

ЕМБРІОНАЛЬНІ ТА ІНДУКОВАНІ ПЛЮРИПОТЕНТНІ СТОВБУРОВІ КЛІТИНИ ТА ЇХ ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ У НАПРЯМКУ КАРДІОМІОЦИТІВ В ПРИСУТНОСТІ ДМСО

Г.В. БУДАШ, Н.М. БІЛЬКО

Національний університет «Києво-Могилянська академія», Київ, Україна

E-mail: galina19@ukr.net, nbilko@ukma.kiev.ua

Трансплантація клітин це сучасна стратегія відновлення пошкоджених тканин серця. Одним з перспективних джерел отримання кардіоміоцитів є ембріональні стовбурові клітини (ЕСК) та індуковані плюрипотентні стовбурові клітини (ІПСК). Дослідження проводили на генетично модифікованих лініях ЕСК та ІПСК миші, які експресували зелений флуоресцентний протеїн (GFP) під контролем кардіоспецифічного α -MHC промотора; диференціювання здійснювали у суспензійній культурі з постійним перемішуванням. Вивчали вплив диметилсульфоксиду (ДМСО) на процеси диференціювання плюрипотентних стовбурових клітин у кардіоміоцити, як на етапі формування клітин мезодермального походження, так і на етапі формування попередників кардіоміоцитів. Визначили оптимальний термін для застосування ДМСО в культурі. Встановлено, що додавання ДМСО з 5-ї до 9-ї доби культивування підвищувало ефективність диференціювання у кардіоміоцити у півтора рази.

Ключові слова: ембріональні стовбурові клітини, індуковані плюрипотентні стовбурові клітини, кардіоміоцити, диметилсульфоксид, диференціювання.

Вступ. Зрілі кардіоміоцити постійно виходять з клітинного циклу і, як результат, не можуть регенерувати. Значні втрати кардіоміоцитів незворотні і призводять до розвитку прогресуючої серцевої недостатності. Серцеві патології займають провідне місце серед причин смертності дорослого населення. Новим терапевтичним підходом до вирішення цієї проблеми є збільшення кількості функціональних кардіоміоцитів в ослабленій ділянці серця шляхом імплантації міогенних клітин. Дослідження показали, що після інтеграції в зону інфаркту кардіоміоцити можуть диференціюватися і покращують роботу серця [1–3].

Найбільш перспективними джерелами отримання кардіоміоцитів є стовбурові клітини з плюрипотентними властивостями, а саме ембріональні стовбурові клітини (ЕСК) та ін-

дуковані плюрипотентні клітин (ІПСК). ЕСК були вперше виділені з внутрішньої клітинної маси бластоцисти миші [4]. Ці унікальні клітини характеризуються своєю здатністю проліферувати протягом тривалого періоду в культурі і диференціюватися в будь-який тип тканин в організмі. Одним з можливих джерел отримання плюрипотентних стовбурових клітин (ПСК), придатних для диференціювання в кардіоміоцити, є ІПСК, які були отримані Ш. Яманака в 2006 р. 4 транскрипційні фактори (сMyc, Oct 3/4, SOX 2, Klf 4) були застосовані для ретровірусної трансдукції фібробластів миші [5]. ІПСК подібні до ЕСК за морфологією, експресією генів, епігенетичним статусом генів, які відповідають за плюрипотентність клітин; вони можуть диференціюватися в клітини трьох зародкових шарів як *in vivo* так і *in vitro* [6]. Однією з суттєвих переваг застосування ІПСК є те, що вони можуть бути створені з власних клітин хворого [7], і можуть використовуватись в регенеративній медицині замість ЕСК без ризику відторгнення трансплантованих клітин імунною системою реципієнта. Їх створення не викликає етичних суперечок [8].

В дослідженнях, проведених на модельній лінії клітин P19, яка походить з клітин ембріональної карциноми, було показано, що застосування диметилсульфоксиду (ДМСО) значно меншої концентрації, ніж під час кріоконсервування, може впливати на процеси диференціювання ПСК в кардіоміоцити [9–11]. ДМСО – це амфіфільна молекула та один з найрозповсюдженіших розчинників для нерозчинних в воді речовин. ДМСО впливає на клітинний цикл та апоптоз, а отже може змінювати функціонування клітини (наприклад, впливати на метаболічні та ензиматичні процеси) та впливати на клітинний ріст [12]. Однак широке застосування ДМСО обмежене його токсичністю та побічними ефектами, які

© Г.В. БУДАШ, Н.М. БІЛЬКО, 2019

залежать від мішені застосування та концентрації самої речовини [13].

З літературних джерел відомо, що диференціювання плюрипотентних клітин в кардіоміоцити відбувається в 3 етапи: спочатку з плюрипотентні клітини диференціюються в клітини мезодермального напрямку, потім утворюються попередники кардіоміоцитів, згодом зрілі кардіоміоцити [3]. Більшість відомих протоколів застосування ДМСО в якості кардіогенного агента зосереджено на його дії в перші дні культивування ембріодних тілець (ЕТ) [10, 11]. Ряд дослідників підтвердили підвищення ефективності диференціювання в кардіоміоцити під час застосування ДМСО [12, 13]. Проте досі не встановлено механізм дії цієї молекули. Крім того мало відомо чи матиме позитивний ефект застосування ДМСО на етапі формування попередників кардіоміоцитів. Для дослідження ефекту від застосування цієї молекули, як на етапі формування клітин мезодермального походження, так і на етапі формування попередників кардіоміоцитів необхідно застосовувати ДМСО в різні часові проміжки. Тому з метою оптимізації умов культивування ЕСК та ІПСК було вирішено провести дослідження впливу ДМСО на ефективність їх диференціювання в кардіоміоцитарному напрямку.

