

# Роль жорсткості підложки для підтримки плюрипотентності ембріональних стовбурових клітин у культурі *in vitro*

Д.І. Білько<sup>1</sup>, Ю.Б. Чайковський<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Національний університет «Києво-Могилянська академія», Київ; e-mail: comraduk@yahoo.co.uk

<sup>2</sup>Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, Київ

*Ембріональні стовбурові клітини миші (ЕСКм) в умовах культивування in vitro за наявності LIF (лейкемієінгібіторний фактор) підтримують плюрипотентність, проте при його вилученні (в разі заміни живильного середовища) наступає активне диференціювання у різні спеціалізовані соматичні клітини. Метою нашого дослідження було визначення ролі жорсткості підложки для підтримки плюрипотентності ЕСКм у культурі in vitro. Для реалізації цієї задачі були використані: метод культивування in vitro, метод «висячої краплі», визначення модуля Юнга для поліакриламідного гелю різної жорсткості, імуноцитохімічний лужно-фосфатазний стрептавідин-біотинний метод (LSAB-AP), мікроскопія. В результаті культивування ЕСКм на підложках з поліакриламідного гелю м'якої, середньої і жорсткої щільності (0,8, 4,0, 8,0 кПа) виявилось, що на м'якому гелі, навіть при відсутності LIF, диференціювання не відбувається, клітини продовжують проявляти ознаки плюрипотентності, а саме створюють шароподібні колонії з високою активністю лужної фосфатази і формують ембріодні тільця, які виявляються методом «висячої краплі». ЕСК, культивовані на м'якому субстраті, утворювали ембріодні тільця, ефективність яких становила  $87,5 \pm 3,2$  на 100 посаджених клітин і не зменшувалася навіть при вилученні LIF. Проте без LIF стовбурові клітини, культивовані на жорсткій основі демонстрували низький рівень формування ембріодних тілець ( $23,5 \pm 2,24$ ). Результати спостережень переконливо демонструють той факт, що процес формування ембріодних тілець з ЕСК пов'язаний не тільки з наявністю комплексу факторів у живильному середовищі, але й із складною взаємодією фізичних сил матриксу і механічних властивостей 3D-клітинних агрегатів. Модель розглядається як спосіб дослідження ранніх подій у ембріогенезі на шляху пошуків умов для накопичення клітин-попередників і диференційованих клітин для трансплантацій.*

*Ключові слова:* плюрипотентність; ембріональні стовбурові клітини; ембріодні тільця; проліферація; диференціювання; культура *in vitro*.

## ВСТУП

В останні роки концепція існування гемопоетичних стовбурових клітин зазнала суттєвих змін. Усталена уява про єдину плюрипотентну стовбурову клітину і її нащадків ускладнилася накопиченими даними про гетерогенність відділу клітин-попередників. Ембріональні стовбурові клітини мишей (ЕСКм) отримано з внутрішньої клітинної маси бластоцисти, ранньої стадії ембріона. Дві відмінні властивості притаманні ембріональній стовбуровій

клітині: їх плюрипотентність та здатність до самовідновлення за певних умов. Вони плюрипотентні тим, що можуть диференціюватися на всі похідні первинних зародкових шарів, включаючи екто-, енто- та мезодерму, утворюючи таким чином всі типи клітин в організмі.

ЕСК було вперше ізольовано декількома окремими колективами [1]. Дослідники довели їх плюрипотентну природу – здатність диференціюватися у три зародкові шари, описали властивості і переваги використання

© Д.І. Білько, Ю.Б. Чайковський

для отримання трансгенних тварин. У 1987 р. Thomas і Саессі продемонстрували здатність ЕСК модифікувати геном за допомогою гомологічної рекомбінації. Williams і співавт. у 1988 р. довели, що екзогенного контролю за утриманням плюрипотентності ЕСК можна досягти вирощуванням за наявності фідера з клітин фібробластів мишачих ембріонів або фактора, що гальмує лейкемію (LIF); у такому разі ЕСК залишаються недиференційованими. Три фактори транскрипції, як відомо, є критично важливими для утримання плюрипотентності ЕСК: OCT3/4, Nanog та Sox2. Показано, що рівень цих факторів знижується під час індукованого диференціювання через вилучення LIF або додавання ретиноевої кислоти [2, 3].

