

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

БУДАШ ГАЛИНА ВОЛОДИМИРІВНА

УДК:576.32/.36:602.9

**ОЦІНКА МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНИХ ХАРАКТЕРИСТИК
ПЛЮРИПОТЕНТНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ТА ЇХ
ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ У НАПРЯМКУ КАРДІОМІОЦИТІВ В КУЛЬТУРІ
КЛІТИН *IN VITRO***

03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ -2017

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Центрі молекулярних і клітинних досліджень Національного університету «Києво-Могилянська академія» МОН України

Науковий керівник: доктор медичних наук, професор
Білько Надія Михайлівна,
Національний університет «Києво-Могилянська академія»
МОН України,
завідувач кафедри лабораторної діагностики біологічних систем.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Квітницька-Рижова Тетяна Юріївна,
ДУ «Інститут геронтології імені академіка Д.Ф. Чеботарьова
НАМН України»,
завідувач лабораторії морфології та цитології;

доктор медичних наук, професор,
член-кореспондент НАМН України
Чайковський Юрій Богданович,
Національний медичний університет імені О.О. Богомольця
МОЗ України,
завідувач кафедри гістології та ембріології.

Захист відбудеться «23» травня 2017 р. о «16⁰⁰» годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.38 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, проспект Академіка Глушкова, 2, ННЦ «Інститут біології та медицини», ауд. 434.

Поштова адреса: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології та медицини», спеціалізована вчена рада Д 26.001.38.

З дисертацією можна ознайомитися у Науковій бібліотеці імені М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, вул. Володимирська, 58, зал № 12.

Автореферат розісланий « 20 » квітня 2017 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради Д 26.001.38
доктор біологічних наук

К.О. Дворщенко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Ембріональні стовбурові клітини це – унікальні клітини, які характеризуються здатністю проліферувати протягом тривалого періоду в культурі і диференціюватися в будь-який тип тканин в організмі. Можливість підтримувати лінії цих клітин миші в культурі дозволила дослідити ранні стадії кардіогенезу ссавців [Sanchez A.J., 1991; Metzger J.M., 1995], у тому числі отримати інформацію про експресію генів [Maltsev V.A., 1999], утворення міофібрил [Heschler J., 1997], розвиток і функціонування іонних та кальцієвих каналів [Viatchenko-Karpinski S., 1999], розвиток рецепторів [Kehat I., 2001]. Однак, висока антигенність ксеногенних клітин, небезпека їхнього інфікування під час використання, етичні проблеми та висока вірогідність формування імунної відповіді організму реципієнта при трансплантації ембріональних стовбурових клітин сприяли розвитку нових технологій їхнього отримання [Грищенко В.И., 2009; Бутенко Г.М., 2011]. Індукована плюрипотентна стовбурова клітина вперше була отримана із соматичних клітин миші у 2006 році [Takahashi K., 2006]. У 2012 році за це відкриття S. Yamanaka та G. Gurdon було присуджено Нобелівську премію з медицини та фізіології. Виявлено, що індуковані плюрипотентні стовбурові клітини подібні до ембріональних стовбурових клітин за морфологією, експресією генів, епігенетичним статусом генів, які відповідають за плюрипотентність клітин; вони можуть диференціюватися у клітини трьох зародкових шарів, як *in vivo* так і *in vitro* [Ptaszek L., 2012; Inoue H., 2014]. Концептуально диференціювання ембріональних стовбурових клітин не відрізняється від диференціювання індукованих плюрипотентних стовбурових клітин і залежить від спрямування сигнальних шляхів, які впливають на ембріональний розвиток в природних умовах і вимагають виконання одних і тих самих процедур [Brambrink T., 2008; Kuzmenkin A., 2009]. Тим не менше, було показано, що лінії індукованих плюрипотентних стовбурових клітин мають вищу мінливість фенотипу, що може бути пов'язано з широким спектром методів індукції плюрипотентності, а також джерел соматичних клітин та умов культивування клітинних ліній [Петренко О.Ю., 2011; Yu J., 2007; Staerk J., 2010]. Перевагою індукованих плюрипотентних клітин є те, що вони після індукції і диференціювання в заданому напрямку можуть бути повернені до хазяїна [Білько Н.М., 2009; Чайковський Ю.Б., 2014; Takahashi K., 2006].

Майже одразу після народження серце ссавців втрачає велику частину своїх регенеративних можливостей. Через постійну боротьбу зі стресом і пошкодженням клітин відбувається втрата функціональних кардіоміоцитів [Wei H., 2005]; як наслідок, спостерігається гіпертрофія вже існуючих клітин та їх заміна клітинами сполучної тканини, які нездатні до скорочення [Yuasa S., 2008]. Важливість цієї проблеми підтверджується тим, що у світі серцево-судинні захворювання знаходяться на першому місці серед хвороб, які призводять до смерті пацієнта, а в Україні вони є причиною смертності 6 з 10 мешканців країни [Гандзюк В.А., 2014].

Відновлення функції серцевого м'яза можливе завдяки застосуванню методів клітинної терапії, які дозволяють отримувати кардіоміоцити в культурі клітин *in vitro* [Білько Д.І., 2011]. Одержання великої кількості кардіоміоцитів є необхідною

умовою подальшого розвитку клітинних технологій. Найбільш перспективними джерелами отримання кардіоміоцитів є стовбурові клітини з плюрипотентними властивостями, а саме, ембріональні стовбурові клітини та індуковані плюрипотентні клітини. Способи їхнього диференціювання, які на даний час використовуються, мають ряд недоліків, головними з яких є недостатня кількість диференційованих клітин, їхня функціональна незрілість, відсутність стабільності у ефективності диференціювання та інші [Kurosawa H., 2007; Mummery C.L., 2013; Neef K., 2015]. Тому перспективним вважається дослідження процесів диференціювання індукованих плюрипотентних стовбурових клітин та ембріональних стовбурових клітин для отримання ефективних способів накопичення функціонально спроможних кардіоміоцитів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана відповідно до планів наукових досліджень кафедри лабораторної діагностики біологічних систем на факультеті природничих наук Національного університету «Києво-Могилянська академія» за темою «Особливості диференціювання плюрипотентних клітин миші в кардіоміоцити в залежності від умов культивування» № д/р 0112U000066 (07.2011 – 09.2013 р.р.).

Мета і завдання дослідження. Метою даної роботи було визначення особливостей проліферації та диференціювання ембріональних та індукованих плюрипотентних стовбурових клітин миші в кардіоміоцити в умовах впливу факторів диференціювання.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. Отримати ембріодні тілця в культурі клітин *in vitro* для подальшого визначення особливостей процесів проліферації та диференціювання ембріональних стовбурових та індукованих плюрипотентних клітин миші в кардіоміоцити.

2. Вивчити потенційні можливості використання ембріодних тілець у якості моделі для дослідження процесу диференціювання в кардіоміоцитарному напрямку.

3. Дослідити вплив умов на процес диференціювання ембріональних стовбурових клітин та індукованих плюрипотентних стовбурових клітин в культурі тканин *in vitro*, враховуючи розмір ембріодних тілець, наявність їх адгезії до поверхні та рухливість.

4. Порівняти ефективність диференціювання плюрипотентних стовбурових клітин методом «висячої краплі», в суспензійній культурі з постійним перемішуванням та в спеціальних планшетах, які забезпечують гомогенність сформованих ембріодних тілець.

5. Провести аналіз впливу малих молекул (QS11, циклоспорину, ДМСО, дорзоморфіну, кардіодженолу та аскорбінової кислоти) на процес диференціювання плюрипотентних стовбурових клітин.

6. Визначити найбільш ефективну схему підвищення ефективності диференціювання плюрипотентних клітин в кардіоміоцити миші.

Об'єкт дослідження – ембріональні стовбурові клітини та індуковані плюрипотентні стовбурові клітини миші.