Методика. Клітинні лінії. У роботі були використана лінія ІПСК миші AT25 та лінія ЕСК миші α PiG44. Лінія клітин AT25 була отримана з фібробластів кінчика хвоста миші під дією індукуючих факторів *c-myc*, *Klf4*, *Sox2*, *Oct4*, *Nanog* у лабораторії R. Jaenisch та A. Meissner (США) [14]. ЕСК лінія сконструйована в лабораторії E. Kolosov (Німеччина) [15]. Обидві лінії плюрипотентних стовбурових клітин були генетично модифіковані. Клітини експресували пуроміцин-N-ацетил-трансферазу та IRES-зв'язаний зелений флуоресцентний протеїн (GFP) під контролем кардіоспецифічного α -MHC промотора. Генетична модифікація була виконана A. Fatima в лабораторії T. Saric (Німеччина) [16]. Здатність кардіоміоцитів експресувати GFP під контролем кардіоспецифічного α MHC промотора дала нам змогу застосувати методи проточної цитофлуориметрії та флуоресцентної мікроскопії для

перевірки ефективності процесів диференціювання [14, 15].

Культивування та підтримання недиференційованого стану ЕСК та ІПСК. Культивування ліній стовбурових клітин і підтримку їх у недиференційованому стані проводили на фідерних клітинах MEF-Neo в середовищі, яке складалось з середовища DMEM (Invitrogen, Німеччина) з додаванням 15%-ної фетальної телячої сироватки (FBS, Invitrogen, Німеччина), 0,1 мМ амінокислот (NEAA, Invitrogen, Німеччина), 50 мкМ β -меркаптоетанолу (β -mercaptoethanol, Invitrogen, Німеччина), 1%-ного розчину антибіотиків пеніциліну-стрептоміцину (Invitrogen, Німеччина), та 1000 од./мл LIF (Leukemia Inhibitory factor, Millipore, США). Стовбурові клітини пасажували в розрахунку $0,5 \times 10^6$ клітин у 5 мл повного живильного середовища на 60 мм чашку Петрі з підложкою з фідерних клітин. Пасажування проводили кожні 2 доби. Одноклітинну суспензію отримували під дією 0,05%-ного трипсину (Trypsin-EDTA, Sigma, Німеччина). Підрахунок кількості життєздатних клітин виконували в гемоцитометрі за стандартною методикою. В якості гемоцитометра використовували камери Нойбауера.

Спосіб диференціювання ЕСК та ІПСК в кардіоміоцити в суспензійній культурі з постійним перемішуванням. Культивовані клітини промивали натрій-фосфатним буфером (Invitrogen, Німеччина), додавали 0,05 % Trypsin-EDTA і залишали у чашках Петрі в CO_2 інкубаторі за температури 37 °C на 5 хв. Процес відкріплення клітин від поверхні спостерігали під мікроскопом. Дію Trypsin-EDTA інактивували середовищем диференціювання з FBS. Суспензію ПСК переносили в центрифужні пробірки. Центрифугували 4 хв при 980 g. Надосадову рідину відбирали і ресуспендували клітини в 5 мл середовища диференціювання, яке складалось з ІМДМ (IMDM, Invitrogen, Німеччина) з додаванням 20 % FBS, 0,1 мМ NEAA, 50 мкМ β -меркаптоетанолу, 1%-ного розчину антибіотиків пеніциліну-стрептоміцину. 1×10^6 ЕСК або ІПСК ресуспендували в 14 мл середовища диференціювання і переносили в неадгерентні 100 мм чашки Петрі. Залишали для подальшого культивування з постійним перемішуванням в горизонтальному напрямку на шей-

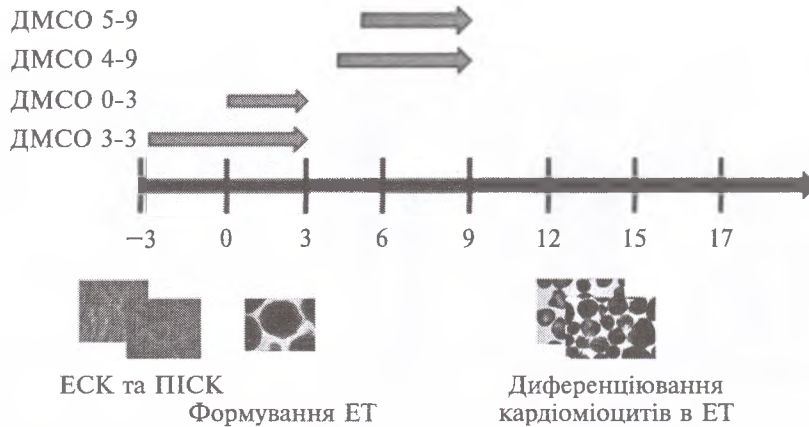


Рис. 1. Схема застосування ДМСО під час диференціювання ПСК в кардіоміоцити. Примітка: ЕТ – ембріонні тілця

кері (GFL 3006, GFL, Braunschweig, Німеччина) за температури 37 °С та 5 % CO₂ впродовж 2 діб для утворення ембріонних тілець.

Через дві доби сформовані ЕТ вивчали при збільшенні ×40 під світловим мікроскопом. ЕТ переносили в 50 мл центрифужні пробірки, промивали PBS і ресуспендували в живильному середовищі. Проводили підрахунок кількості отриманих ЕТ. В кожну нову 100 мм неджерентну чашку Петрі переносили 2000 ЕТ, розводили в 14 мл середовища диференціювання. Середовище культивування замінювали через 7 діб на 9-ту добу формування ЕТ.

Починаючи з 6-ї доби формування ЕТ кожен день вивчали під світловим та флуоресцентним мікроскопом. Спостерігали наявність ЕТ, що спонтанно скорочуються. Під флуоресцентним мікроскопом досліджували клітини, які експресують GFP під контролем кардіоспецифічного α -MHC промотора. Згідно з даних Е. Kolossov [15] кількість клітин, які експресували GFP відповідала кількості отриманих кардіоміоцитів. Після 9-ї доби від початку процесу диференціювання перевірку підрахунок ЕТ, що містять кардіоміоцити проводили кожної другої доби, на 9-ту, 11-ту, 13-ту, 15-ту та 17-ту добу диференціювання.

