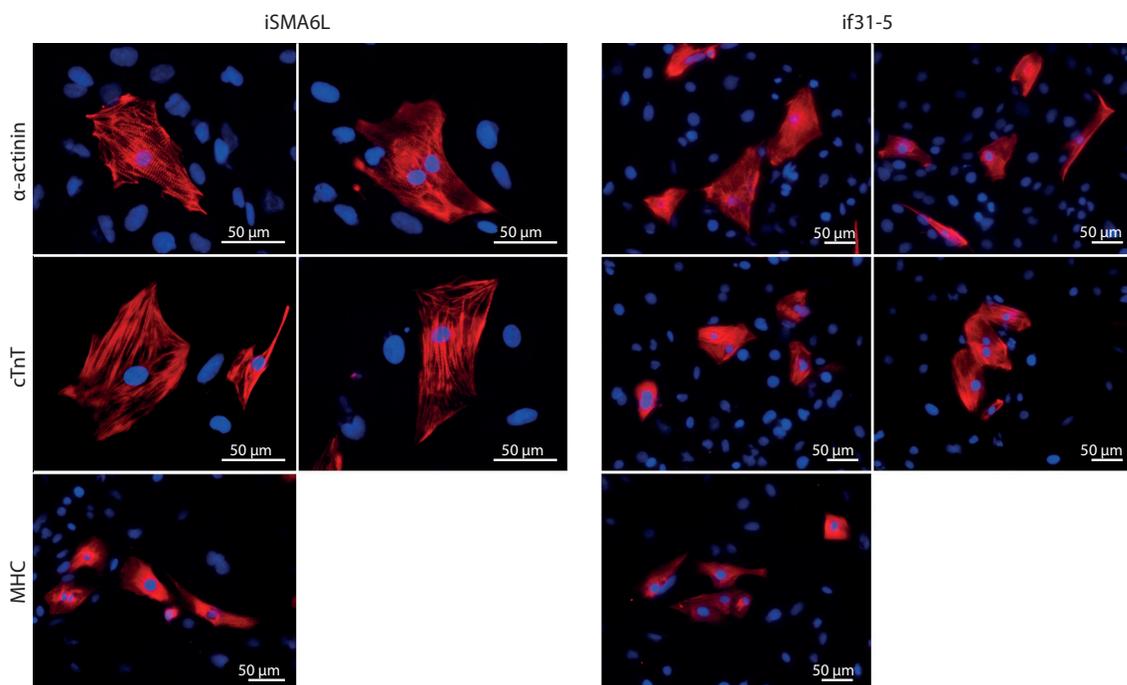


Fig. 1. Immunocytochemistry of differentiated cells. The dyeing of fluorescent antibodies specific for cardiomyocytes is described in Methods.

The figure shows the expression of cTnT, MHC, and alpha-actinin (red marker), confirming that cells fluorescing red are cardiomyocytes. Cells with only nuclei colored (blue marker, DAPI) are other cell types, which do not express cTnT, MHC, or alpha-actinin.

структур, присущих кардиомиоцитам, таких как саркоплазматический ретикулум и миофибриллы. Выявлялась также тенденция на повышение экспрессии определенных ионных каналов и формирование полноценного потенциала действия. Уже на девятый день после начала дифференцировки в клетках наблюдалась экспрессия тяжелой цепи β -миозина и слабо выраженная поперечнополосатая исчерченность α -актинина. С 12-го дня развивались саркомеры. К 30-му дню кардиомиоциты можно было считать зрелыми в соответствии со сформированными структурами. В процессе дифференцировки клеточный слой образовал проводящую структуру сердечных клеток. Начиная с 12-го дня в монослое отмечалось наличие специфических маркеров connexin-43. Экспрессия основных маркеров кардиомиоцитов, полученных при дифференцировке iSMA6L и if31-5, приведена на рис. 1.

Следует отметить, как происходило образование проводящей структуры из сердечных клеток. Начиная с девятого дня клетки из слоя подвергали самосборке таким образом, что проводящие клетки были организованы в кластеры. Примерно с 15-го дня клетки в кластерах были способны генерировать и проводить возбуждение.