Предмет дослідження – особливості диференціювання плюрипотентних стовбурових клітин миші в кардіоміоцити в умовах впливу різних факторів диференціювання.

Методи дослідження – культуральні, світлова та флуоресцентна мікроскопія, проточна цитофлуориметрія, електрофізіологічні, методи математичної статистики.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше досліджено вплив на процес диференціювання ембріональних та індукованих плюрипотентних стовбурових клітин *in vitro* розміру ембріодних тілець, адгезії ембріодних тілець до поверхні та рухливості клітин. Виявлено, що найбільш ефективним методом диференціювання, як для ембріональних стовбурових клітин, так і для індукованих плюрипотентних стовбурових клітин, є метод диференціювання в суспензійній культурі з постійним перемішуванням. Вперше доведено синергічний ефект додавання до культурального середовища аскорбінової кислоти разом з QS11. Одержано пріоритетні дані щодо оптимальних термінів додавання циклоспорину. Розроблено схему підвищення ефективності диференціювання плюрипотентних клітин в кардіоміоцити миші.

Практичне значення одержаних результатів. У зв'язку з тим, що розроблена схема отримання кардіоміоцитів суттєво підвищує ефективність диференціювання, її використання може стати підґрунтям для базового протоколу отримання кардіоміоцитів. Застосування циклоспорину або QS11 разом з аскорбіновою кислотою на перших етапах підтримки культури кардіоміоцитів з ембріональних плюрипотентних стовбурових клітин та індукованих стовбурових клітин забезпечить удосконалення як процесу створення моделей серцево-судинних захворювань і методів їхнього лікування, так і дослідження токсичності дії нових ліків.

Результати досліджень захищені патентом України № 75876 від 10.02.12 «Спосіб диференціювання стовбурових клітин в кардіоміоцити» і використовуються при читанні курсів лекцій та під час проведення практичних занять студентам на кафедрі лабораторної діагностики біологічних систем Національного університету «Києво-Могилянська академія» із дисциплін «Молекулярно-клітинні основи самовідновних систем», «Фізіологія кровотворення».

Особистий внесок здобувача. Особистий внесок здобувача полягає в отриманні наукових результатів, викладених у дисертації, у проведенні патентно-інформаційного пошуку, підборі і обробці даних літератури, проведенні експериментальних досліджень, дослідженні особливостей проліферації та диференціювання ембріональних та індукованих плюрипотентних стовбурових клітин миші в кардіоміоцити в умовах впливу різних диференційних факторів, аналізі результатів та їх статистичній обробці, написанні та оформленні дисертації. У наукових працях, що оформлені у співавторстві, відображено результати спільного планування, проведення експериментів та обговорення результатів. Формулювання мети, основних завдань роботи, інтерпретація отриманих результатів та обґрунтування наукових висновків зроблені разом з науковим керівником.

Автор висловлює глибоку вдячність професору Heschler J. та доктору Saric T. (Інститут нейрофізіології, Кельнський університет, м. Кельн, Німеччина) за координацію ключових етапів роботи та надану можливість для продуктивної співпраці.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертаційної роботи доповідались і обговорювались на 6-й Міжнародній конференції молодих науковців «Біологія від молекули до біосфери» (Харків, 2011), Міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Роль інновацій у підвищенні наявного потенціалу країни» (Тернопіль, 2011), на конференції, присвяченій «Дням науки НаУКМА» (Київ, 2011), Науково-практичній конференції «Актуальні проблеми регенеративної медицини» (Київ, 2012), VIII Міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2012), конференції-конкурсі робіт молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології» (Київ, 2012), Науковій конференції з міжнародною участю, присвяченій 40-річчю Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (Харків, 2012), VII Міжнародній конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2012), конференції, присвяченій «Дням науки НаУКМА» (Київ, 2012), Науковій школі МАН (Київ, 2012), BREATH summer school (Hannover, Germany, 2015), конференції, присвяченій «Дням науки НаУКМА» (Київ, 2016), IV Міжнародній науковій конференції "Фундаментальні та прикладні дослідження в біології та екології" (Вінниця, 2016), International Symposium on Cell Biology jointly with 5th Ukrainian Congress for Cell Biology (Odesa, 2016).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 18 наукових праць, з яких 7 статей, серед яких 3 представлено в наукометричній базі даних SCOPUS, в тому числі 1 стаття в іноземному міжнародному журналі, 4 статті опубліковано в спеціалізованих фахових виданнях, що відповідають вимогам МОН України, 1 патент України на винахід, 10 тез доповідей у матеріалах міжнародних та національних конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел, який містить 131 найменування, з них 10 – кирилицею та 121 – латиницею). Матеріали дисертаційної роботи викладені на 132 сторінках друкованого тексту (з яких основна частина займає 118 сторінок, ілюстрована 43 рисунком і 2 таблицями).

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень. У роботі були використані лінія індукованих плюрипотентних стовбурових клітин (ІПСК) миші AT25 та лінія ембріональних стовбурових клітин (ЕСК) миші α PIG44. Лінія клітин AT25 була отримана з фібробластів кінчика хвоста миші під дією репрограмуючих факторів *c-myc*, *Klf4*, *Sox2*, *Oct4*, *Nanog* у лабораторії А. Meissner (США) [Meissner A., 2007]. Лінія ЕСК створена в лабораторії Е. Kolossov (Німеччина) [Kolossov E., 2006]. Обидві лінії плюрипотентних стовбурових клітин були генетично модифікованими і

експресували пуроміцин-N-ацетил-трансферазу та IRES-зв'язаний green fluorescence protein (GFP) під контролем кардіоспецифічного α -МНС промотора [Ivanuk D., 2015]. Транскрипцію α -МНС виявляли на ранніх етапах (E7.5) кардіогенезу миші ще до початку спонтанного скорочення кардіоміоцитів. Флуоресценція GFP була наявною саме в тих частинах ембріїдного тільця, де спостерігалось спонтанне скорочення клітин. Всі GFP-позитивні клітини 7-9-ї доби диференціювання були ANP (atrial natriuretic peptide) позитивними, що доводить їхню кардіогенну природу. На 15-ту та 18-ту добу повністю диференційовані кардіоміоцити, які були GFP+, мали однакові морфологічні та електрофізіологічні властивості, притаманні пренатальним кардіоміоцитам миші [Kolossova E., 2006].

Для підтримання недиференційованого стану ліній стовбурових клітин використовували фідерні клітини, отримані з лінії мишиних фібробластів MEF-Neo в живильному середовищі, яке складалось із середовища DMEM (Invitrogen, Німеччина), до якого додавали 15% FBS (Invitrogen, Німеччина), 1% незамінних амінокислот (Invitrogen, Німеччина), 50 μ M 2-меркаптоетанолу (Invitrogen, Німеччина) та 1000 Од/мл LIF (Millipore, США), а також G418 (Invitrogen, Німеччина). Стівбурові клітини культивували з розрахунку $0,5 \times 10^6$ клітин у повному живильному середовищі у чашках Петрі з підложкою з фідерних клітин.

Диференціювання ЕСК та ПСК в кардіоміоцити в суспензійній культурі з постійним перемішуванням. Суспензію поодиноких клітин (1×10^6 клітин) ресуспендували в 14 мл середовища диференціювання в неадгерентних чашках Петрі. Залишали для подальшого культивування з постійним перемішуванням в горизонтальному напрямку на шейкері (GFL 3006, GFL, Braunschweig, Німеччина) за температури 37°C та 5% CO₂ протягом двох діб для утворення ембріїдних тілець (ЕТ). Через дві доби проводили підрахунок кількості отриманих ЕТ. В кожну нову 100 мм неадгерентну чашку Петрі переносили 2000 ЕТ, розводили в 14 мл середовища диференціювання. Починаючи з 6-ї доби культивування, відслідковували появу ЕТ, що спонтанно скорочувались. Підрахунок кількості GFP+ ЕТ та ЕТ, що скорочуються, проводили з 9-ї доби культивування.