1 % ДМСО (DMSO, Invitrogen, Німеччина) використовували за такими схемами (рис. 1): схема 1 – з 1-ї до 3-ї доби формування ембріонних тілець, схема 2 – за 3 доби до початку формування ембріонних тілець до 3-ї доби диференціювання, схема 3 – з 4-ї

доби диференціювання плюрипотентних клітин до 9-ї доби, схема 4 – з 5-ї до 9-ї доби диференціювання.

Визначення ефективності диференціювання методом проточної цитофлуориметрії. Аналіз ефективності диференціювання у кардіоміоцити проводили на проточному цитофлуориметрі FACScan (Becton Dickinson). В центрі кожної чашки Петрі концентрували ЕТ. В центрифужні пробірки об'ємом 15 мл переносили аліквоту об'ємом 1000 мкл суспензії ЕТ, промивали PBS. Додавали 1 мл 0,25 % Trypsin-EDTA і залишали на 20 хв в CO₂ інкубаторі за температури 37 °С. Для інактивації дії Trypsin-EDTA додавали середовище диференціювання з FBS. Центрифугували 4 хв при 980 g. Ресуспендували одноклітинну суспензію в 2 мл CellWash (Becton Dickinson, США). Для проточної цитофлуориметрії, безпосередньо перед використанням, одноклітинну суспензію, отриману з ЕТ, фільтрували з метою очищення від агрегатів клітин. Використовували фільтри розміром 70 мкм (Falcon, Німеччина). Вивчали популяцію з 1×10^5 клітин.

Для аналізу даних виділяли популяцію лише життєздатних клітин. Наявність нежиттєздатні клітини визначали за кількістю клітин забарвлених пропідієм йодидом (Propidium iodide, Sigma, Німеччина), який проникає через зруйновані мембрани клітин і забарвлює нежиттєздатні клітини, в той час як мембрани життєздатних клітин є непроникними для барвника. Використовували програмне забезпечен-

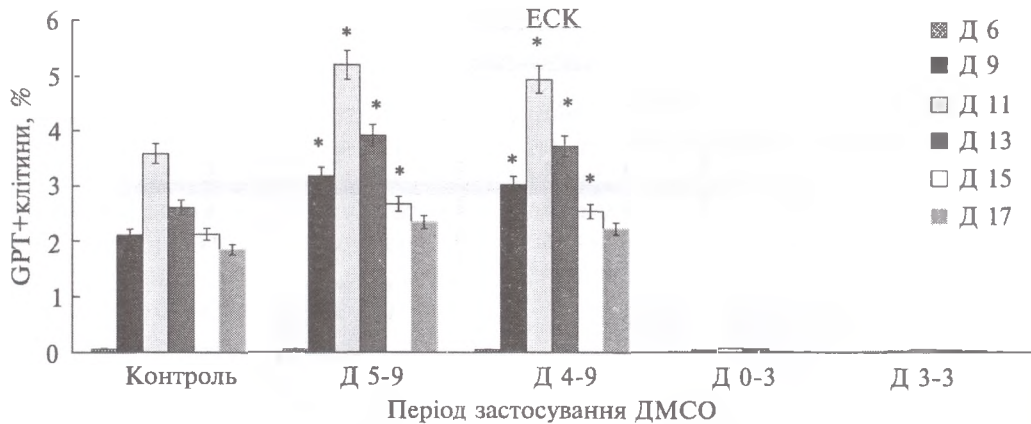


Рис. 2. Ефективність диференціювання ЕСК в кардіоміоцити з додаванням ДМСО. Д – доба культивування. Статистичну достовірність визначали на рівні $P < 0,05$

ня FSC Express 4 Flow Research Edition (DeNovo Software, США).

Морфологічне дослідження і прямий підрахунок кількості ЕТ, що скорочуються, проводили за стандартними методиками світлової та флуоресцентної мікроскопії. Використовували мікроскоп Axiovert 10 (ZEISS, Germany) з об'єктивами зі збільшенням $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$.

Кожен експеримент проводили тричі в трьох повторах. Цифрові дані аналізували з використанням програмного забезпечення Microsoft Office Excel 2007. Достовірність середніх значень двох сукупностей визначали за допомогою критерію Стьюдента, статистичну достовірність визначали на рівні $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення. *Результати впливу ДМСО на процес диференціювання ЕСК.* Дослідження проводили на генетичномодифікованих лініях ЕСК та ІПСК миші, які під контролем кардіоспецифічного α -МНС-промотора експресували зелений флуоресцентний протеїн (GFP – green fluorescent protein). Оскільки експресія GFP корелює з ступенем експресії кардіоспецифічних маркерів, то даний параметр можна було використати для кількісного визначення утворених кардіоміоцитів методами проточної цитофлуориметрії та флуоресцентної мікроскопії [15].

Процес диференціювання плюрипотентних клітин в кардіоміоцити відбувається в три етапи. З плюрипотентних клітин утворюються поліпотентні клітини мезодермального походження, які диференціюються у попередники

кардіоміоцитів, а згодом – у зрілі кардіоміоцити [3]. Для того, щоб визначити, чи вплине ДМСО на диференціювання плюрипотентних клітин в мезодермальном напрямку ДМСО додавали з 1-ї до 3-ї доби формування ЕТ, а також за 3 доби до початку формування ЕТ до 3-ї доби культивування. Для того, щоб перевірити дію ДМСО на етапі формування попередників кардіоміоцитів індуктор додавали з 4-ї доби диференціювання плюрипотентних клітин до 9-ї доби диференціювання та з 5-ї до 9-ї доби диференціювання. В контрольних умовах культивування ПСК проводили без додавання факторів.