Окончательное формирование структур и их самоорганизация происходили примерно через 30–35 дней после начала дифференцировки. После этого наблюдались рост и созревание кардиомиоцитов, что продемонстрировано оптическим картированием.

Электрофизиологическое сравнение линий iSMA6L и if31-5. Потенциалы действия (ПД) кардиомиоцитов линий iSMA6L и if31-5 регистрировали с 10-го до 50-го дня после начала дифференцировки. Для записи потен-

циала действия к кардиомиоцитам iSMA6L был применен стимул с амплитудой 1 нА длительностью 2.5 мс частотой 1 Гц. Уже на 12-й день дифференцировки линии iSMA6L форма ПД соответствовала форме ПД желудочкового кардиомиоцита, но ПД имел укороченную длительность (200 мс) (рис. 2, a1). В дальнейшем была выявлена тенденция к установлению нормальной длительности потенциала действия, соответствующей желудочковому кардиомиоциту человека. На 21-й день дифференцировки длительность ПД составляла 250 мс (рис. 2, a2), с 28-го дня длительность составляла около 400 мс (рис. 2, a3). С 14-го дня можно было регистрировать быстрый натриевый ток. Для обнаружения потенциал-зависимого натриевого тока INa^+ применялся протокол в форме «рампа» со стимуляцией от -120 до $+50$ мВ длительностью 200 мс (рис. 2, b2).

Потенциалзависимый кальциевый ток L-типа, ICa_{L-type} вызван применением протокола стимула в виде ступеньки от -40 до 0 мВ длительностью 300 мс (рис. 2, b2). Кальциевый ток в линии iSMA6L детектировался с 18-го дня. Для регистрации быстрой ИКг и медленной ИКs компонент калиевого тока задержанного выпрямления применен стимул в виде ступенек с потенциалом от -40 до 50 мВ с шагом в 10 мВ длительностью 5 с при поддерживаемом потенциале -40 мВ (рис. 2, b3).

Аналогично характеризовались кардиомиоциты линии if31-5. Потенциал действия был вызван стимуляцией с амплитудой 1 нА длительностью 2.5 мс частотой 1 Гц. На 15-й день дифференцировки линии if31-5 длительность потенциала действия составляет всего в среднем 200 мс (рис. 3, a1), на 27-й день длительность потенциала дей-