Диференціювання в кардіоміоцити методом «висячої краплі». Готували суспензію поодиноких клітин з розрахунку 25000 клітин на 1 мл суспензії. З отриманої суспензії клітин формували краплі розміром 20 μ л. Кожну окрему краплю розміщували на кришці 96-лункового планшета. Кришку обережно перевертали і накривали планшет, залишали на 2 доби в CO₂-інкубаторі за температури 37° С для формування ЕТ. Переносили ЕТ у желатинізовані чашки Петрі на 2-гу та на 5-ту добу культивування. З 9-ї доби проводили підрахунок кількості ЕТ, що скорочуються та GFP+ ЕТ.

Диференціювання в кардіоміоцити в планшетах AggreWell. У кожну лунку планшета AggreWell (StemCell Technologies, Канада) додавали 2 мл суспензії поодиноких клітин. На 2-гу добу культивування проводили підрахунок ЕТ під світловим мікроскопом та переносили суспензію ЕТ у неадгерентні чашки Петрі із середовищем диференціювання. Подальше культивування проводили в CO₂-інкубаторі на орбітальному шейкері.

Середовище диференціювання складалось із середовища IMDM (Invitrogen, Німеччина), до якого додавали 20% FBS, 1% незамінних амінокислот, 50 μM 2-меркаптоетанолу.

Досліджували вплив речовин, що сприяють диференціюванню ЕСК та ПСК в кардіоміоцити, таких як аскорбінова кислота (WACO, США) у концентрації 30 мМ, циклоспорин (Sigma, Німеччина) у концентрації 30 мг/мл, кардідженол (Sigma, Німеччина) у концентрації 0,25 μM , дорзоморфін (Sigma, Німеччина) концентрацією 2 μM , 1% ДМСО (Invitrogen, Німеччина), QS11 (Sigma, Німеччина) концентрацією 2,5 μM .

Підрахунок кількості життєздатних клітин проводили в гемоцитометрі за стандартною методикою (камера Нойбауера).

Визначення GFP+ клітин проводили на проточному цитофлуориметрі FACScan (BD Pharmingen, США). Дані аналізували за допомогою програмного забезпечення FSC Express 4 Flow Research Edition (De Novo Software, США). Нежиттєздатні клітини визначали за кількістю забарвлених пропідієм йодидом (Sigma, Німеччина) клітин.

Морфологічне дослідження і прямий підрахунок кількості ЕТ, що скорочувались, та GFP+ ЕТ проводили за стандартними методиками світлової та флуоресцентної мікроскопії. Використовували мікроскоп Axiovert 10 (ZEISS, Німеччина).

Потенціали дії кардіоміоцитів, які спонтанно скорочувались, були записані в конфігурації «цілих клітин» методом «current-clamp» з використанням підсилювача електричних сигналів ЕРС-9 та програми PULSE (НЕКА Elektronik). В якості стимулу кардіоміоцитарної відповіді використовували ізопротеренол у концентрації 1 μM та карбахол у концентрації 1 μM (Sigma-Aldrich, Німеччина).

Статистична обробка результатів. Кожен експеримент проводили в трьох біологічних та трьох технічних повторях. За допомогою t-критерію Стьюдента статистичну достовірність визначали на рівні $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вплив щільності посіву плюрипотентних стовбурових клітин миші на ефективність їхнього диференціювання в кардіоміоцити. Основним методом початкового ефекту диференціювання стовбурових клітин в кардіоміоцити є формування ембріодних тілець (ЕТ) – агрегатів з ЕСК та ПСК, які відображають ранні етапи розвитку ембріона (рис. 1). Ззовні ЕТ вкриті шаром ектодермальних клітин, всередині містять ядро з ендодермальних клітин, а між двома цими шарами знаходяться мезодермальні клітини. Однак, кількість клітин в кожному окремому агрегаті відрізняється. Тому сформовані ЕТ є гетерогенними за розміром та формою; процес диференціювання всередині кожного ЕТ відбувається спонтанно [Lee M. Y., 2011].

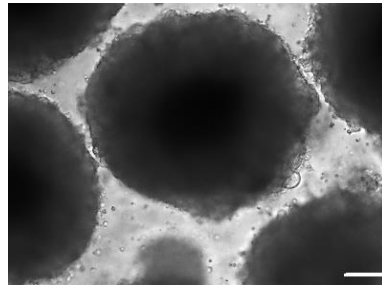


Рис. 1. Ембріюдне тільце отримане з ПСК на 11-ту добу диференціювання в культурі *in vitro*, інвертований мікроскоп.

На 2-гу добу культивування ЕТ з ПСК у планшетах AggreWell у кожній лунці було отримано однакові за розміром ЕТ, які мали типову форму із сформованим поверхневим шаром ектодермальних клітин та внутрішнім шаром ентодермальних клітин. Перші GFP+ клітини під флуоресцентним мікроскопом спостерігали на 8-му добу диференціювання.

У результаті проведених досліджень було встановлено, що ефективність диференціювання ЕТ розміром 250 та 1000 клітин менша в порівнянні з ЕТ розміром 500 та 750 клітин (рис. 2).

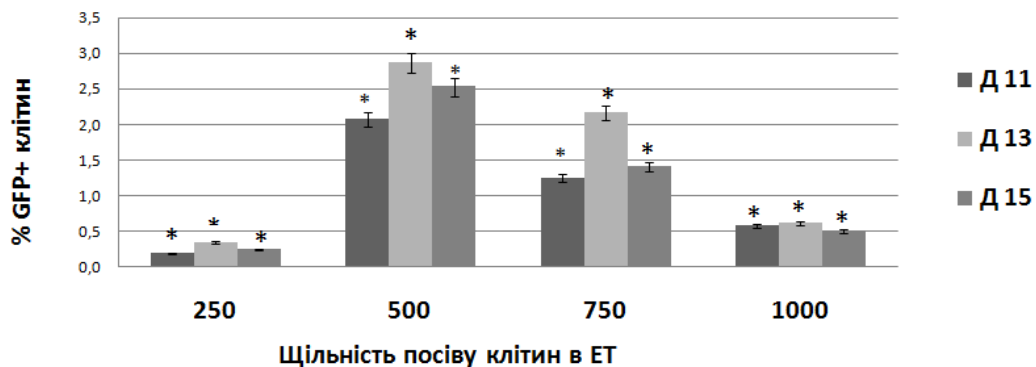


Рис. 2. Ефективність диференціювання ПСК в кардіоміоцити залежно від розміру ЕТ.

Примітка: * $p < 0,05$ відносно значень в групах. Д – доба культивування; ЕТ – ембріюдне тільце.

При порівнянні ефективності диференціювання ЕТ розміром 500 та 750 клітин було виявлено, що різниця між ними варіювала в межах від у 1,3 раза на 13-ту добу диференціювання до у 1,8 раза на 15-ту добу. При застосуванні планшетів AggreWell для диференціювання лінії ЕСК на 2-гу добу культивування в лунках планшета спостерігали утворення різних за формою та розміром ЕТ; утворення гомогенної популяції ЕТ не відбувалось.

Отже, розмір сформованих ЕТ залежить від щільності посіву (250, 500, 750, 1000 та 2000 клітин) та суттєво впливає на ефективність диференціювання. Таким чином, щільність посіву ембріональних 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, дифузією розчинних молекул та міжклітинною адгезією, про що свідчать дані інших дослідників [Hamazaki T., 2010].

Залежність ефективності диференціювання плюрипотентних стовбурових клітин миші від часу прикріплення ЕТ методом «висячої краплі». Було виявлено, що час прикріплення ЕТ до поверхні суттєво впливав на кількість утворених кардіоміоцитів. В обох лініях спостерігали, що ЕТ, які адгезували до поверхні на ранніх етапах диференціювання, тобто на 2-гу добу формування ЕТ, в порівнянні з 5-ю добою прикріплення, продукували меншу кількість GFP+ клітин (рис. 3, рис. 4). ЕТ першого типу починали скорочуватись на 8-му добу диференціювання, тоді як ЕТ, які прикріплювалися до поверхні на 5-ту добу, починали скорочуватись вже на 7-му добу диференціювання.

