

Ембріоїдні тілця – ефективна модель диференціювання плюрипотентних стовбурових клітин в кардіоміоцитарному напрямку



Будаш Г. В., Білько Д. І.

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

Плюрипотентні стовбурові клітини мають властивість до самовідновлення та диференціювання в клітини трьох зародкових шарів. Одним з основних методів їх диференціювання є отримання ембріоїдних тілець. Ембріоїдні тілця – це тривимірні агрегати клітин, які нагадують ранні етапи розвитку ембріона. Формування ембріоїдних тілець впливає на процес диференціювання та проліферації клітин всередині агрегатів. Відомо, що розмір ембріоїдних тілець впливає на ефективність та спрямування процесу диференціювання плюрипотентних клітин. Тому важливим є контроль розміру утворених ЕТ у культурі клітин *in vitro* та забезпечення умов відтворення цього процесу.

Серце дорослої людини складається переважно з повністю диференційованих кардіоміоцитів. Клітини, які втрачаються з віком та внаслідок перенесених серцево-судинних захворювань, не можуть бути замінені новоутвореними. Отримання великої кількості кардіоміоцитів є необхідним для вирішення задач фундаментальної біології, фармацевтичної промисловості та регенеративної медицини. Кардіоміоцити, ефективність та безпека застосування яких перевірені та досліджені, є необхідною умовою для розвитку клітинної терапії. Одним з джерел отримання кардіоміоцитів є плюрипотентні стовбурові клітини. Відповідно до концепції трьох R дослідники прагнуть розробити нові моделі, які дозволять скоротити кількість досліджень з використанням живих тварин. Особливо це має значення для клінічних випробувань, де кількість використаних тварин є значною. Тому спостерігається значний попит та необхідність в розробці нових тривимірних моделей культури тканин, які можуть імітувати розвиток ембріона або давати можливість дослідити різні етапи процесу диференціювання клітин. Тривимірні моделі є значно кращими, ніж використання моношарових культур, адже під час їх формування відбувається утворення міжклітинного матриксу та формування міжклітинних взаємодій в більш природній спосіб, ніж в штучних умовах формування моношарових культур. В даний час найбільш популярним методом отримання тривимірних клітинних культур є агрегація клітин у сфероїди. Одним з таких методів є утворення ембріоїдних тілець.

В роботі була використана генетично модифікована лінія індукованих плюрипотентних клітин миші, отримана з фібробластів кінчика хвоста миші під дією індукуючих факторів c-myc, Klf4, Sox2, Oct4, Nanog. Клітини експресували пуроміцин-N-ацетил-трансферазу та IRES-зв'язаний зелений флуоресцентний протеїн (GFP) під контролем кардіоспецифічного α -MHC промотора. Для отримання гомогенних ЕТ певного визначеного розміру було застосовано спеціальні планшети, які дають можливість отримати ЕТ, які складаються з визначеної кількості клітин. Розмір сформованих ЕТ залежав від щільності посіву (250, 500, 750, 1000 та 2000 клітин) та суттєво впливав на ефективність диференціювання. Щільність посіву плюрипотентних стовбурових клітин в кількості 500 клітин виявилась оптимальною для отримання кардіоміоцитів з ЕТ. Цей феномен може бути пов'язаним з співвідношенням площі поверхні, вкритої ендодермальними клітинами, та шаром мезодермальних клітин в ЕТ, дифузії розчинних молекул та міжклітинною адгезією.

Біологічні властивості мезенхімальних стовбурових клітин Вартонового студня при культивуванні в газових сумішах з фізіологічними концентраціями кисню



Шувалова Н. С.¹, Топорова О. К.^{1,2}

¹ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН», Київ, Україна

²Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, Україна

Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) на сьогоднішній день вважаються перспективним інструментом клітинної терапії. Важливим об'єктом для дослідження у даній галузі є МСК Вартонового студня (МСК-ВС) пупкового канатика, через етичні причини та унікальні імунomodulatory та паракринні властивості.

Особливістю МСК, незалежно від джерела походження, є їх локалізація в ділянках тканини із зниженим вмістом кисню. Таким чином, загальноприйняті умови культивування є «гіпероксичними» для МСК, і є джерелом оксидативних пошкоджень, що призводять до старіння та втрати клітинами терапевтично значущих рис в процесі культивування. Численні дослідження показали, що культивування в умовах фізіологічних концентрацій кисню підвищує потенціал проліферації МСК та сповільнює їх старіння. Важливим методом збереження клінічно значущих властивостей МСК, що дозволяє розширити їх терапевтичний потенціал, є генетична модифікація МСК: трансдукція або трансфекція цільовими генами за допомогою різних вірусних або плазмідних конструкцій. Об'єднанню цих важливих технологічних засобів і присвячена доповідь.

Метою наших досліджень була оптимізація та дослідження ефектів культивування МСК-ВС при фізіологічних концентраціях кисню, у різних газових сумішах: на основі азоту та на основі інертного газу аргону, який, за відомими з літератури даними, має цитопротекторні властивості. Було показано, що МСК-ВС, культивовані при 3 % кисню, в обох сумішах мають вищий проліферативний потенціал та більш ефективно зберігають характерні морфологічні особливості МСК при субкультивуванні. Також було показано, що ефекти сумішей децю відрізнялись залежно від особливостей субкультивування культури. ➡