Перші клітини, що експресували GFP (GFP+ клітини) фіксували під флуоресцентним мікроскопом та методом проточної цитофлуориметрії з 6-ї доби диференціювання. Ритмічне скорочення ЕТ фіксували з 8-ї доби диференціювання. Спонтанне ритмічне скорочення клітин в культурі *in vitro* разом з експресією флуоресцентного білку під контролем промотора, специфічного лише для кардіоміоцитів, є підтвердженням диференціювання саме в кардіоміоцитарному напрямку. Максимальну кількість GFP+ клітин фіксували на 11-ту добу диференціювання. Вона становила 5,21 % кардіоміоцитів.

Починаючи з 13-ї доби диференціювання кількість клітин, які експресували GFP, поступово зменшувалась. Вимірювання проводили до 17-ї доби культивування. Культуру диференційованих кардіоміоцитів продовжували культиву-

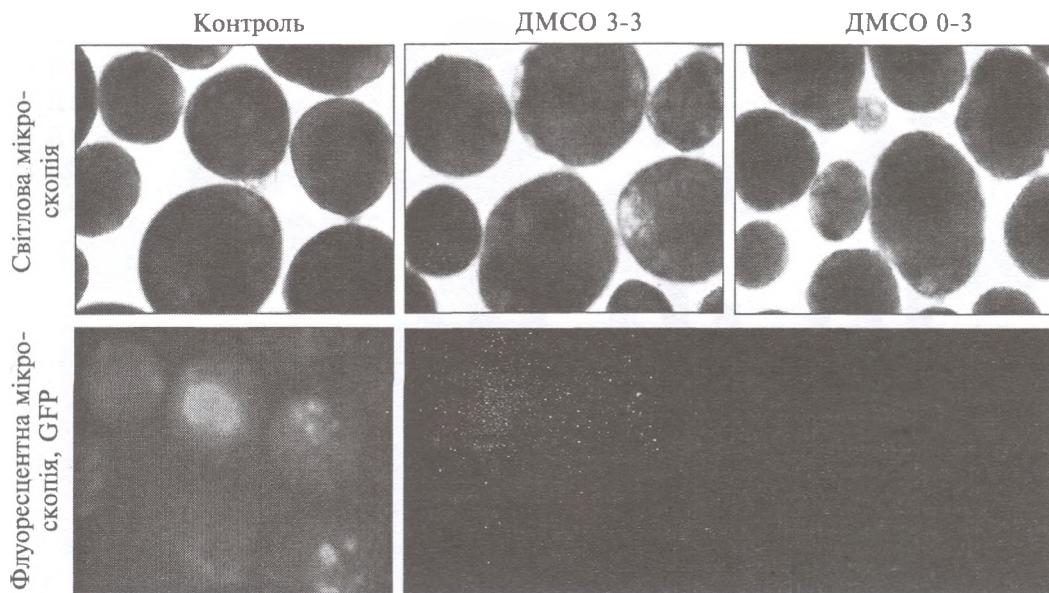


Рис. 3. Пригнічення диференціювання ЕСК в кардіоміоцити на 9-ту добу диференціювання, флуоресцентна мікроскопія. Експресії GFP спостерігалась лише в контрольних умовах, без додавання ДМСО, збільшення $\times 200$. Д – доба культивування

увати протягом двох місяців. Ритмічне спонтанне скорочення клітин фіксували впродовж всього терміну дослідження. Однак з часом швидкість скорочення кардіоміоцитів зменшувалась.

Найбільш ефективним виявилось диференціювання ЕСК під дією ДМСО, який додавали з 5-ї до 9-ї доби диференціювання (рис. 2).

На 9-ту добу диференціювання утворювалось в півтори рази більше кардіоміоцитів в середовищі з додаваннями ДМСО в порівнянні з контролем. Кількість диференційованих клітин з додаванням ДМСО становила $3,20 \pm 0,02$ % GFP+клітин, а в контролі лише $2,12 \pm 0,01$ %. На 11-ту та 13-ту добу диференціювання отримували в 1,4 та 1,5 рази більше кардіоміоцитів з додаванням ДМСО відповідно. Кількість диференційованих клітин становила $5,20 \pm 0,03$ % на 11-ту добу та $3,90 \pm 0,01$ % на 13-ту добу в середовищі з додаванням ДМСО в порівнянні з $3,50 \pm 0,02$ % та $2,60 \pm 0,01$ % відповідно в контролі. На 15-ту та 17-ту добу диференціювання кількість кардіоміоцитів була в 1,2 рази більшою і становила $2,60 \pm 0,01$ % та $2,30 \pm 0,01$ % на 15-ту та 17-ту доби диференціювання в умовах додавання ДМСО та $2,10 \pm 0,1$ % та $1,80 \pm 0,01$ % в контрольних експериментах.

Додавання ДМСО, починаючи з 4-ї доби культивування також сприяло більш ефективному виходу кардіоміоцитів у порівнянні з контролем, водночас було достовірно меншим ніж під час додавання ДМСО з 5-ї доби диференціювання. В середньому кількість кардіоміоцитів була в 1,3 рази більшою ніж в контролі. На 9-ту добу диференціювання під час додавання ДМСО з 4-ї доби диференціювання отримували $3,04 \pm 0,04$ %, що в 1,4 рази більше ніж в контролі. На 11-ту добу за цією схемою отримали $4,95 \pm 0,05$ % кардіоміоцитів, на 13-ту – $3,74 \pm 0,04$ %, на 11-ту – $2,50 \pm 0,01$ %, а на 17-ту було зафіксовано $2,20 \pm 0,02$ % клітин, що експресували GFP.

Додавання ДМСО на ранніх етапах диференціювання ЕСК майже повністю пригнічувало диференціювання плюрипотентних клітин в кардіоміоцити. На 2-гу добу утворенні ЕТ були менші за розмірами, ніж ЕТ отримані в контрольних експериментах без додавання будь-яких факторів. До 17-ої доби диференціювання ЕТ збільшувались в розмірах, однак були неправильної форми та мали значно більші ділянки нежиттєздатних клітин. Скорочення та експресія GFP спостерігалась лише в окремих поодиноких ЕТ (рис. 3).