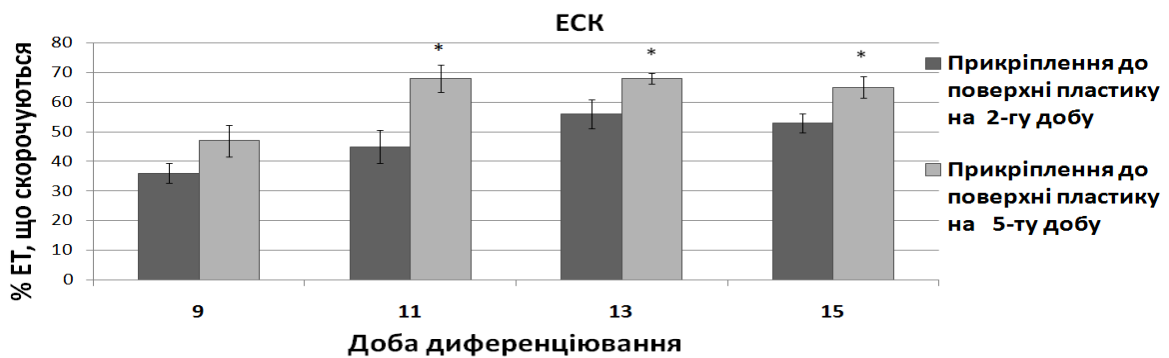


Рис. 3. Частка ЕТ з ЕСК, що скорочувались, в залежності від часу прикріплення ЕТ в культурі *in vitro*.

Примітка: * $p < 0,05$ відносно значень в групах. Д – доба культивування.

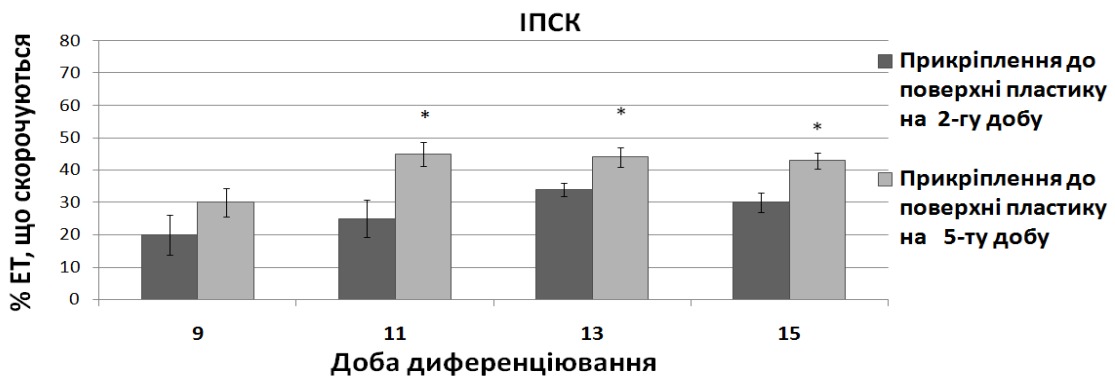


Рис. 4. Частка ЕТ з ІПСК, що скорочувались, в залежності від часу прикріплення ЕТ в культурі *in vitro*.

Примітка: * $p < 0,05$ відносно значень в групах. Д – доба культивування.

Максимальну кількість ЕТ, прикріплених на другий день, спостерігали на 13-ту добу, а для тих, що кріпились на 5-ту добу, найбільшу кількість кардіоміоцитів фіксували вже на 11-ту добу диференціювання. Для ЕСК типовим було, що ділянка ЕТ, яка скорочувалась, охоплювала майже всю площу прикріпленого ЕТ.

Скорочення відбувалось синхронно на всій ділянці. Для ПСК більш властивою була наявність декількох окремих зон, що скорочувались з різною частотою.

Таким чином, під час диференціювання методом «висячої краплі» отримували ЕТ з великою площею ділянок, що скорочуються. Отже, прикріплення ЕТ до поверхні культуральних планшетів на 5-ту добу збільшує ефективність диференціювання СК в кардіоміоцити. Проте, прикріплення ЕТ на більш ранніх етапах їхнього формування (на 2-гу добу) сповільнює процес диференціювання. Недоліком цього методу є його складність виконання та обмежена кількість отриманих ЕТ.

Диференціювання ембріональних стовбурових клітин та індукованих плюрипотентних стовбурових клітин в культурі тканин *in vitro* за умови постійного перемішування. Перші флуоресцентні клітини спостерігали під флуоресцентним мікроскопом на 8-му добу диференціювання; в поодиноких випадках скоротливі ділянки ЕТ з'являлись на 6-ту добу. Максимальну кількість GFP+ клітин вимірювали на 11-ту добу культивування (рис. 5).

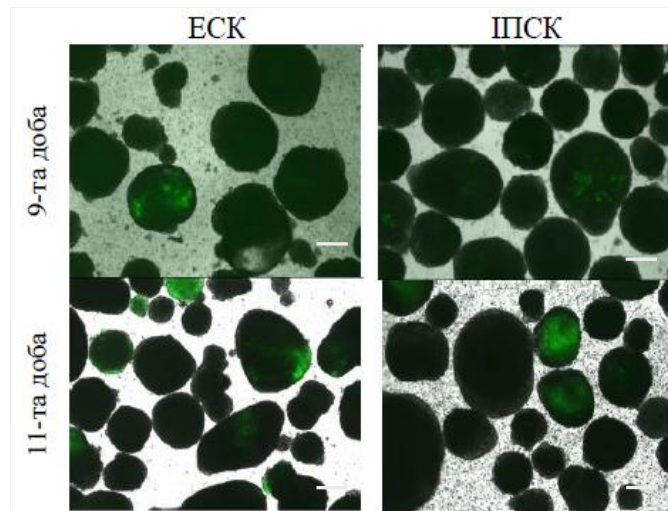


Рис. 6. Експресія GFP в ЕТ, що спонтанно скорочуються, отриманих методом диференціювання в суспензійній культурі на 9-ту та 11-ту доби диференціювання, флуоресцентний мікроскоп.

Диференціювання в суспензійній культурі з постійним перемішуванням було більш ефективним в ЕСК, ніж в ПСК. На 11-ту добу диференціювання отримували в 2,1 рази більше клітин, що становило $3,06 \pm 0,01\%$ GFP+ клітин, диференційованих з ЕСК, та $1,46 \pm 0,02\%$ GFP+ клітин з ПСК (рис. 5). Таким чином, для обох типів ПСК притаманний подібний характер диференціювання.

Метод є найбільш придатним для пошуку та ідентифікації речовин, які сприяють диференціюванню в кардіоміоцити. Крім того, оскільки культивування ЕТ відбувається в суспензійній культурі, цей метод зручніше застосовувати до умов отримання кардіоміоцитів у біореакторах у великих масштабах. Однак, проблемою даного методу була гетерогенність утворених ЕТ, і, як наслідок, значні варіації рівня диференціювання від експерименту до експерименту.