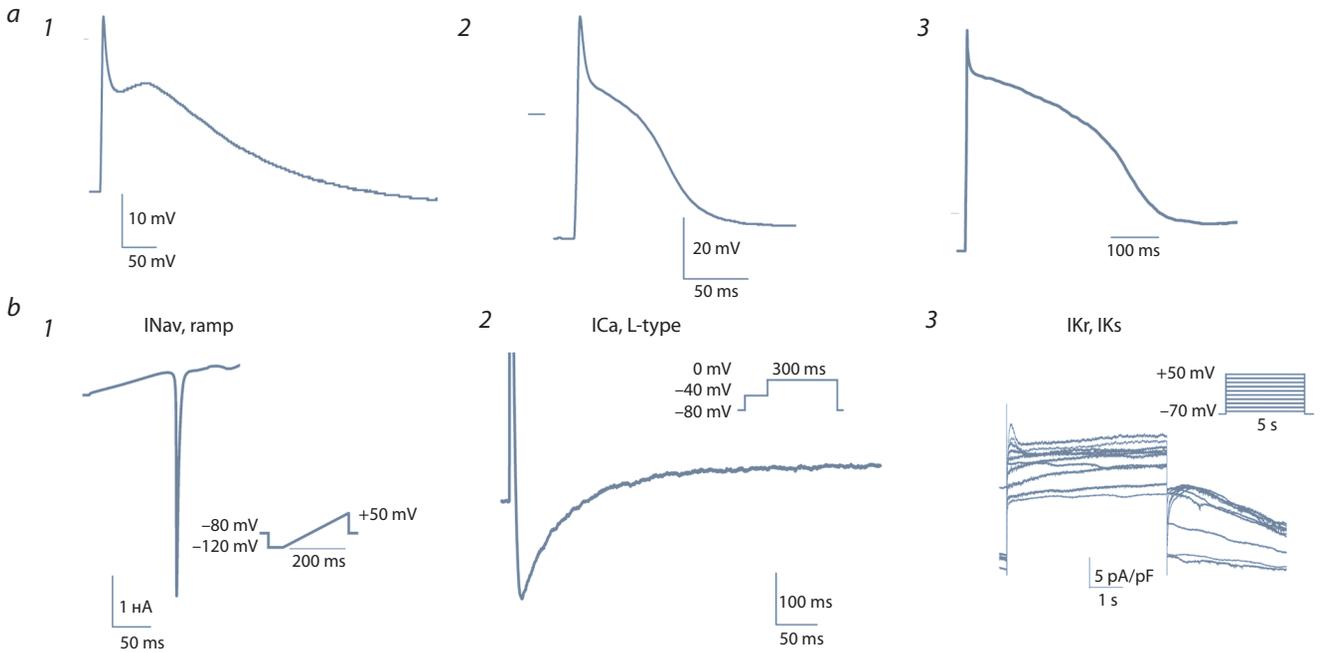


Fig. 2. Electrophysiological analysis of isolated cardiomyocytes differentiated from iSMA6L cells.

(a) Action potentials at different stages of differentiation measured by the patch-clamp method: 1, on day 12 of differentiation; 2, on day 21; 3, on day 28. (b) Potential-dependent ion currents in iSMA6L-derived cardiomyocytes obtained by whole-cell patch-clamp recording: 1, sodium current I_{Na^+} , obtained by stimulation of iSMA6L-derived cardiomyocytes by the ramp protocol; 2, calcium current obtained in iSMA6L-derived cardiomyocytes; 3, potassium currents of delayed rectification obtained in iSMA6L-derived cardiomyocytes.