Плюрипотентні стовбурові клітини миші здатні проліферувати, проявляти високу активність лужної фосфатази і формувати цистоподібні утворення, які були названі „ембріодними тільцями” (ЕТ). Можливість клітин формувати останні є однією з ознак їх плюрипотентності. ЕТ, які утворюються з ЕСК, є 3D багатоклітинними структурами, котрі спроможні спонтанно диференціюватись і утворювати три ембріональні герментативні шари. ЕТ повторюють багато аспектів клітинного поділу в процесі раннього ембріогенезу і відіграють важливу роль у диференціюванні ЕСК. Вважають, що вони є аналогами жовткового мішка. Відомо, що ззовні ЕТ покриті шаром ектодермальних клітин, усередині міститься ядро з ендодермальних клітин, а між двома цими шарами – мезодермальні клітини. Деякі процеси раннього розвитку, що спостерігаються всередині ЕТ, призводять до утворення диференційованих клітин різного походження, таких як гемопоетичні клітини, кардіоміоцити, нейрони, гліальні попередники, міоцити, клітини вісцеральної ендодерми [4].

Диференціювання ЕТ відбувається спонтанно і залежить від наявності в середовищі цитокіну LIF, який є членом родини інтер-

лейкіну 6 (IL-6). LIF – поліпептид, що перешкоджає диференціюванню ЕСК. Він підтримує їх проліферацію завдяки взаємодії LIF з глікопротеїдом gp130, який є головним компонентом сигнального рецептора цієї групи цитокінів, що блокує фосфорилування JAK-тирозинкіназ та пригнічує фактор транскрипції STAT-5 при одночасній активації STAT-3. ЕСК було виділено у багатьох інших видів (щурів, свиней, великої рогатої худоби та мавп). Інтерес до питань технології стовбурових клітин значно збільшився у зв'язку з виділенням ЕСК у людей і приматів. Проте LIF не утримує ЕСК людини від диференціювання. Вважають, що SOCS-1 може інгібувати сигнальні шляхи LIF у разі дії на ЕСК людини [5].

Відомо кілька методів отримання ЕТ з ЕСКм у культурі *in vitro*. Це зручний підхід для виявлення проліферації і диференціювання цих клітин на початкових етапах розвитку [6, 7]. Основними методами є рідкі клітинні суспензії, культивовані у бактеріальних чашках, культури у напіврідкій метилцелюлозі і культури у «висячій краплі». Використовують суспензійні культури з постійним перемішуванням, культивування у планшетах AggreWell і на круглих денцях 96-коміркових планшетів. Для отримання більшої кількості ЕТ використовують біореактори [8]. Кожен з цих методів має свої переваги і недоліки. Важливо забезпечити оптимальні умови для накопичення ЕТ та утримання їх у стані плюрипотентності.

Нещодавно з'явилися праці, в яких причину втрати плюрипотентності ЕСК у культурі дослідники пов'язують з особливим характером жорсткості мікрооточення [9–11]. Наразі використовують як покриття полістиролових, поліпропіленових, поліетиленових чи скляних чашок Петрі природні і синтетичні матеріали з колагену, альгілату, хітозану, желатину, гідроксіапатиту, полімолочної та полігліколевої кислот тощо. Дотепер в експериментальній медицині, пластичній, естетичній і реконструктивній хірургії

широко застосовують різні марки біологічно сумісного гідрофільного поліакриламідного гелю («Sigma-Aldrich-Fluka», США; «Merk», США; «Акваліфт», Україна; «Інтерфал», Україна; «Фармакрил», Росія; «Amazingel», Китай та інші).

Метою нашого дослідження було визначення ролі жорсткості підложки для підтримки плюрипотентності ЕСК у культурі *in vitro*.

