

Диференціювання ембріональних стовбурових та індукованих плюрипотентних клітин миші в кардіоміоцитарному напрямку

Г.В. БУДАШ, Д.І. БІЛКО

Центр молекулярних і клітинних досліджень
Національного університету «Києво-Могилянська академія», м. Київ

Differentiation of Embryonic Stem and Induced Pluripotent Cells of Mice in Cardiomyocytic Direction

G.V. BUDASH, D.I. BILKO

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

Висока проліферативна активність та можливість диференціації у клітини всіх зародкових листків, яка притаманна індукованим плюрипотентним стовбуровим клітинам (ІПСК) та ембріональним стовбуровим клітинам (ЕСК) робить їх одним з найкращих потенціальних джерел для лікування захворювань серця методами клітинної терапії та регенеративної медицини. Основна причина серцевих захворювань – нездатність тканини серця відновити втрачені кардіоміоцити власними силами. Однак на сьогодні однією з суттєвих перепон у застосуванні цих клітин в регенеративній медицині є складність отримання великої кількості м'язових клітин серця, необхідних для трансплантації. Вирішити цю проблему можна вдосконаленням методів диференціювання, а також застосуванням факторів, які, з одного боку, є нетоксичними для організму, а з іншого – сприяють диференціюванню ІПСК у кардіоміоцитарному напрямку.

Досліджено два методи диференціювання ЕСК та ІПСК в кардіоміоцити через утворення ембріоїдних тілень (ЕТ): метод висячої краплі і метод культивування в суспензії культури на орбітальному шейкері. Експерименти проводили на генетично модифікованих лініях ЕСК та ІПСК миші, які експресували зелений флуоресцентний протеїн (eGFP) під контролем кардіоспецифічного α -МНС-промотора. Кількісне визначення утворених кардіоміоцитів клітин серця проводили методами проточної цитофлуориметрії та флуоресцентної мікроскопії.

У процесі експериментальної роботи було підтверджено, що методи диференціювання ЕСК можуть бути застосовані для диференціювання ІПСК. Отримання кардіоміоцитів під час культивування в суспензійній культурі з постійним горизонтальним перемішуванням забезпечує більшу кількість ЕТ з диференційованими клітинами серця, ніж метод висячої краплі. Застосування 1%-го ДМСО у процесі диференціювання стимулює утворення клітин серця. Найкращий ефект спостерігався при додаванні ДМСО з 5-го до 9-го дня культивування, на 5% менше клітин серця утворювалось під час додавання ДМСО з 4-го до 9-го дня культивування. Однак застосування ДМСО за 3 дні до початку формування ЕТ або в перші 3 дні їх формування повністю пригнічувало утворення GFP⁺-клітин, що може означати, що ДМСО сприяє диференціюванню мезодермальних клітин у кардіоміоцитарному напрямку, але має токсичний вплив на процес диференціювання ранніх ембріональних та індукованих плюрипотентних стовбурових клітин у мезодермальному напрямку.

Застосування 1%-го ДМСО сприяє диференціюванню в клітини серця *in vitro*, однак потребує подальшого дослідження та деталізації молекулярних основ і механізмів впливу малих молекул на процеси проліферації, диференціації та експериментального гістогенезу.

High proliferative activity and the ability of cell differentiation of all germ layers, which is inherent to induced pluripotent stem cells (IPSCs) and embryonic stem cells (ESCs) make them one of the best potential sources for the treatment of heart diseases by the methods of cell therapy and regenerative medicine. The main cause of heart diseases is failure of heart tissue to recover lost cardiomyocytes using own resources. But today one of the major obstacles in the use of these cells in regenerative medicine is the difficulty in obtaining a large number of heart muscle cells required for transplantation. Solving this problem is possible by improving the methods of differentiation as well as the use of factors which on the one hand are non-toxic to an organism, and on another they promote differentiation of IPSCs in cardiomyocyte direction.

We have investigated two differentiation methods of ESCs and IPSCs in cardiomyocytes by formation of embryoid bodies (EBs): method of hanging drop and the one of culturing in the suspension of culture on the orbital shaker. The experiments were performed on genetically modified lines of mice ESCs and IPSCs which expressed green fluorescent protein (GFP) under the control cardiospecific α -MHC-promoter. Formed cardiomyocytes of cardiac cells were quantified by flow cytometry and fluorescence microscopy.

During the experimental work we have proved that ESC differentiation methods can be used to differentiate IPSCs. Obtaining the cardiomyocytes during culturing in suspension culture with constant horizontal stirring provides more EBs with differentiated heart cells than the method of hanging drop does. The use of 1% DMSO during differentiation stimulates the formation of heart cells. The best effect was observed with DMSO supplementation from the 5th to 9th day of culturing, by 5% less heart cells were formed with DMSO supplementation from the 4th to 9th day of culturing. But the use of DMSO 3 days prior to formation of EBs or in the first 3 days of their formation completely suppressed the formation of GFP⁺ cells, indicating that DMSO promotes the differentiation of mesodermal cells towards cardiomyocytic lineage, but has a toxic effect on the differentiation of early embryonic and induced pluripotent stem cells in mesodermal lineage.

Application of 1% DMSO promotes the differentiation of heart cells *in vitro*, but requires further investigation and detalization of molecular bases and mechanisms of small molecules effect on proliferation, differentiation and experimental histogenesis.