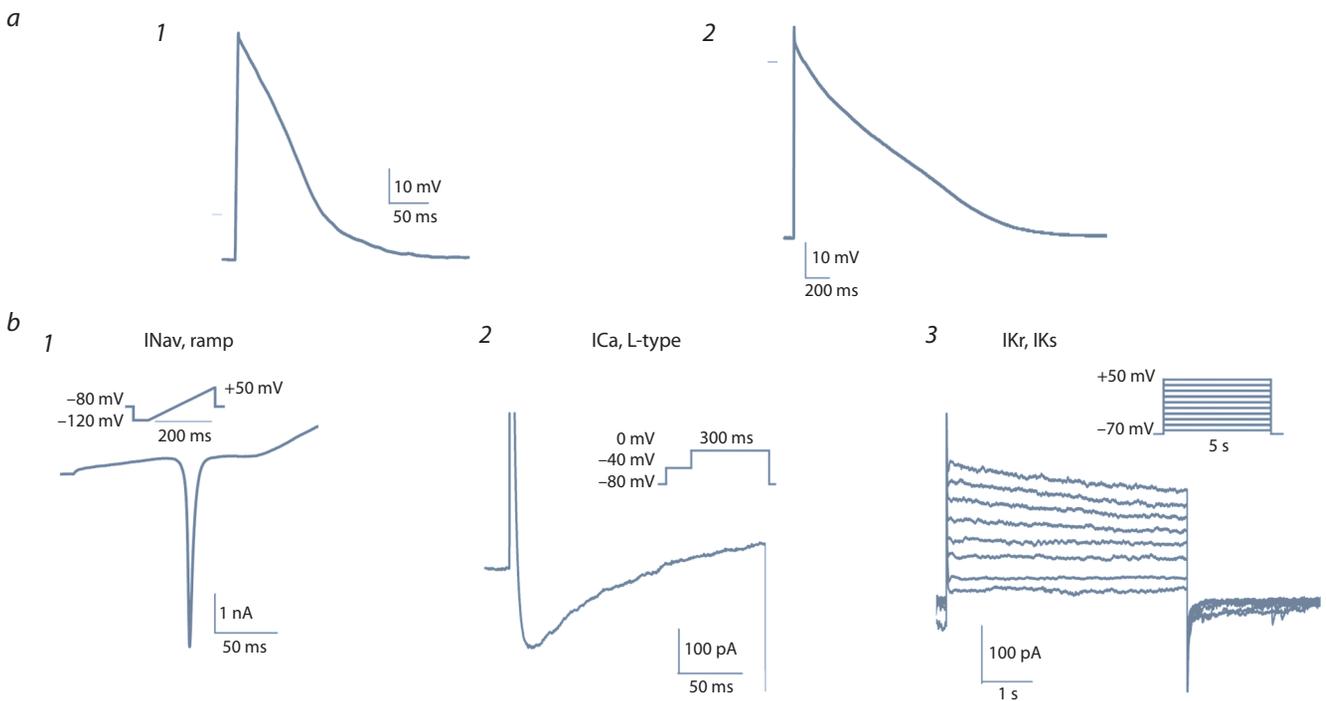


Fig. 3. Electrophysiological analysis of isolated cardiomyocytes differentiated from the if31-5 line.

(a) Action potentials at different stages of differentiation measured by the patch-clamp method: 1, AP of a human if31-5-derived cardiomyocyte obtained on day 15 of differentiation; 2, on day 27 of differentiation.

(b) Potential-dependent ion currents of if31-5-derived cardiomyocytes measured by whole-cell patch-clamp recording: 1, sodium current I_{Na^+} obtained by stimulation of differentiated cardiomyocytes of the if31-5 line by the ramp protocol; 2, calcium current obtained from iSMA6L-derived cardiomyocytes; 3, potassium currents of delayed rectification obtained from if31-5-derived cardiomyocytes.