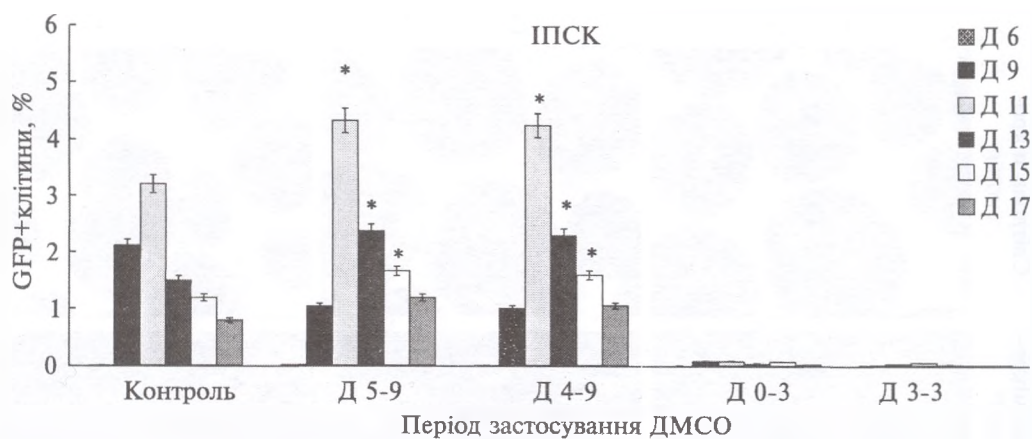


Рис. 4. Ефективність диференціювання ІПСК в кардіоміоцити з додавання ДМСО. Д – доба культивування. Статистичну достовірність визначали на рівні $P < 0,05$

Результати впливу ДМСО на процес диференціювання ІПСК. Умови культивування ІПСК були такими самими як і під час культивування ЕСК: ДМСО додавали в живильне середовище за 3 доби до початку диференціювання до 3-ї доби диференціювання, з 1-ї до 3-ї доби, з 4-ї або 5-ї доби диференціювання до 9-ї доби.

Додавання ДМСО з 5-ї до 9-ї доби до культури ІПСК сприяло отриманню більшої кількості кардіоміоцитів. Перші поодинокі клітини, що експресують GFP, спостерігали на 6-ту добу диференціювання, однак на відміну від ЕСК спонтанно ритмічно скорочувались ЕТ починали з 7-ї доби диференціювання. На 9-ту добу диференціювання більше кардіоміоцитів було виміряно в контрольних експериментах, їх кількість становила $2,12 \pm 0,02 \%$ проти $1,05 \pm 0,01 \%$ в умовах додавання ДМСО (рис. 4).

Проте вже починаючи з 11-ї доби диференціювання більшу кількість кардіоміоцитів отримували в умовах додавання ДМСО в порівнянні з контролем. На 11-ту добу було отримано в 1,35 рази більше диференційованих клітин, а саме $4,33 \pm 0,05 \%$ під час додавання ДМСО в порівнянні з $3,20 \pm 0,04 \%$ без додавання фактору. Найбільша різниця з контролем спостерігалась на 13-ту добу диференціювання, і вона становила 1,57 разів. Однак кількість кардіоміоцитів отримана на 13-ту добу була меншою ніж на 11-ту і становила $2,38 \pm 0,02 \%$ в середовищі з додаванням ДМСО і $1,51 \pm 0,01 \%$ без додавання фактору. На

15-ту та 17-ту добу кількість отриманих диференційованих клітин була в 1,39 та 1,50 разів більшою під час додавання фактору. Було отримано $1,67 \pm 0,02 \%$ та $1,20 \pm 0,01 \%$ GFP+ клітин з додаванням ДМСО проти $1,20 \pm 0,01 \%$ та $0,80 \pm 0,01 \%$ клітин в контролі.

Додавання ДМСО у період з 4-ї до 9-ї доби диференціювання також сприяло збільшенню кількості отриманих кардіоміоцитів, однак було меншим ніж під час додавання ДМСО з 5-ї до 9-ї доби диференціювання. На 9-ту добу диференціювання було отримано лише $1,01 \pm 0,01 \%$ кардіоміоцитів, що було менше ніж в контролі, однак починаючи з 11-ї доби диференціювання більшу кількість кардіоміоцитів отримували з додавання ДМСО: $4,24 \pm 0,05 \%$ диференційованих клітин з додаванням ДМСО до середовища диференціювання на 4-ту добу проти $3,20 \pm 0,02 \%$ в контрольних експериментах, що становило в 1,32 рази більше GFP+клітин ніж в контролі. Під час наступного вимірювання, яке проводили на 13-ту добу диференціювання, отримували в півтора рази більше кардіоміоцитів, а саме $2,30 \pm 0,02 \%$ проти $1,51 \pm 0,01 \%$ в контролі. В наступні дні на 15-ту та 17-ту добу культивування спостерігали в 1,33 рази більше кардіоміоцитів. Кількість диференційованих клітин становила $1,60 \pm 0,01 \%$ та $1,06 \pm 0,01 \%$ відповідно проти $1,20 \pm 0,01 \%$ та $0,80 \pm 0,01 \%$ в контролі без додавання факторів.