## МЕТОДИКА

*Підтримка лінії плюрипотентних ембріональних клітин миші.* Як джерело плюрипотентних ембріональних клітин використовували клітини лінії (wild type D3 R1), яку підтримували в недиференційованому стані культивуванням у повному живильному середовищі (IMDM-Н, «Gibco-BRL», США), 15% FCS («Sigma-Aldrich», США), 1% бичачого альбуміну, 100 U/мл LIF («Millipore», США), 0,1 ммоль/л 2-меркаптоетанолу («Sigma-Aldrich», США) та 50 мг/мл гентаміцину («Sigma-Aldrich», США) в умовах CO<sub>2</sub>-інкубатора при 5% CO<sub>2</sub> і абсолютній вологості при 37°C [2]. Клітини для експерименту використовували на 15-му пасажі. На дно культуральних планшетів (Nunc) поміщали відмиті протягом доби у фізіологічному розчині (0,9%-му NaCl) пластини з поліакриламідного гелю різної щільності, які розміром відповідали дну чашки Петрі; дно однієї чашки залишали без покриття. Зверху на дно, покрите гелем, і на дно чашки без покриття нашаровували колаген типу 1 («Sigma-Aldrich», США) у концентрації 40 мг/мл [6, 12].

*Постановка методу «висяча крапля».* Для отримання ЕТ з ЕСКм використовували метод «висячої краплі». Для цього готували суспензію ембріональних клітин з розрахунку 2,5·10<sup>4</sup> клітин на 1 мл суспензії. Кількість ЕСК доводили до ≈3·10<sup>4</sup> клітин/мл (3·10<sup>2</sup> клітин/10 мкл) з повним культуральним середовищем, яке складалося з DMEM-Н («Sigma-Aldrich», США), 15% FBS («Sigma-Aldrich», США),

антибіотиків (1% пеніциліну/стрептоміцину; «Sigma-Aldrich», США). Додавали інгібіторну концентрацію 100 U/мл LIF («Sigma-Aldrich», США). Наносили краплі, кратні 10 мкл, на кришку 9-сантиметрової пластикової чашки Петрі, підтримуючи помірну дистанцію між краплями, щоб уникнути злиття. Розміщували близько 100 крапель на одну кришку. У чашку Петрі вносили 10 мл фізіологічного розчину (0,9%-го NaCl) для запобігання висихання крапель, встановлених на внутрішній поверхні кришки. Плавним швидким рухом перевертали кришку, закривали чашку і обережно переносили її у зволожений CO<sub>2</sub>-інкубатор (7,5% CO<sub>2</sub>) та культивували висячі краплі 2 дні при постійній температурі 37°C. Після цього ЕСК утворювали однорідні сферичні тіла, які розміщувалися на вершині висячої краплі. Агрегати, які утворювалися, збирали, використовуючи піпетку з широким отвором [11]. Їх вивчали за допомогою інвертованого мікроскопа (Olimpus СК-2, Японія).

*Нарощування маси ембріодних тілець.* ЕТ переносили в мікробіологічні чашки Петрі (9 см), до яких агрегати не прикріпляються. Додавали повне живильне середовище (DMEM-Н; «Sigma-Aldrich», США), 15% FCS («Sigma-Aldrich», США), 100 U/мл LIF («Millipore», США), 1% незамінних амінокислот («Invitrogen», Німеччина), 50 ммоль/л 2-меркаптоетанолу («Invitrogen», Німеччина), 150 мкмоль/л моногліцеролу, та 50 мкг/мл гентаміцину). Культивували ЕТ у зволоженому CO<sub>2</sub>-інкубаторі (7,5%) при 37°C в умовах абсолютної вологості. Кожні 2 доби протягом 12 днів замінювали середовище [2].

*Дисоціація ембріодних тілець.* ЕТ піддавали розділенню, для чого інкубували 1 хв у термостаті при 37°C з 0,25%-ю колагеназою («Sigma-Aldrich», США) у фосфатно-буферному розчині PBS з 20%-ю фетальною телячою сироваткою. Для дисоціації клітин використовували ін'єкційні голки, діаметр яких зменшувався. Індивідуальні клітини підраховували у камері Горяєва, визначали

життєздатність за трипановим-синім [4].