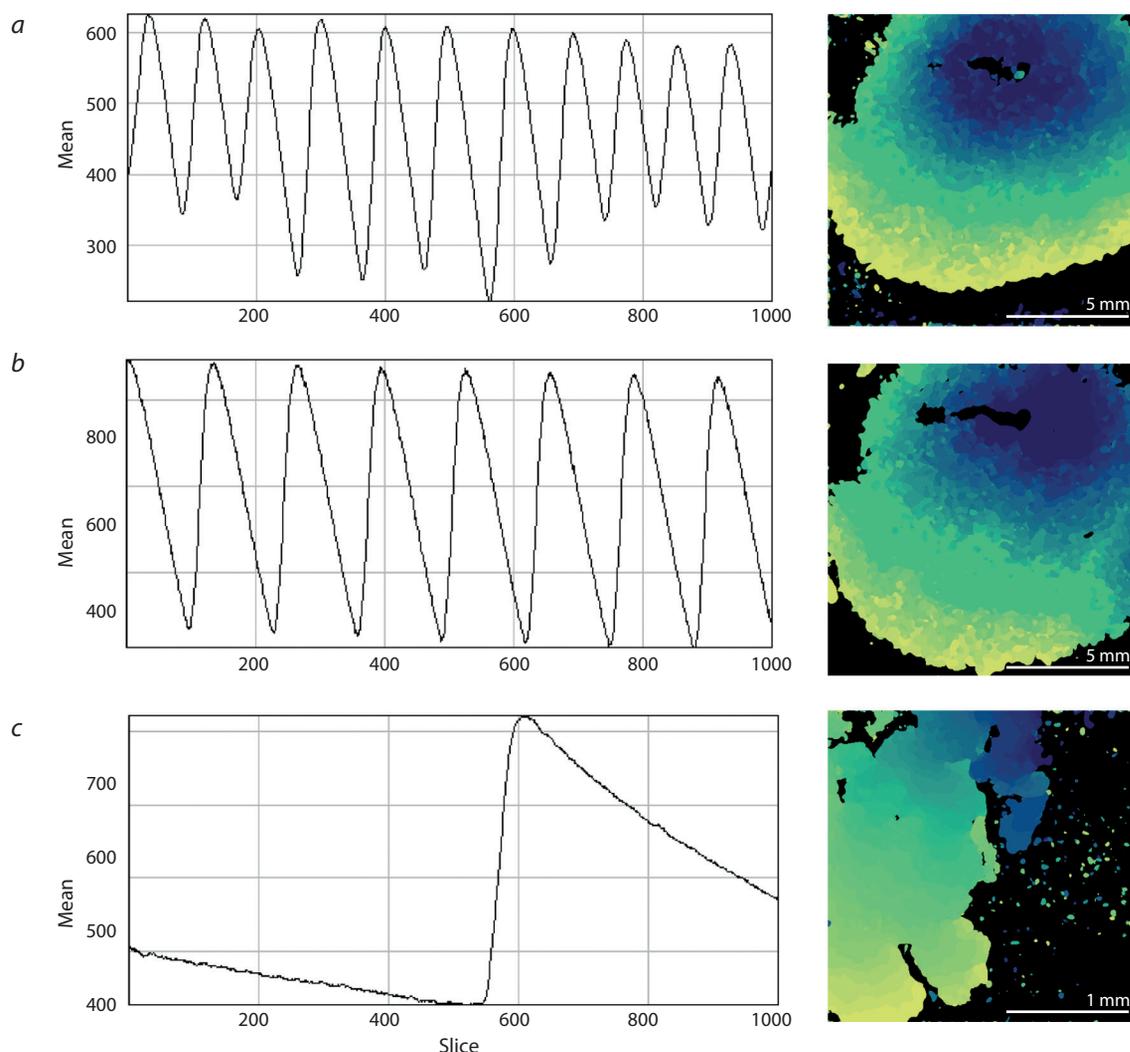


Fig. 4. Phase maps of excitation wave propagation from the monolayer of cardiomyocytes in a 15-mm plate.

(a) Phase map for the propagation of excitation on the monolayer of ISMA6L cells within 50 ms on day 30 of differentiation. The behavior is isotropic. On the left: the fluorescence intensity of fluo-4 (AM), conjugated with the passage of the wave of Ca^{2+} ions. The number of peaks in the graph shows how many times the culture was able to be excited by the electrode stimulus within the record time (8 seconds). Thus, the figure shows the conduct at a stimulus frequency about 1.4 Hz. (b) Phase map for the same sample within 50 ms at a lower frequency, set by the electrode (1 Hz). It is apparent that the wave propagation region is larger; hence, the wave velocity at this frequency is higher. (c) Phase map for the propagation of excitation along the monolayer of if31-5-derived cells on day 19 of differentiation within 1.2 sec. On the left: the propagation velocity is much lower, and repolarization takes significantly longer than in the line without the current IKr mutation.

ствия значительно удлиняется до значений более 600 мс в среднем (рис. 3, a2). Зафиксированы также потенциал-зависимые ионные токи начиная с 14-го дня (рис. 3, б1 и б2). В случае калиевых токов видно, что в линии if31-5 отсутствует быстрая компонента калиевого тока задержанного выпрямления IKr (см. рис. 3, б3).

Формирование проводящих структур подтверждается наличием синхронного проведения, регистрируемого методом оптического картирования. Необходимым моментом при регистрации активности является устойчивое проведение полученной ткани человека. Таким образом, задача стояла в определении момента, когда измерения становятся наиболее правдоподобными и устойчивыми,

т.е. практически не изменяются в зависимости от процессов дальнейшей организации ткани. Проведение волны возбуждения и реакцию на стимуляцию регистрировали с 12-го дня от начала дифференцировки. На линии iSMA6L спонтанная активность была замечена с 8-го–10-го дня в зависимости от культуры. При исследовании культуры с 12-го по 20-й день при помощи электродной стимуляции системой из кругового и точечного электродов было установлено, что культура способна бесперебойно проводить импульсы с частотой порядка 1–1.25 Гц и не усваивает более высокие значения. После 20-го дня культура продолжает активно формироваться и уже улавливает более высокие частоты, вплоть до 1.42 Гц. С 30-го дня культура