Додавання ДМСО під час диференціювання ІПСК на ранніх етапах, так само як і під час ди-

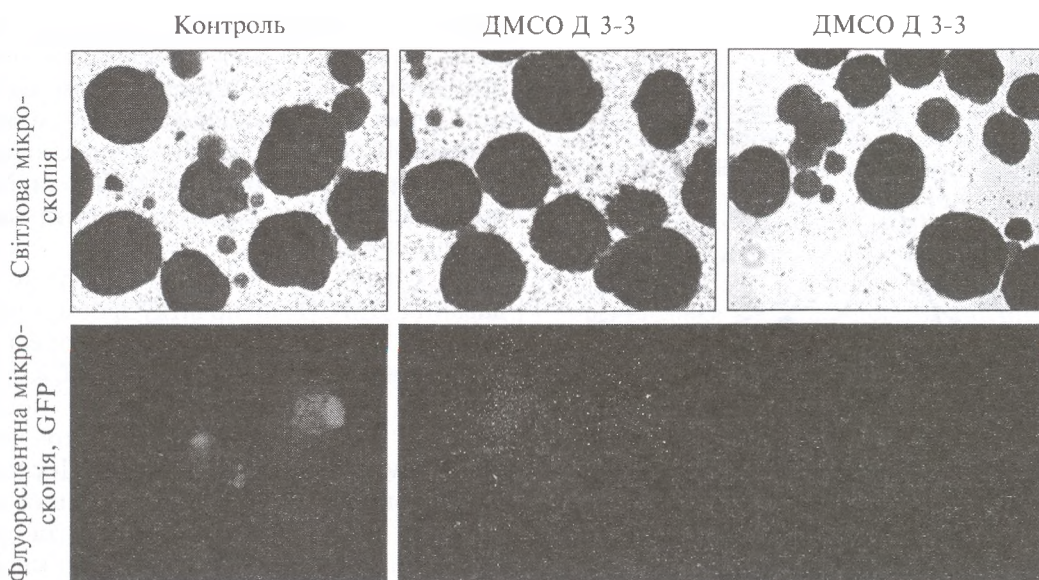


Рис. 5. Пригнічення диференціювання ІПСК в кардіоміоцити на 15-ту добу диференціювання, флуоресцентна мікроскопія. Експресії GFP спостерігалась лише в контрольних умовах, без додавання ДМСО, збільшення $\times 200$. Д – доба культивування

диференціювання ЕСК, повністю пригнічувалось (рис. 5).

На 2-гу добу культивування розміри ЕТ були меншими у порівнянні з ЕТ отриманими в контрольних експериментах. Незначні рівні флуоресценції GFP вимірювали під час додавання ДМСО в перші три доби диференціювання. Спонтанне скорочення ділянок ЕТ спостерігалось лише в поодиноких ЕТ.

Порівняльне вивчення здатності до диференціювання ЕСК та ІПСК в умовах додавання ДМСО. Максимальну кількість кардіоміоцитів отримували при диференціюванні як ІПСК та і ЕСК на 11-ту добу культивування з додаванням ДМСО в середовище культивування у період з 5-ї до 9-ї доби культивування. Однак під час диференціювання ЕСК отримували більше кардіоміоцитів ніж під час диференціювання ІПСК за тих самих умов (рис. 6).

Такі результати спостерігаються як під час диференціювання з додаванням фактору, які сприяють диференціюванню так і без додавання будь-яких речовин. Однак додавання ДМСО з 5-ї до 9-ї доби культивування зменшувало цю різницю в порівнянні з даними контролю. На 9-ту добу диференціювання отримували однаково кількість кардіоміоцитів в контрольних

умовах під час диференціювання ІПСК та ЕСК ($2,12 \pm 0,02$ % в обох випадках), однак в умовах з додаванням ДМСО визначили в три рази більше кардіоміоцитів з лінії ЕСК ніж з ІПСК ($3,20 \pm 0,02$ % диференційованих клітин проти $1,05 \pm 0,01$ % з ІПСК), на 11-ту добу диференціювання кількість диференційованих клітин, отриманих з ЕСК, була лише 1,12 рази більшою ніж з ІПСК ($3,59 \pm 0,03$ % проти $3,20 \pm 0,02$ %), в умовах додавання ДМСО різниця становила 1,2 рази ($5,21 \pm 0,05$ % GFP+клітин з лінії ЕСК та $4,33 \pm 0,05$ % з лінії ІПСК). Однак вже на 13-ту добу диференціювання різниця в кількості отриманих клітин становила 1,72 рази, в умовах застосування ДМСО різниця зменшилась до 1,66 разів. З лінії ЕСК було отримано $3,94 \pm 0,02$ % диференційованих клітин з додаванням ДМСО і $2,61 \pm 0,03$ % в контрольних умовах, а з лінії ІПСК – $2,38 \pm 0,02$ % диференційованих клітин з додаванням ДМСО та $1,51 \pm 0,01$ % без додавання фактору. На 15-ту та 17-ту добу диференціювання різниця в кількості отриманих кардіоміоцитів поступово збільшувалась з 1,78 раз до 2,31 раз. Додавання ДМСО зменшувало різницю до 1,61 та 1,97 раз. Тобто на 15-ту добу диференціювання в контрольних умовах

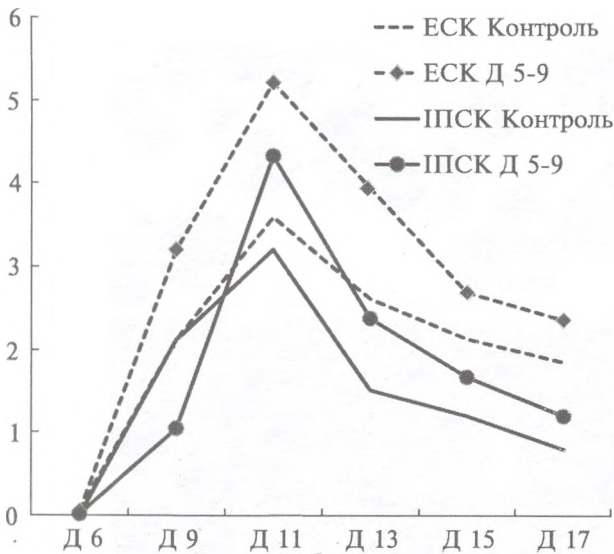


Рис. 6. Диференціювання ЕСК та ІПСК за умов додавання ДМСО з 5-ї до 9-ї доби диференціювання та без додавання ДМСО; по горизонталі – період культивування; по вертикалі – кількість GFP+клітин, %. Д – доба культивування