*Визначення активності лужної фосфатази.* Лужна фосфатаза (ЛФ) відіграє суттєву роль в ембріогенезі і є однією з ознак плюрипотентності ембріональних стовбурових клітин. Для виявлення її активності застосовували імуноцитохімічний лужно-фосфатазний стрептавідин-біотинний метод LSAB-AP [13]. Оцінка активності ЛФ у клітинах є напівкількісною і проводиться за принципом Астальдо, який оснований на виявленні різного ступеня інтенсивності специфічного забарвлення. Залежно від нього досліджувані клітини розділяли на 4 групи: А – з різко позитивним (+++), Б – позитивним (++) , В – слабопозитивним (+) забарвленням і Г – з негативною реакцією (–). Підраховували 100 клітин певного виду, потім число клітин з однаковою інтенсивністю забарвлення множили на відповідне цій групі число плюсів. Далі вираховували середній цитохімічний коефіцієнт (СЦК) за Карлов. Отриманий відсоток клітин у кожній групі множили на число плюсів. Сума цих величин, поділена на 100, являє собою СЦК, яких обчислювали за формулою:

$$\frac{(A \times +++ ) + (B \times ++ ) + (V \times + ) + (Г \cdot 0)}{100}$$

*Визначення модуля Юнга.* Визначали модуль Юнга як показника ступеня жорсткості субстрату [14]. Відбирали пластини м'якої, середньої жорсткості і жорсткі (0,8, 4,0, 8,0 кПа).

*Статистичне опрацювання результатів.* Для обробки результатів використовували статистичну програму Microsoft Excel. Достовірність відмінностей середніх значень двох сукупностей визначали із застосуванням u-критерію Манна – Уїтні; різницю результатів вважали вірогідною на рівні значущості 95% (P < 0,05).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Ми наносили суспензії ЕСКм на підложки з поліакриламідного гелю різної щільності.

Для цього змішували компоненти для полімеризації у різних співвідношеннях, формували пластини круглої форми розміром, який відповідав параметрам дна культурального посуду (діаметром 3,5 см і висотою 0,5 см), визначали модуль Юнга. Готували пластини різної жорсткості. Жорсткість 8 кПа збігалася з жорсткістю пластика. Далі відмивали пластини у PBS, стерилізували і вкладали в стерильні чашки Петрі [12]. Зверху на дно, покрите гелем, і на дно чашки без покриття нашаровували колаген типу 1 (“Sigma-Aldrich”, США) у концентрації 40 мг/мл. Культивування ЕСКм на різних субстратах проводили у повному живильному середовищі з LIF і без нього. Оцінювали інтенсивність забарвлення ЛФ імуноцитохімічним методом [13]. Серед клітин, які культивували на м'якому субстраті, розрізняли 86 клітин з різко позитивним результатом ЛФ, який відповідав високій інтенсивності забарвлення (+++), 7 клітин – з позитивним забарвленням (++) , 3 – з слабопозитивним (+) і у 4 забарвлення не визначалося (–). Культивування на напівжорсткій основі призводило до зміни інтенсивності забарвлення цитоплазми клітин, де різко позитивних виявилось 28 клітин, позитивних – 62, слабопозитивних – 7. У 3 клітинах забарвлення не було. Культивування на жорсткій основі становило 8, 34 і 53 клітин відповідно. Забарвлення не виявлялося у 5 клітинах.

Таким чином, у першому випадку СЦК дорівнював – [(86 × 3) + (7 × 2) + (3 × 1) + (4 × 0)]: 100 = 2,75, у другому – [(28 × 3) + (62 × 2) + (7 × 1) + (3 × 0)]: 100 = 2,15, у третьому – [(8 × 3) + (34 × 2) + (53 × 1) + (5 × 0)]: 100 = 1,45.