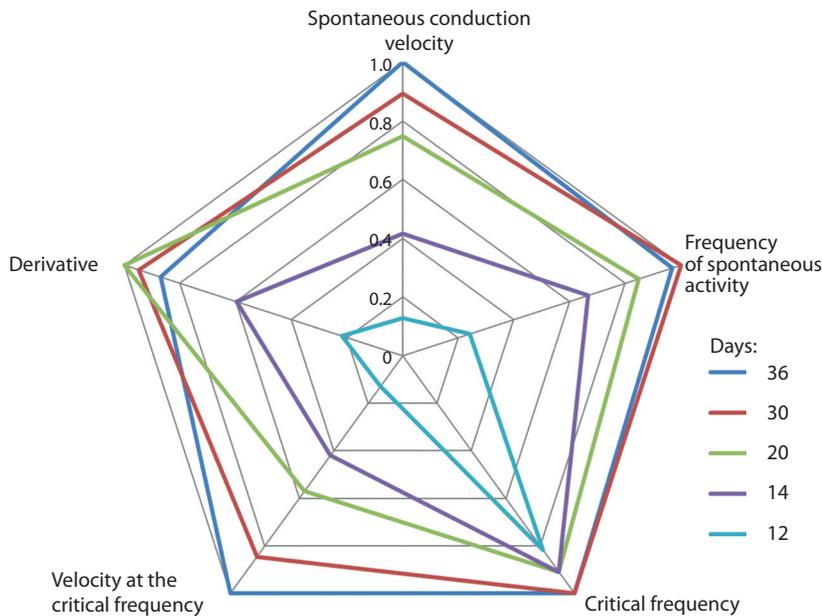


Fig. 5. Radar plot of the properties of the monolayer of iSMA6L-derived cells on different days of differentiation.

The values on each axis are expressed in relative units. Each axis is normalized to the greatest recorded value of the corresponding parameter, taken to be unity.

уже стабильно реагировала на импульсы частотой порядка 1.5 Гц и более, при этом проводила волну возбуждения с устойчивой скоростью, в том числе и при различных частотах. Значение скорости проведения приближалось к 0.3 м/с, что соответствует данным по проведению на срезе сердечной ткани зрелых кардиомиоцитов.

Развитие линии if31-5 происходило медленнее и менее стабильно, однако наблюдались общие с линией iSMA6L тенденции развития, такие как увеличение скорости проведения на более поздние дни дифференцировки. Полученные с помощью оптического картирования данные обрабатывали при использовании программы Wolfram Mathematica 9 для построения фазовых карт, отражающих распространение волны по образцу (рис. 4).

Для определения периода, с которого свойства проведения культуры станут устойчивыми и независимыми от дальнейших процессов развития и формирования ткани, проводилось наблюдение за пятью основными параметрами проведения, полученными с помощью картирования и отражающими такие свойства культуры, как проведение импульса, скорость при различных частотах и критическая частота. На рис. 5 представлена диаграмма, показывающая значения следующих параметров для монослоя клеток iSMA6L на различные дни дифференцировки (каждое отмеченное на оси значение усреднено по измерениям трех образцов): скорость спонтанного проведения, измеренная с помощью программы ImageJ; частота спонтанной активности; критическая частота – максимальная частота электродной стимуляции, улавливаемая культурой без перебоев; скорость при критической частоте; производная – отношение скорости при спонтанном возбуждении к скорости при критической частоте. Замечено, что все пять величин возрастают с течением времени, резкий рост прекращается после 30-го дня: затем различие значений между соседними днями дифференцировки не превышает разницу значений у различных образцов одного и того же дня, это означает, что изменение свойств проведения в дальнейшем слабо зависит от дня дифференцировки.