було отримано $2,13 \pm 0,02$ % GFP+клітин з ЕСК та $1,20 \pm 0,01$ % клітин з ІПСК, в умовах додавання ДМСО отримали $2,69 \pm 0,03$ % та $2,13 \pm 0,02$ % відповідно. Тоді як на 17-ту добу диференціювання отримували $1,85 \pm 0,01$ % клітин, що експресували GFP з ЕСК та $0,80 \pm 0,01$ % з ІПСК, а додавання ДМСО збільшило кількість отриманих кардіоміоцитів до $2,36 \pm 0,01$ % (отриманих з ЕСК) та $1,85 \pm 0,01$ % (отриманих з ІПСК).

Механізми впливу ДМСО на процеси культивування клітин досі залишаються невідомими. Проте, за даними Р.А. Marks та співавторів ДМСО може мати здатність інгібувати дію гістонових деацетилаз, перетворювати та зберігати хроматин в менш компактному стані, що робить гени більш доступними для процесів транскрипції [17]. За даними R.W. Johnston додавання ДМСО в концентрації більшій, ніж коли ця речовина додається до середовища в якості розчинника, гіпотетично може підвищувати рівень експресії генів, які симулюють процеси диференціювання. Отже ДМСО позитивно впливає на механізм транскрипції генів, відповідальних за процес формування зародкових шарів і додатково може

прямо або опосередковано покращувати ефективність процесів диференціювання певних типів клітин. Під час диференціювання плюрипотентних стовбурових клітин малі концентрації ДМСО пригнічують експресію таких генів плюрипотентності як OCT4 та NANOG, що в свою чергу сприяє запуску процесів диференціювання [18].

К. Chetty та співавтори показали, що додавання ДМСО до початку формування ембріонних тілець та початку процесів диференціювання, в деяких лініях ЕСК та ІПСК людини підвищує ефективність подальшого процесу диференціювання в екто-, ендо- та мезодермальному напрямках. Дослідниками було показано, що додавання цієї сполуки активує білок ретинобластоми та збільшує кількість клітин в G1 фазі клітинного циклу, що може означати готовність клітин до проліферації та набуття певного фенотипу [19]. Натомість, аналіз результатів нами проведених досліджень свідчить, що додавання ДМСО за три дні до початку формування ембріонних тілець повністю пригнічує диференціювання в напрямку кардіоміоцитів, в той час як додавання ДМСО з 4-ї до 9-ї доби призводить до підвищення ефективності процесу кардіогенезу. Наші дані співставні результатам, опублікованим в роботі К. Cysz, яка вважає, що механізм дії ДМСО може бути незалежним від контрольних точок клітинного циклу. На її думку ДМСО пригнічує експресію генів плюрипотентності вже після того, як були запущені механізми диференціювання клітин [20].

В результаті проведеної роботи було показано, що додавання в культуральне середовище 1 % ДМСО на етапі формування не лише поліпотентних клітин мезодермального походження, а і саме формування клітин-попередників кардіоміоцитів сприяє диференціюванню плюрипотентних стовбурових клітин в кардіоміоцитарному напрямку. Проте додавання ДМСО на ранніх етапах розвитку (до початку формування ЕТ) пригнічує процес диференціювання. Таким чином, ДМСО, незважаючи на його токсичність, доцільно використовувати у малих дозах (до 1 %) для оптимізації умов культивування і накопичення кардіоміоцитів для подальшої трансплантації. До-

давання ДМСО до середовища слід починати не раніше 5-ї доби культивування. Однак перш ніж застосовувати ДМСО в терапевтичних цілях слід провести дослідження молекулярних механізмів впливу даної хімічної сполуки на процеси клітинного диференціювання та токсичності застосування малих доз ДМСО на організм в цілому.

EMBRYONIC AND INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS AND THEIR DIFFERENTIATION TOWARDS CARDIOMYOCYTES IN PRESENCE OF DMSO

H.V. Budash, N.M. Bilko

National University of «Kyiv-Mohyla Academy», Kyiv, Ukraine
E-mail: galina19@ukr.net

Cell transplantation is a modern strategy for injured heart tissue regeneration. One of promising sources of cardiomyocytes is embryonic stem cells (ESCs) and induced pluripotent stem cells (iPSCs). Genetically modified murine ESC and iPSC expressing green fluorescent protein (GFP) under the control of a cardio specific α -MHC promoter were used for the research; differentiation was carried out in the suspension culture with constant stirring. The effect of dimethylsulfoxide (DMSO) on the processes of differentiation of pluripotent stem cells into cardiomyocytes was studied both at the stage of mesoderm cells formation and at the stage of the cardiomyocytes progenitors formation. Optimal term of DMSO application into the culture was determined. It was established that the addition of DMSO from the 5th to the 9th day of cultivation increased the efficiency of cardiomyocytes differentiation by one and a half times.