Колонії, які формувалися з ЕСКм на м'якій підложці за наявності LIF, були одного розміру і мали шароподібну форму. Вони характеризувалися високою активністю ЛФ. СЦК дорівнював 2,75. Колонії з ЕСКм, які культивували на дні, покритому гелем середньої і жорсткої щільності, ставали гетерогенними за формою, активність ЛФ стрімко знижувалася. СЦК дорівнював 2,15 і

1,45 відповідно. «Примхлива» форма колоній ЕСКм і низька активність ЛФ пояснюються ригідністю культурального посуду, на якому було культивовано ЕСК. Порівнюючи різні розміри і форми колоній ЕСКм і різні субстрати, ми дійшли висновку, що ЕСК, які культивувалися на м'якому гелі, формували круглі і компактні колонії з високою активністю ЛФ у процесі культивування навіть при відсутності LIF протягом 7 днів. Тобто для стовбурових клітин зберігалися ознаки плюрипотентності. І навпаки, ЕСК на ригідному субстраті і субстраті середньої жорсткості, перебуваючи 3 дні без LIF, демонстрували формування колоній з ознаками диференціювання зі значно меншою активністю ЛФ або її відсутністю. Клітинні агрегати набували неправильні «примхливі» форми. Згідно з даними літератури, отримані результати можуть пояснюватись тим, що м'який субстрат долає LIF-Stat3-сигнальний шлях, демонструючи протягом 7 днів самопідтримку стовбурових клітин [6].

На наступному етапі культивування ЕСК наносили на кришку пластикової чашки Петрі діаметром 9 см з внутрішнього боку в об'ємі кратному 10 мкл, підтримуючи помірну дистанцію між краплями. На другий день вони формували компактні шароподібні D-структури – ЕТ. Відомо, що здатність формувати останні, наявність високої активності ЛФ і експресії Oct3/4 є ознаками плюрипотентності [1]. Після підрахунку ЕТ виявилось, що кількість структур, які формувалися з ЕСКм, культивованих на гелевій основі різної жорсткості за наявності LIF, відрізня-

ється. Враховуючи, що наносили на внутрішню поверхню кришки 100 крапель, кількість ЕТ, отриманих з ЕСКм, культивованих на м'якій, середньої жорсткості і жорсткій основі становила  $87,5 \pm 3,2$ ,  $76,0 \pm 3,3$  і  $77,0 \pm 4,5$  відповідно ( $P < 0,05$ ). Коли ж LIF при заміні середовища вже не додавали, в культурах з м'яким покриттям здатність формувати ЕТ залишалася незмінною, тобто вилучення LIF не впливало на ефективність утворення ЕСК. Так, значення цього показника в разі культивування ЕСКм на м'якому гелі без LIF було  $85,3 \pm 2,8$ . І навпаки, коли перед нанесенням крапель з ЕСК LIF вилучали, ефективність утворювати ЕТ різко знижувалась у варіантах культивування ЕСКм на гелях середньої жорсткості і жорсткому гелі і визначалася у кількості ЕТ, яка дорівнювала  $23,5 \pm 2,24$  і  $22,8 \pm 3,8$  відповідно на чашку ( $P < 0,05$ ; таблиця).

Дослідження показали, що в ЕТ з ЕСКм, які підтримувалися на м'якому гелі, проліферативні процеси відбувалися інтенсивніше, ніж на жорсткому субстраті. Встановлено, що ефективність проліферації становила 750–1000 клітин. Водночас ЕТ з ЕСКм, культивованих на дні, покритому жорстким гелем і гелем середньої жорсткості, формували агрегати розміром 250–500 клітин (рис. 1). За даними, отриманими нами раніше [3], агрегати з щільністю посіву 500 клітин найбільш здатні до диференціювання (рис. 2).

За аналізом спроможності ЕСКм утворювати ЕТ, результатами цитологічних і цитохімічних досліджень культивованих агрегатів ми дійшли висновку, що причина

**Ефективність формування ембріодних тілець ембріональними стовбуровими клітинами, культованими на гелевій основі різної жорсткості з фактором, що гальмує лейкемію (LIF) і при його вилученні (з розрахунку на 100 висячих крапель)**

Гель	Наявність LIF	Відсутність LIF
М'який, 0,8 кПа	$87,5 \pm 3,2$	$85,3 \pm 2,8$
Середньої жорсткості, 4 кПа	$76,0 \pm 3,3^*$	$23,5 \pm 2,24^*$
Жорсткий, 8 кПа	$75,0 \pm 4,5^*$	$22,8 \pm 3,8^*$

\* $P < 0,05$  порівняно з наявністю фактора



Рис. 1. Ембріодне тільце (ЕТ) у культурі ембріональних стовбурових клітин, культивованих на м'якій підложці з поліакриламідного гелю. Інвертований мікроскоп. Прижиттєва зйомка. Зб.  $\times 400$

збереження плюрипотентності клітин у культурі криється у ступені жорсткості субстрату, на якому культивуються клітини ембріона. Це може бути пов'язано з тим, що поліакриламідний гель у відповідній концентрації компонентів відповідає консистенції ЕТ, яка забезпечує підтримку його плюрипотентності, навіть при відсутності LIF.