Обсуждение

Основная проблема, связанная с изучением LQTS, заключается в отсутствии точного механизма формирования реентри, включающего подробное

описание влияния каналопатии на распространение волн возбуждения. Эта проблема усугубляется тем, что результаты экспериментальных моделей на животных не могут быть экстраполированы на людей, например, представители семейства мышинных не обладают быстрым калиевым током (IKr), играющим важную роль в формировании реентри. Открытие индуцированной плюрипотентности привело к созданию принципиально новых методов изучения механизмов сердечных аритмий (и скрининга лекарств) на основе ИПСК (Passier et al., 2008; Gintant et al., 2016). В более ранних исследованиях с использованием технологии ИПСК возникла проблема определения стадии развития, при которой функциональная зрелость дифференцирующих в кардиомиоциты клеток была бы успешно достигнута. В нескольких исследованиях предпринимались попытки определить функциональность этих клеток и характеристики их созревания (Klimanskaya et al., 2008; Mauritz et al., 2008). Однако для изучения аритмий и эффективного тестирования антиаритмических средств одноклеточных клеток недостаточно, необходимо проводить исследования на сердечной ткани. Таким образом, вопрос ставится о достижении зрелости не клеткой, а всей сердечной тканью.

Наше исследование с использованием метода оптического картирования показало, что для формирования проводящей и полностью функциональной сердечной ткани при направленной кардиальной дифференцировке линии ИПСК iSMA6L требуется около 30 дней. Именно с 30-го дня дифференцировки все ключевые свойства проведения возбуждения становятся устойчивыми и перестают зависеть от дальнейших процессов развития ткани. Так, скорость проведения при спонтанном возбуждении культуры достигает своего максимума в 0.3 м/с, что соответствует значениям скорости проведения среза человеческой сердечной ткани (Kang et al., 2016).

В ходе направленной дифференцировки в кардиомиоциты выявлены принципиальные различия между линиями iSMA6L и if31-5, несущей мутацию, вызывающую врожденный LQTS. Данные patch-clamp и иммуно-