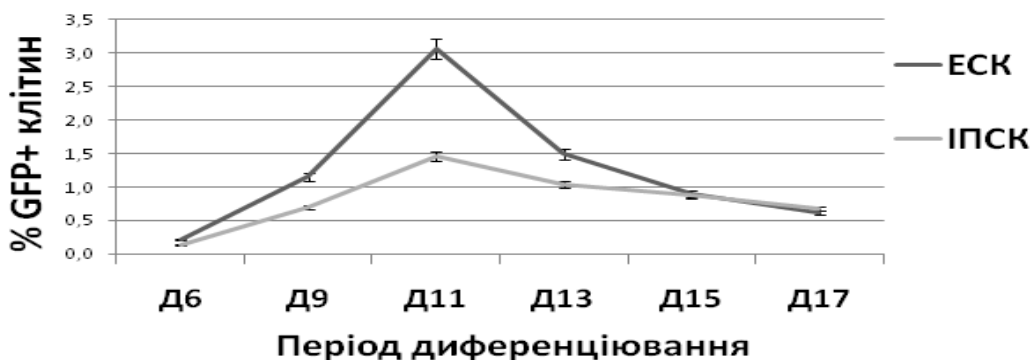


Рис. 5. Порівняння диференціювання ЕСК та ІПСК в культурі тканин *in vitro* за умови постійного перемішування.

Примітка: Д – доба культивування.

Таким чином, у роботі було продемонстровано, що розмір утворених ембріодних агрегатів впливає на процес диференціювання і може підвищити його ефективність. Оскільки процес диференціювання в спеціальних планшетах є вартісним, довготривалим і має обмеження в кількості утворених агрегатів він не може бути застосований для масового виробництва кардіоміоцитів. Методом «висячої краплі» досягається найбільша площа ділянок ЕТ, що скорочуються. Однак, виконання процедур, необхідних для формування, дозрівання та прикріплення ЕТ, вимагає значних затрат часу та навиків дослідника. Кількість ЕТ, отриманих з плюрипотентних стовбурових клітин шляхом їх культивування в суспензійній культурі з постійним перемішуванням, становила 15000 – 20000 на одну 100 мм чашку Петрі, що в десятки разів перевищувало кількість ЕТ, отриманих методом «висячої краплі» (120 – 150 ЕТ на одну 100 мм чашку Петрі) та в спеціальних планшетах (9600 ЕТ на 1 культуральний планшет).

Таким чином, найперспективнішим для отримання необхідної кількості кардіоміоцитів *in vitro* для використання в подальших дослідженнях виявився метод отримання ЕТ в суспензійній культурі. Саме він може стати основою для розробки пацієнт-специфічної терапії серцево-судинних захворювань.

Вплив циклоспорину на процес диференціювання плюрипотентних стовбурових клітин в кардіоміоцити. Під час експериментів з трансплантацією кардіоміоцитів у пошкоджену ділянку серця миші, було виявлено, що там, де застосовували циклоспорин для імуносупресії, збільшувалась кількість клітин, що скорочуються [Fujivara M., 2011]. Циклоспорин це – циклічний пептид, який застосовують як імуносупресант під час трансплантації шкіри, серця, нирок, кісткового мозку, легенів та інших органів. Для встановлення оптимального терміну дії циклоспорину було перевірено три схеми його застосування (для обох клітинних ліній): схема 1: за три дні до початку формування ЕТ і до 3-ї доби їх формування; схема 2: з 1-ї доби культивування ЕТ до 3-ї доби; схема 3: з 4-ї доби до 9-ї доби культивування ЕТ.

За даними протокової цитофлуориметрії додавання циклоспорину в середовище культивування за схемою 3 збільшувало вихід кардіоміоцитів вдвічі для ЕСК та в півтора раза для ІПСК. Однак, кількість отриманих кардіоміоцитів була

більшою в ПСК і становила 2,46% в порівнянні з 1,28%, отриманих з ЕСК (табл. 1, рис. 7). Тобто, використання циклоспорину, як індуктора диференціювання, є ефективним як для ЕСК, так і для ПСК.

Таблиця 1

Порівняння ефективності диференціювання ЕСК та ПСК з додаванням та без циклоспорину

Клітинні лінії	Спосіб культивування	Доба культивування				
		9	11	13	15	17
ЕСК	Без додавання циклоспорину	1,15%	3,06%	1,49%	0,90%	0,61%
	З додаванням циклоспорину	2,00%	4,59%	2,84%	1,98%	1,40%
ПСК	Без додавання циклоспорину	1,05%	1,46%	1,04%	0,81%	0,68%
	З додаванням циклоспорину	1,58%	2,4%	1,6%	1,32%	1,01%

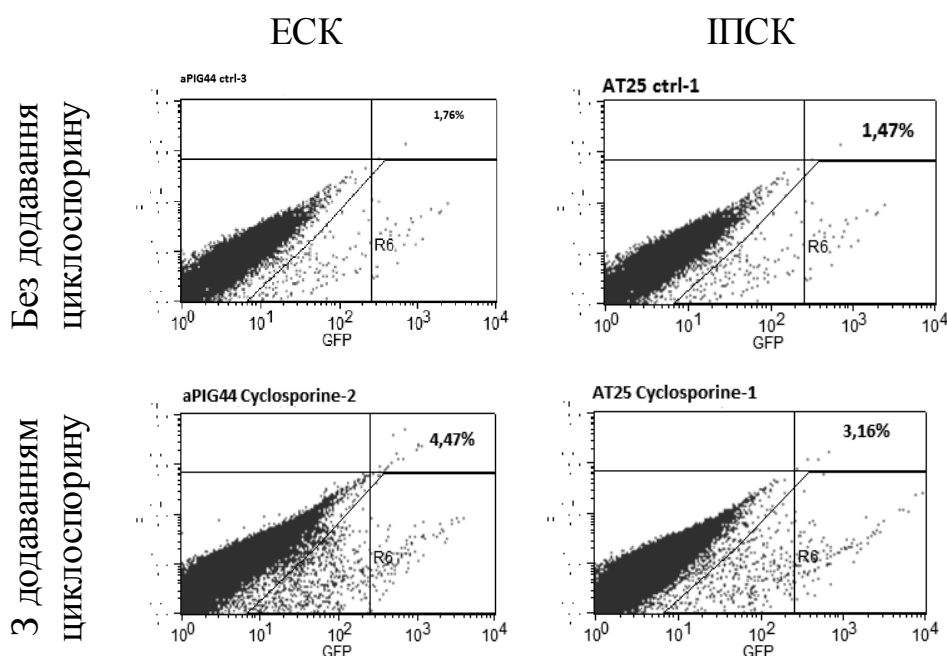


Рис. 7. Протокова цитометрія ЕСК та ПСК за GFP+ маркером диференційованих у кардіоміоцитарному напрямку в умовах культивування з циклоспорином та без нього.

Застосування циклоспорину за іншими двома схемами не було ефективним. Якщо застосування циклоспорину з першої до третьої доби диференціювання пригнічувало розвиток кардіогенних клітин, то додавання циклоспорину до початку формування ембріодних тілець повністю гальмувало диференціювання.

Відомо, що циклоспорин впливає на внутрішньоклітинний кальцій, який, запускаючи сигнальні каскади в цитозолі, активує процес диференціювання кардіоміоцитів. Комплекс, утворений між циклоспорином А та циклофіліном А всередині клітини, інгібує кальцій- та кальмодулінзалежну протеїнофосфатазу 2В. Важливою властивістю циклоспорину є його вплив на білки родини NF/AT, які регулюють утворення судин серця [Jansen Of Lorkeers S.J., 2014]. Нещодавно було

доведено, що циклоспорин має протиапоптичний ефект [Chi J., 2012]. Циклоспорин виявляє стимулюючу дію на ендogenousні попередники кардіоміоцитів, що сприяє регенерації власних клітин серця пацієнта.

Вплив ДМСО на процеси диференціювання ембріональних стовбурових клітин та індукованих плюрипотентних стовбурових клітин у кардіоміоцити. Умови культивування ЕСК та ІПСК були однаковими: схема 1 – ДМСО додавали в живильне середовище за 3 доби до початку диференціювання до 3-ї доби диференціювання, схема 2 – з 1-ї до 3-ї доби, схема 3 – з 4-ї доби диференціювання до 9-ї доби, схема 4 – з 5-ї доби диференціювання до 9-ї доби. Найбільш ефективним виявилось диференціювання ЕСК під дією ДМСО, який додавали з 5-ї до 9-ї доби диференціювання (рис. 8, рис. 9). Додавання ДМСО на ранніх етапах диференціювання ЕСК майже повністю пригнічувало диференціювання плюрипотентних клітин в кардіоміоцити.