Наші результати збігаються з даними культивування ЕСКм, які підтримувалися *in vitro* на гідрогелевій основі без і з LIF [6]. Дослідники показали, що наявність маркерів проліферації (Oct3/4:GFP) і відсутність маркерів диференціювання на клітинах впродовж 5 днів з LIF і без нього свідчить про створення, в разі культивуванні на м'якій основі *in vitro*, умов для самопідтримки ЕСК. Отримані в експерименті результати є підґрунтям для створення моделі довготривалого культивування соматичних клітин на м'якій підложці з поліакриламідного гелю в умовах, наближених до природних [12].

Таким чином, результати культивування ЕСКм на різних за консистенцією підложках з поліакриламідного гелю переконливо свідчать про роль жорсткості субстрату у самопідтримці ембріональних стовбурових

## кількість клітин у ЕТ

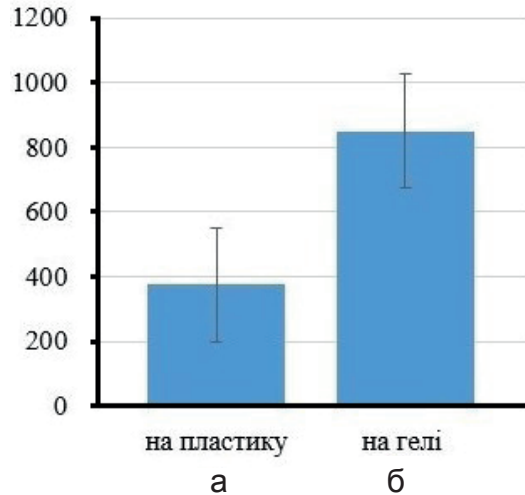


Рис. 2. Проліферативна активність клітин у ембріодних тільцях (ЕТ), отриманих з ембріональних стовбурових клітин, культивованих на різних за жорсткістю субстратах. Вісь Y – кількість клітин у ембріональному тільці, вісь X – культури на жорсткому (а) і м'якому субстратах (б)

клітин. Пояснення цьому факту лежить в основі біофізичних взаємодій, у результаті вивчення яких низка дослідників показали, що обидві характеристики, апікальна жорсткість і базальна сила зчеплення колоній з ЕСКм підвищується з жорсткістю субстрату; вони пов'язують це явище з механочутливістю Е-кадеринів, які оптимізують механічну взаємодію апікальних і базальних зчеплень ЕТ. Висока сила зчеплення клітинно-матричного комплексу покращує диференціювання, в той час як низька відповідає за самопідтримку і плюрипотентність взаємодії [6, 7].

Таким чином, плюрипотентність стовбурових клітин залежить не тільки від комплексу живильного середовища, цитокінів і добавок, а й від ступеня жорсткості субстрату, на якому культивуються клітини. Здатність до формування ЕТ залежить від жорсткості субстрату, на якому культивувалися ЕСКм. Останні, культивовані на м'якому субстраті щільністю 0,8 кПа, утворювали ЕТ, ефективність яких становила  $87,5 \pm 3,2$  на 100 посаджених клітин і не зменшувалася навіть при

вилученні LIF ( $85,3 \pm 2,8$ ). Проте у відсутності LIF стовбурові клітини, культивовані на жорсткій основі (8 кПа) і основі середньої жорсткості (4 кПа), демонстрували низький рівень формування ET  $23,5 \pm 2,24$  і  $22,8 \pm 3,8$  відповідно. Встановлено, що кількість клітин в ET, отриманих з ЕСКм, які культивували на м'якій підложці, становила 750–1000 клітин, а на ригідному субстраті і субстраті середньої жорсткості – 250–500 клітин, що свідчить про обмежену проліферацію клітин і схильність до диференціювання у ET, отриманих з ЕСК, культивованих на жорстких субстратах. Отримані результати є підґрунтям для створення моделі довготривалого культивування соматичних клітин на м'якій підложці з поліакриламідного гелю в умовах, найбільш наближених до природних.