цитохимии показали, что формирование функциональных желудочковых кардиомиоцитов iSMA6L началось через 12 дней после запуска дифференцировки. Форма потенциала действия кардиомиоцитов iSMA6L на 12-й день дифференцировки соответствовала таковой желудочковых кардиомиоцитов человека, но потенциал действия характеризовался укороченной длительностью с последующим увеличением до 400 мс к 28-му дню дифференцировки и далее не менялся. Что касается кардиомиоцитов if31-5 с мутацией T613M в гене *KCNH2*, кодирующем α -субъединицу канала быстрой компоненты калиевого канала задержанного выпрямления IKr, то на раннем этапе дифференцировки клеток потенциал действия имел сначала укороченную форму, а затем к 27-му дню дифференцировки достигал стабильной длительности (более 600 мс). В то время как в кардиомиоцитах if31-5 INa, ICa_L-type фиксировались уже на ранних этапах дифференцировки (на 14-й день), быстрой компоненты калиевого канала задержанного выпрямления IKr не обнаружено. Этот факт, по-видимому, и обуславливает увеличенную продолжительность потенциала действия в кардиомиоцитах линии if31-5 по сравнению с кардиомиоцитами iSMA6L.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Science Foundation, project 16-14-10091.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Burrige P.W., Matsa E., Shukla P., Lin Z.C., Churko J.M., Ebert A.D., Lan F., Diecke S., Huber I., Mordwinkin N.M., Plews J.R., Abilez O.J., Cui B., Gold J.D., Wu J.C. Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat. Methods*. 2014;11(8):855-860.
- Campuzano O., Perez-Serra A., Cesar S., Iglesias A., Brugada R. Genetic basis of atrial fibrillation. *Genes & Diseases*. 2016;3(4):257-262.
- El-Sherif N., Turitto G., Boutjdir M., Pilai S., Otte B., Pedalino R. Electrophysiological basis of ECG characteristics of torsades de pointes in long QT syndrome. *Card. Electrophysiol. Clin.* 2014;6(3):433-444.
- Estacion M., Waxman S.G. The response of Na(V)1.3 sodium channels to ramp stimuli: multiple components and mechanisms. *J. Neurophysiol.* 2013;109(2):306-314.
- Fast V.G., Kléber A.G. Role of wavefront curvature in propagation of cardiac impulse. *Cardiovasc. Res.* 1997;33(2):258-271.
- Gintant G., Sager P.T., Stockbridge N. Evolution of strategies to improve preclinical cardiac safety testing. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2016;15(7):457-471.
- Grigor'eva E.V., Valetdinova K.R., Ustyantseva E.I., Shevchenko A.I., Medvedev S.P., Mazurok N.A., Maretina M.A., Kuranova M.L., Kiselev A.V., Baranov V.S., Zakian S.M. Neural differentiation of patient-specific induced pluripotent stem cells from patients with a hereditary form of spinal muscle atrophy. *Geny i kletki = Genes & Cells*. 2016;XI(2):70-81. (in Russian)
- Horbach S.P., Halffman W. The ghosts of HeLa: How cell line mis-identification contaminates the scientific literature. *PLoS ONE*. 2017;12(10):e0186281.
- Hou L., Deo M., Furspan P., Pandit S.V., Mironov S., Auerbach D.S., Gong Q., Zhou Z., Berenfeld O., Jalife J.A. Major role for hERG in determining frequency of reentry in neonatal rat ventricular myocyte monolayer novelty and significance. *Circ. Res.* 2010;107(12):1503-1511.
- Itzhaki I., Maizels L., Huber I., Zwi-Dantsis L., Caspi O., Winterstern A., Feldman O., Gepstein A., Arbel G., Hammerman H., Boulos M., Gepstein L. Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011;471(7337):225-229.
- Jervell A., Lange-Nielsen F. Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the QT interval, and sudden death. *Am. Heart J.* 1957;54(1):59-68.
- Kang C., Qiao Y., Li G., Baechle K., Camelliti P., Rentschler S., Efimov I.R. Human organotypic cultured cardiac slices: new platform for high throughput preclinical human trials. *Sci. Rep.* 2016;6:28798.
- Klimanskaya I., Rosenthal N., Lanza R. Derive and conquer: sourcing and differentiating stem cells for therapeutic applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2008;7(2):131-142.
- Lian X., Zhang J., Azarin S.M., Zhu K., Hazeltine L.B., Bao X., Hsiao C., Kamp T.J., Palecek S.P. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions. *Nat. Protoc.* 2013;8(1):162-175.
- Lippiat J.D. Whole-cell recording using the perforated patch clamp technique. *Potassium Channels: Methods and Protocols*. Humana Press, 2009;141-149.
- Ma J., Guo L., Fiene S.J., Anson B.D., Thomson J.A., Kamp T.J., Kolaja K.L., Swanson B.J., January C.T. High purity human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: electrophysiological properties of action potentials and ionic currents. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2011;301(5):H2006-H2017.
- Matsa E., Rajamohan D., Dick E., Young L., Staniforth A., Denning C. Drug evaluation in cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells carrying a long QT syndrome type 2 mutation. *Eur. Heart J.* 2011;32(8):952-962.
- Mauritz C., Schwanke K., Reppel M., Neef S., Katsirntaki K., Maier L.S., Nguemo F., Menke S., Hausteiner M., Hescheler J., Hasenfuss G., Martin U. Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells. *Circulation*. 2008;118(5):507-517.
- Medvedev S.P., Malakhova A.A., Grigor'eva E.V., Shevchenko A.I., Dementyeva E.V., Sobolev I.A., Lebedev I.N., Shilov A.G., Zhimulev I.F., Zakian S.M. Derivation of induced pluripotent stem cells from fetal human skin fibroblasts. *Acta Naturae*. 2010;2(2):102-106.
- Passier R., van Laake L.W., Mummery C.L. Stem-cell-based therapy and lessons from the heart. *Nature*. 2008;453(7193):322-329.
- Pelzmann B., Schaffer P., Bernhart E., Lang P., Mächler H., Rigler B., Koidl B. L-type calcium current in human ventricular myocytes at a physiological temperature from children with tetralogy of Fallot. *Cardiovasc. Res.* 1998;38(2):424-432.
- Schwartz P.J., Periti M., Malliani A. The long QT syndrome. *Am. Heart J.* 1975;89(3):378-390.
- Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131:861-872.
- Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126:663-676.