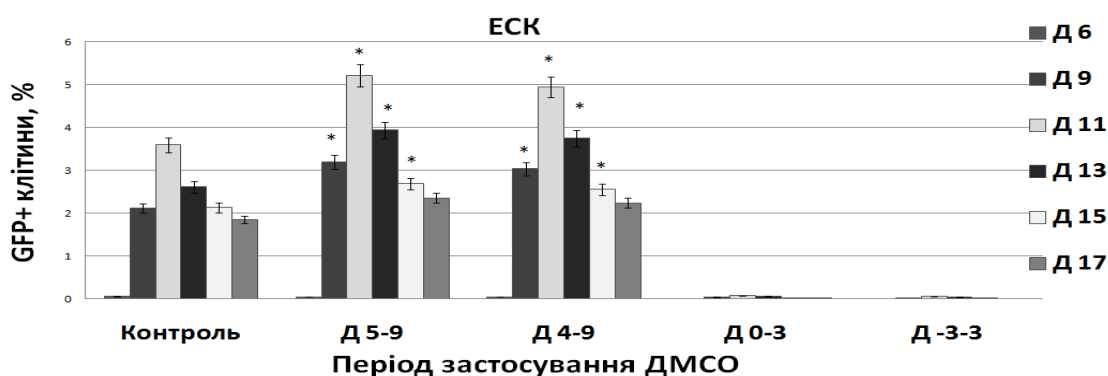


Рис. 8. Ефективність диференціювання ЕСК в кардіоміоцити з додаванням ДМСО.

Примітка: * $p < 0,05$ відносно значень контролю. Д – доба культивування.

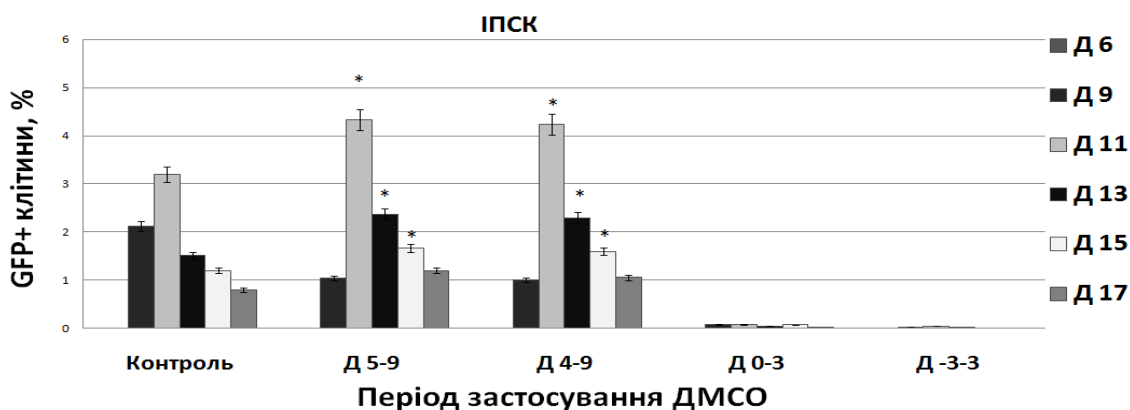


Рис. 9. Ефективність диференціювання ІПСК в кардіоміоцити з додаванням ДМСО.

Примітка: * $p < 0,05$ відносно значень контролю. Д – доба культивування.

Механізми впливу ДМСО на процеси культивування клітин досі залишаються невідомими. Проте, Chetty S. та співавтори показали, що додавання ДМСО до початку формування ембріональних тілець та початку процесів диференціювання в

деяких лініях ЕСК та ПСК людини підвищує ефективність подальшого процесу диференціювання в екто-, ендо- та мезодермальному напрямках. Дослідниками було показано, що присутність 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 [Chetty S., 2013].

Натомість, аналіз результатів проведених досліджень свідчить, що додавання ДМСО за три дні до початку формування ембріїдних 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 з результатами, опублікованими в роботі Czysz K., яка вважає, що механізм дії ДМСО може бути незалежним від контрольних точок клітинного циклу [Czysz K., 2014]. Можливо, ДМСО пригнічує експресію генів плюрипотентності вже після того, як були запущені механізми диференціювання клітин.

В результаті проведених досліджень отримані дані, які свідчать про те, що додавання в культуральне середовище 1% ДМСО на етапі формування як мезодермальних клітин, так і клітин-попередників кардіоміоцитів сприяє диференціюванню плюрипотентних стовбурових клітин в кардіоміоцитарному напрямку. Проте, додавання ДМСО до початку формування ЕТ пригнічує процес диференціювання. Таким чином, 1% ДМСО не проявляє токсичної дії і може бути використаний для оптимізації умов культивування і накопичення кардіоміоцитів для подальшої трансплантації.

Застосування QS11 для покращення диференціювання плюрипотентних стовбурових клітин. Відомо, що β /Wnt-катеніновий шлях передачі сигналів є ключовим фактором кардіогенезу; він активується на початку розвитку серця ссавців. В 2007 році Zhang Q. та співавтори ідентифікували раніше невідомий активатор β /Wnt-катенінового сигнального шляху – малу молекулу QS11 [Zhang Q., 2007]. Дослідивши дію QS11 на процес диференціювання ПСК в кардіоміоцити, ми встановили, що найбільш ефективним було використання QS11 в поєднанні з аскорбіновою кислотою з 4-ї до 9-ї доби диференціювання (рис. 10, рис. 11).

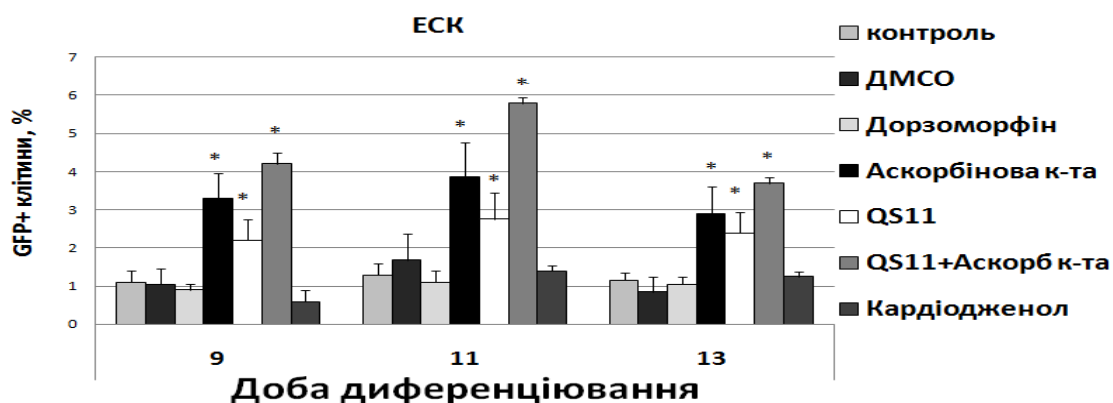


Рис. 10. Ефективність диференціювання ЕСК в кардіоміоцити з додаванням QS11.

Примітка: * $p < 0,05$ відносно значень контролю. QS11+AA – кардіоміоцити з додаванням аскорбінової кислоти та QS11 в середовище культивування.