*The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.*

**Д.І. Білько, Ю.Б. Чайковський**

### **РОЛЬ ЖЕСТКОСТИ ПОДЛОЖКИ В ПОДДЕРЖКЕ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В КУЛЬТУРЕ IN VITRO**

Известно, что в условиях культивирования *in vitro* в присутствии LIF (лейкемииингибирующего фактора) эмбриональные стволовые клетки мыши (ЭСКм) поддерживают плюрипотентность, однако при его изъятии (в случае замены питательной среды) наступает активная дифференциация в различные специализированные типы соматических клеток. Целью нашего исследования было определение роли жесткости подложки для поддержания плюрипотентности эмбриональных стволовых клеток в культуре *in vitro*. Для реализации этой цели были использованы метод культивирования *in vitro*, метод «висящей капли», определение модуля Юнга для полиакриламидного геля разной жесткости, иммуноцитохимический стрептавидин-биотиновый метод (LSAB-AP), микроскопия. В результате культивирования ЕСК на подложках из полиакриламидного геля мягкой, средней и жесткой плотности (0,8,

4,0, 8,0 кПа) оказалось, что на мягком геле, даже при отсутствии LIF, дифференциации не происходит, клетки продолжают проявлять признаки плюрипотентности, а именно, создают круглые колонии с высокой активностью щелочной фосфатазы и формируют эмбрионидные тельца (ЭТ), которые определяются методом «висящей капли». Результаты показали, что ЕСК, культивированные на мягком субстрате, образовывали ЭТ, эффективность которых равнялась  $87,5 \pm 3,2$  на 100 посаженных клеток и не уменьшалась даже при изъятии LIF. Хотя при отсутствии LIF стволовые клетки, культивированные на жесткой основе, демонстрировали низкий уровень формирования ЭТ ( $23,5 \pm 2,24$ ). Результаты наблюдений убедительно демонстрируют, что процесс формирования ЭТ связан не только с наличием комплекса факторов в питательной среде, но и со сложными взаимодействиями физических сил матрикса и механических свойств 3D-клеточных агрегатов. Модель рассматривается как способ исследования ранних этапов эмбриогенеза на пути поиска условий для накопления клеток-предшественников и дифференцированных клеток для трансплантаций. Ключевые слова: плюрипотентность; эмбриональные стволовые клетки; эмбрионидные тельца; пролиферация; дифференциация; культура *in vitro*.

**D.I. Bilko<sup>1</sup>, Y.B. Chaikovsky<sup>2</sup>**

### **THE ROLE OF SUBSTRATE STIFFNESS IN MAINTAINING PLURIPOTENCY OF EMBRYONIC STEM CELLS IN VITRO CULTURE**

<sup>1</sup> National University of Kyiv-Mohyla Academy,

<sup>2</sup> Bogomolets National Medical University, Kyiv; e-mail: comraduk@yahoo.co.uk

Murine embryonic stem cells (ESCM) cultured *in vitro* in the presence of LIF (leukemia inhibitory factor) maintain pluripotency. However, when LIF is removed from the media, an active differentiation into various specialized somatic cells is observed. The aim of the study was to determine the role of substrate stiffness in maintaining of pluripotency of embryonic stem cells *in vitro* culture. To this aim, we used the method of culturing pluripotent stem cells *in vitro*, the method of “hanging drop”, the determination of the Young’s modulus for polyacrylamide gel of different hardness, the immunocytochemical alkaline phosphatase (AP) streptavidin-biotin method, microscopy. By culturing ESCM on a soft, medium and hard density polyacrylamide gel as a substrate (0.8, 4.0, 8.0 kPa), we found that on a soft gel ESCM differentiation does not occur even in the absence of LIF. ESCM cultured on a soft substrate continue to show signs of pluripotency, namely, create round compact colonies with high alkaline phosphatase activity and form embryoid bodies (EB), the efficiency of which ( $87.5 \pm 3.2$  per 100 cells seeded) did not decrease even after LIF withdrawal. In the absence of LIF, ESCs cultured on

a hard base showed a low level of EB formation ( $23.5 \pm 2.24$ ). The results of our observations demonstrate that the process of EB formation may be influenced not only by a composition of nutrient medium, but also by complex interaction between the physical forces of the matrix and the mechanical properties of 3D cell aggregates. The model is considered as a tool to study early events in embryogenesis in the search of conditions for effective culture of progenitor cells and differentiated cells for transplantation.