ЭМБРИОНАЛЬНЫЕ И ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ И ИХ ДИФФЕРЕНЦИРОВАНИЕ В НАПРАВЛЕНИИ КАРДИОМИОЦИТОВ В ПРИСУТСТВИИ ДМСО

Г.В. Будаш, Н.М. Билько

Трансплантация клеток это современная стратегия восстановления поврежденных тканей сердца. Одним из перспективных источников получения кардиомиоцитов являются эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК). Исследования проводились на генетически модифицированных линиях ЭСК и ИПСК мыши, которые экспрессировали зеленый флуоресцентный протеин (GFP) под контролем кардиоспецифического α -МНС промотора; дифференцирование осуществляли в су-

спензионной культуре с постоянным перемешиванием. Изучали влияние диметилсульфоксида (ДМСО) на процессы дифференцирования плюрипотентных стволовых клеток в кардиомиоциты, как на этапе формирования клеток мезодермального происхождения, так и на этапе формирования предшественников кардиомиоцитов. Определили оптимальный срок для применения ДМСО в культуре. Установлено, что добавление ДМСО с 5-го до 9-го дня культивирования повышало эффективность дифференцировки в кардиомиоциты в полтора раза.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Soonpaa, M.H., Koh, G.Y., Klug, M.G., and Field, L.J., Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium, *Science*, 1994, vol. 264, no. 5155, pp. 98–101. doi: 10.1126/science.8140423.
2. Leor, J., Patterson, M., Quinones, M.J., Kedes, L.H., and Kloner, R.A., Transplantation of fetal myocardial tissue into the infarcted myocardium of rat. A potential method for repair of infarcted myocardium? *Circulation*, 1996, vol. 94, no. 9, pp. 332–336.
3. Kehat, I., Kenyagin-Karsenti, D., Snir, M., Segev, H., Amit, M., Gepstein, A., Livne, E., Binnah, O., Itskovitz-Eldor, J., and Gepstein, L., Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes, *J. Clin. Invest.*, 2001, vol. 108, no. 3, pp. 407–414. doi:10.1172/JCI12131.
4. Evans, M.J., Kaufman, M.H., Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos, *Nature*, 1981, vol. 292, pp. 154–156.
5. Takahashi, K., Yamanaka, S., Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell*, 2006, vol. 126, pp. 663–676. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024
6. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S., Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, *Cell*, 2007, vol. 131, no. 5, pp. 861–72. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019
7. Ebben, J.D., Zorniak, M., Clark, P.A., and Kuo, G.S., Introduction to induced pluripotent stem cells: advancing the potential for personalized medicine, *World Neurosurg.*, 2011, vol. 76, no. 3–4, pp. 270–5. doi: 10.1016/j.wneu.2010.12.055.
8. Vitalea, A. M., Wolvetang, E., Mackay-Sima, A. Induced pluripotent stem cells: A new technology to study human diseases, *Int. J. Biochem. Cell Biology*, 2011, vol. 43, 843–46. doi: 10.1016/j.biocel.2011.03.013.
9. Jasmin, Spray, D.C., Campos de Carvalho, A.C., and Mendez-Otero, R., Chemical induction of car-

- diac differentiation in P19 embryonal carcinoma stem cells, *Stem. Cells Dev.*, 2010, vol. 19, no. 3, pp. 403–411. doi: 10.1089/scd.2009.0234.
7. Inamdar, M.S., Venu, P., Srinivas, M.S., Rao K., and VijayRaghavan, K., Derivation and characterization of two sibling human embryonic stem cell lines from discarded grade III embryos, *Stem. Cells Dev.*, 2009, vol. 18, no. 3, pp. 423–33. doi: 10.1089/scd.2008.0131.
 8. van der Heyden, M.A., Defize, L.H., Twenty one years of P19 cells: what an embryonal carcinoma cell line taught us about cardiomyocyte differentiation, *Cardiovasc Res*, 2003, vol. 58, no. 2, pp. 292–302.
 9. Santos, N.C., Figueira-Coelho, J., Martins-Silva, J., and Saldanha, C., Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects, *Biochem, Pharmacol*, 2003, vol. 65, no. 7, pp. 1035–41.
 10. Pal, R., Mamidi, M.K., Das, A.K., and Bhonde, R., Diverse effects of dimethyl sulfoxide (DMSO) on the differentiation potential of human embryonic stem cells, *Arch Toxicol.*, 2012, vol. 86, no. 4, pp. 651–61. doi: 10.1007/s00204-011-0782-2.
 11. Meissner, A., Wernig, M., and Jaenisch, R., Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells, *Nat. Biotechnol.*, 2007, vol. 25, no. 10, pp. 1177–81. doi: 10.1038/nbt1335
 12. Kolossov, E., Bostani, T., Roell, W., Breitbach, M., Pillekamp, F., Nygren, J.M., Sasse, P., Rubenchik, O., Fries, J.W., Wenzel, D., Geisen, C., Xia, Y., Lu, Z., Duan, Y., Kettenhofen, R., Jovinge, S., Bloch, W., Bohlen, H., Welz, A., Hescheler, J., Jacobsen, S.E., and Fleischmann, B.K., Engraftment of engineered ES cell-derived cardiomyocytes but not BM cells restores contractile function to the infarcted myocardium, *J. Exp. Med.*, 2006, vol. 203, pp. 2315–27. doi: 10.1084/jem.20061469.
 13. Fatima, A., Xu, G., Nguemo, F., Kuzmenkin, F., Burkert, K., Hescheler, J., and Šarič, T., Murine transgenic iPS cell line for monitoring and selection of cardiomyocytes, *Lab Resource: Stem Cell Line*, 2016, vol. 17, no. 2, pp. 266–72. doi: 10.1016/j.scr.2016.07.007.
 14. Marks, P.A., Breslow, R., Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug, *Nat. Biotechnol.*, 2007, vol. 25, no. 1, pp. 84–90. doi: 10.1038/nbt1272.
 15. Johnstone, R.W., Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer, *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 2002, vol. 1, no. 4, pp. 287–99. doi: 10.1038/nrd772.
 16. Chetty, S., Pagliuca, F.W., Honore, C., Kweudjeu, A., Rezaia, A., and Melton, D.A., A simple tool to improve pluripotent stem cell differentiation, *Nat Methods*, 2013, vol. 10, no. 6, pp. 553–6. doi: 10.1038/nmeth.2442.
 17. Czysz, K., Minger, S., and Thomas, N., DMSO efficiently down regulates pluripotency genes in human embryonic stem cells during definitive endoderm derivation and increases the proficiency of hepatic differentiation, *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 2, pp. 1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0117689.

Надійшла 11.04.18