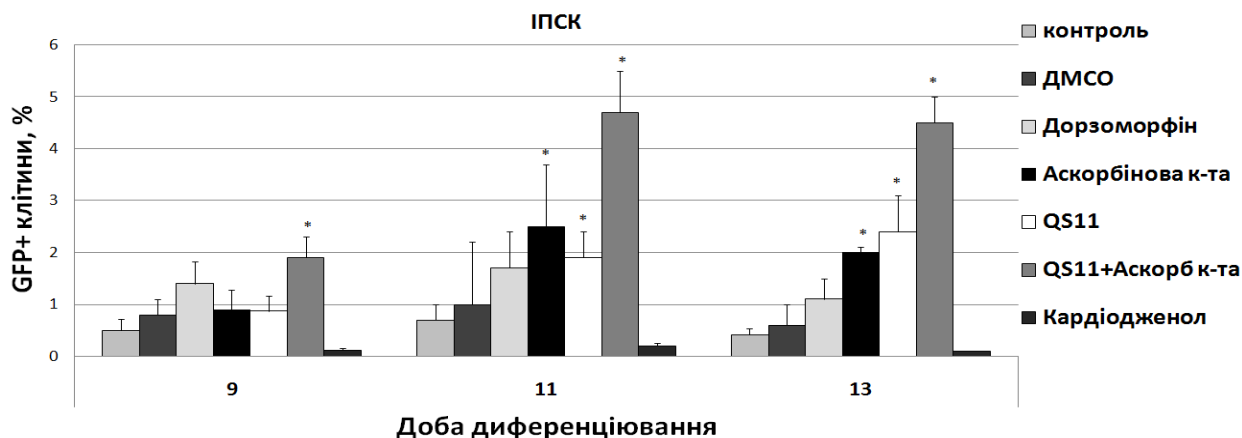


Рис. 11. Ефективність диференціювання ІПСК в кардіоміоцити з додаванням QS11.

Примітка: * $p < 0,05$ відносно значень контролю. QS11+AA – кардіоміоцити з додаванням аскорбінової кислоти та QS11 в середовище культивування.

Застосування цієї ж сполуки з 1-ї до 2-ї доби культивування та з 1-ї до 9-ї доби диференціювання не впливало на кількість отриманих кардіоміоцитів. Цей факт може свідчити про наявність визначеного проміжку часу, коли діє дана сполука.

Найбільш ефективним було використання QS11 в поєднанні з аскорбіновою кислотою. Максимальна кількість GFP+ клітин, отриманих з ЕПСК, становила $5,8 \pm 1,2\%$ на 11-ту добу диференціювання та $4,7 \pm 0,8\%$, GFP+ клітин, отриманих з ІПСК, що було значно більше, ніж під час використання окремо QS11, або аскорбінової кислоти. Отже, застосування QS11 разом з аскорбіновою кислотою має синергічний ефект, як для ЕСК, так і для ІПСК. Однак, ця дія спостерігається лише у визначені нами проміжки часу. QS11 активує β /Wnt-катеніновий сигнальний шлях та є інгібітором білку ARFGAP, який регулює ARF-фактор [Zhang Q., 2007]. Ми припускаємо, що механізм впливу QS11 на диференціювання кардіоміоцитів пов'язаний саме з канонічним β /Wnt-катеніновим сигнальним шляхом.

Функціональні властивості кардіоміоцитів отриманих з плюрипотентних стовбурових клітин. З метою дослідження електрофізіологічних властивостей кардіоміоцитів миші, отриманих в культурі клітин *in vitro*, вивчали потенціали дії клітин з ЕСК та ІПСК в процесі диференціювання в суспензійній культурі з постійним перемішуванням з додаванням факторів у середовище культивування.

В якості контролю використовували клітини з ЕСК та ІПСК без додавання факторів в процесі диференціювання. Селекцію диференційованих кардіоміоцитів проводили культивуючи клітини в середовищі з пуроміцином. Вимірювання потенціалів дії проводили на 30-ту добу культивування. В усіх групах клітин застосування ізопротеренолу значно збільшувало частоту скорочення, в той час як додавання карбохолу зупиняло скорочення (рис. 12).

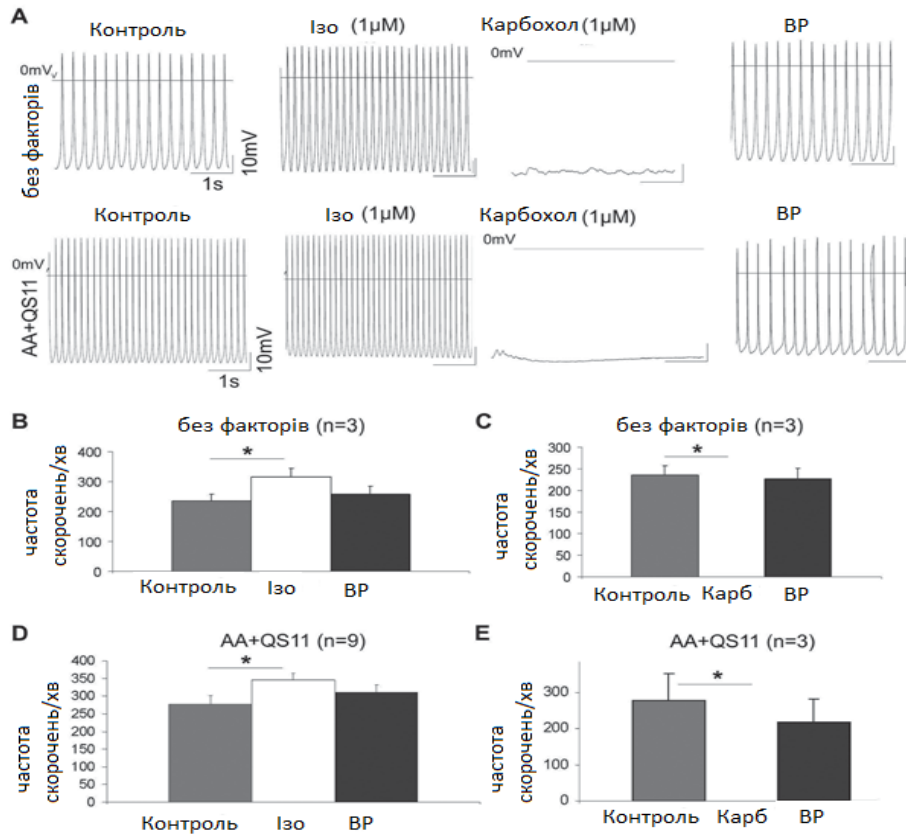


Рис. 12. Електрофізіологічні властивості кардіоміоцитів, диференційованих з ПСК. А – фіксація потенціалів дії методом локальної фіксації потенціалу клітинної мембрани в конфігурації «current-clamp». В, С, D, Е – вплив ізопротеренолу (В, D) та карбохолу (С, Е) на частоту спонтанного скорочення кардіоміоцитів без додавання факторів (В, С) та з використанням аскорбінової кислоти разом з QS11 під час диференціювання кардіоміоцитів.

Примітка: * $p < 0,05$ відносно значень контролю. Без факторів – кардіоміоцити без додавання факторів; AA+QS11 – кардіоміоцити з додаванням аскорбінової кислоти та QS11 в середовище культивування; Ізо – ізопротеренол; Карб – карбохол; BP – вимивання речовин. Дані представлені у вигляді середніх значень (число аналізованих клітин в кожній групі зазначено в дужках).

Для кардіоміоцитів, які використовувались як контроль без додавання факторів, так само, як і для кардіоміоцитів отриманих з додаванням факторів, вимірювали типові потенціали дії. Виявилось, що електрофізіологічні властивості кардіоміоцитів, отриманих з плюрипотентних стовбурових клітин у присутності факторів, які сприяли диференціюванню (аскорбінова кислота та синергіст β /wnt-катенінового шляху QS11) не відрізняються від контрольних показників, притаманних для пренатальних кардіоміоцитів миші.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення та нове вирішення актуальної задачі щодо визначення особливостей проліферації та диференціювання

ембріональних та індукованих плюрипотентних стовбурових клітин миші в кардіоміоцити в умовах впливу різних диференційних факторів.

1. Отримано ембріодні тілця з ембріональних та індукованих плюрипотентних стовбурових клітин миші в культурі клітин *in vitro*.