Key words: pluripotency, embryonic stem cells, embryoid body, differentiation, culture *in vitro*.

## REFERENCES

1. Chaikovskiy JB, Deltsova OI, Gerashchenko SB. Stem cells. Ivano-Frankivsk: Town NV, 2014. [Ukrainian].
2. Bilko DI, Bilko NM. Potential possibilities of early embryonic cells to form hematopoietic cells in culture *in vitro*. Transplantology. Med Today Tomorrow. 2011;1-2:50-51. [Ukrainian].
3. Malysheva SV, Budash GV, Bilko NM, Cheshler J. Differentiation in cardio-myocytes from some clones of mouse induced pluripotent stem cells. Fiziol Zh. 2013;59(3):10-18. [Ukrainian].
4. Kibschull M. Differentiating mouse embryonic stem cells into embryoid bodies in aggrewell plates. Cold Spring Harb Protoc. 2017 Jun 1;2017(6).
5. Zeevaert K, Mohamed H, Mabrouk E, Wagner W, Goetzke R. Cell mechanics in embryoid bodies. Cells. 2020 Oct 11;9(10):2270.
6. Chowdhury F, Li Y, Chuin Poh Y, Tamaki T, Wang N, Tanaka T. Soft substrates promote homogeneous self-renewal of embryonic stem cells via downregulating cell-matrix tractions. PLoS One. 2010 Dec 13;5(12):15655.
7. Gerardo H, Lima A, Carvalho J, Ramos JRD, Couceiro S, Travasso RDM, Pires das Neves R, Graos M. Soft culture substrates favor stem-like cellular phenotype and facilitate reprogramming of human mesenchymal stem/stromal cells (hMSCs) through mechanotransduction. Sci Rep. 2019 Jun 24;9(1):9086.
8. Li X, Ma R, Gu Q, Liang L, Wang L, Zhang Y, Wang X, Liu X, Li Z, Fang J, Wu J, Wang Y, Li W, Hu B, Wang L, Zhou Q, Hao J. A fully defined static suspension culture system for large-scale human embryonic stem cell production. Cell Death Dis. 2018 Aug 30;9:892.
9. Goetzke R, Sechi A, De Laporte L, Neuss S, Wagner W. Why the impact of mechanical stimuli on stem cells remains a challenge. Cell Mol Life Sci. 2018 Sep;75(18):3297-3312.
10. Bertels S, Jaggy M, Richter B, Keppler S, Weber K, Genthner E, Fischer A, Thie M, Wegener M, Greiner A, Autenrieth T, Bastmeyer M. Geometrically defined environments direct cell division rate and subcellular YAP localization in single mouse embryonic stem cells. Sci Reports. 2021 Apr 29;11:9269.
11. Hagbard L, Cameron K, August P, Penton C, Parmar M, David C, Hay D, Kallur T. Developing defined substrates for stem cell culture and differentiation. Philos Trans Roy Soc Lond B Biol Sci. 2018 Jul 5;373(1750):20170230.
12. Bilko DI, inventor. Method of long-term cultivation of hematopoietic stem cells. Patent No. 146819. 2021 March, 17. [Ukrainian].
13. Gluzman DF, Skljarenko LM, Nadgornaja VA. Diagnostic oncohematology. Kiev: DIA, 2011. [Russian].
14. Prou J, Kishimoto K, Constantinescu A. Identification of young's moduls from indentation testing and inverse analysis. J Solid Mechan Mat Engineer. 2009 Dec 21;4(6):781-95.

Матеріал надійшов  
до редакції 12.05.2021