2. Показано, що розмір ембріодних тілець суттєво впливає на ефективність диференціювання клітин. Найбільший відсоток GFP+ клітин отримано з ембріодних тілець з щільністю посіву 500 клітин; він становив $2,86 \pm 0,30\%$ кардіоміоцитів від загальної кількості клітин ($p \leq 0,05$) в порівнянні з ембріодними тільцями з іншою щільністю посіву (250, 750, 1000, 2000).

3. Прикріплення ембріодних тілець до поверхні субстрату на 5-ту добу покращує ефективність процесів диференціювання. Проте, прикріплення ембріодних тілець на більш ранніх етапах їх формування сповільнює процес диференціювання.

4. Серед сполук, які сприяють диференціюванню (циклоспорин, кардіодженол, дорзоморфін, ДМСО, аскорбінова кислота), найбільш ефективним виявився циклоспорин. Додавання циклоспорину з 4-ї до 9-ї доби формування ембріодних тілець призводило до збільшення кількості GFP+ клітин та площі скоротливих осередків в ембріодних тільцях у порівнянні з контролем ($p \leq 0,05$).

5. Застосування QS11 разом з аскорбіновою кислотою мало синергічний ефект, як для ембріональних стовбурових клітин, так і для індукованих плюрипотентних стовбурових клітин. Однак дія цих молекул можлива лише в визначений проміжок часу, а саме з 4-ї до 9-ї доби диференціювання.

6. Найбільш ефективною схемою підвищення ефективності диференціювання плюрипотентних стовбурових клітин в кардіоміоцити є культивування клітин з ембріодних тілець в суспензійній культурі з постійним перемішуванням за умов додавання циклоспорину, що збільшує вихід кардіоміоцитів удвічі для ембріональних стовбурових клітин та в 1,5 раза для індукованих плюрипотентних стовбурових клітин в порівнянні з контролем без додавання фактору ($p \leq 0,05$).

7. Розроблений спосіб диференціювання плюрипотентних стовбурових клітин є підґрунтям для створення протоколів отримання визначеної кількості життєздатних кардіоміоцитів для подальшої трансплантації.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ РОБІТ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Budash G. Comparison of methods for cardiomyocyte differentiation of embryonic stem and pluripotent cells / Budash G., Saric T., Heschler J., Malysheva S., Wilko D., Wilko N. // Наукові записки НаУКМА. – 2011. – Т. 119. – С. 26-38. (Внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень, статистична обробка результатів, аналіз і формулювання висновків, написання статті).

2. Будащ Г.В. Диференціювання у кардіоміоцити окремих клонів індукованих плюрипотентних стовбурових клітин миші / Малишева С.В., Будащ Г.В., Білько Н.М., Хешлер Ю. // Фізіологічний журнал. – 2013. – Т. 59. – № 3. – С. 10-18. (Внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень, статистична обробка результатів, аналіз і формулювання висновків, написання статті).

3. Budash G. Ascorbic acid-induced cardiac differentiation of murine pluripotent stem cells: transcriptional profiling and effect of a small molecule synergist of Wnt/ β -catenin signaling pathway / Ivanyuk D., Budash G., Zheng Y., Gaspar J.A. // Cellular Physiology and Biochemistry. – 2015. – Vol. 36. – N. 2. – P. 1-22. (Внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень, статистична обробка частини результатів та їх аналіз).

4. Budash G.V. Differentiation of pluripotent stem cells into cardiomyocytes is influenced by size of embryoid bodies / Budash G.V., Bilko D.I., Bilko N.M. // Biopolymers and Cell. – 2016. – Vol. 32. – N. 2. – P. 118-125. (Внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень, статистична обробка результатів, аналіз і формулювання висновків, написання статті).

5. Будащ Г. Диференціювання індукованих плюрипотентних стовбурових клітин в кардіоміоцити в суспензійній культурі з постійним перемішуванням та в спеціальних планшетах з мікролунками / Будащ Г., Білько Н. // Вісник київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія Біологія. – 2016. – Т. 1 (71). – С. 46-50. (Внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень, статистична обробка результатів, аналіз і формулювання висновків, написання статті).

6. Будащ Г.В. Ембріональні стовбурові клітини. Перспективи та проблеми їх використання / Білько Д.І., Малишева С.В., Будащ Г.В., Чапля О.В., Білько Н.М. // Проблеми екологічної біотехнології. – 2012. – № 1. [електрон. наук. фахове вид.] – URL <http://ecobio.nau.edu.ua/index.php/ecobiotech/article/view/757> (Внесок здобувача: написання одного з розділів статті).

7. Будащ Г.В. Застосування циклоспорину для підвищення ефективності диференціювання плюрипотентних клітин в кардіоміоцити / Будащ Г.В., Білько Н.М., Білько Д.І., Сарич Т. // Збірник наукових праць «Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології» – 2012. – Т. 4. – № 12. – С. 58-67. (Внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень, статистична обробка результатів, аналіз і формулювання висновків).

8. Патент України № 75876. Спосіб диференціювання стовбурових клітин в кардіоміоцити / Будащ Г.В., Малишева С.В., Білько Д.І., Білько Н.М. – опублікований від 10.02.12. – Офіційний бюлетень «Промислова власність». – 2012. – Т. 23. – С. 1-6. (Внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень, статистична обробка результатів, аналіз і формулювання висновків).

9. Будащ Г.В. Визначення найбільш оптимального методу диференціювання в клітини серця ембріональних стовбурових та індукованих плюрипотентних клітин миші / Будащ Г.В. // «Біологія від молекули до біосфери»: збірник тез 6-ї міжнародної конференції молодих науковців. – Харків. – 2011. – С. 99-100.

10. Будащ Г. Контроль гетерогенності формування ембріодних тілець впливає на індукцію диференціювання плюрипотентних стовбурових клітин в кардіоміоцити / Будащ Г., Малишева С., Білько Д. // «Роль інновацій у підвищенні наявного потенціалу країни»: матеріали міжнародної науково-практичної інтернет конференції. – Тернопіль. – 2011. – С. 59-60.

11. Будащ Г.В. Вдосконалення методів диференціювання ембріональних стовбурових та індукованих плюрипотентних клітин миші в кардіоміоцити / Будащ Г.В., Білько Д.І., Малишева С.В. // «Актуальні проблеми біохімії та

біотехнології – 2012»: Конференція-конкурс робіт молодих учених. – Український біохімічний журнал. – 2012. – Т. 84. – № 4. – С. 59.

12. Будаш Г. Оптимізація диференціювання стовбурових та індукованих плюрипотентних клітин миші в кардіоміоцити / Будаш Г., Малишева С. // «Молодь і поступ біології: збірник тез VIII Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів». – Львів. – 2012. – С. 389.

13. Будаш Г.В. Ефективні методи та індуктори диференціювання ембріональних стовбурових та індукованих плюрипотентних клітин миші в кардіоміоцити / Будаш Г.В., Білько Д.І., Малишева С.В., Білько Н.М. // «Актуальні проблеми регенеративної медицини»: Науково-практична конференція з міжнародною участю. – Журнал національної академії медичних наук України. – Київ. – 2012. – Т. 18 (додаток). – С. 26-26.

14. Будаш Г. Диференціювання ембріональних стовбурових та індукованих плюрипотентних клітин миші в кардіоміоцитарному напрямку / Будаш Г., Білько Д., // Наукова конференція з міжнародною участю, присвяченій 40-річчю Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, 2012; Проблеми кріобіології. – 2012. – Т. 22. – № 3. – С. 290.

15. Будаш Г.В. Диференціювання плюрипотентних стовбурових клітин миші в кардіоміоцити методом отримання ембріодних тілець в суспензійній культурі з постійним перемішуванням / Будаш Г.В. Білько Д.І., Малишева С.В., Саріч Т. // «Біологія: від молекули до біосфери»: Матеріали VII Міжнародної конференції молодих науковців. – Харків. – 2012. – С. 69.

16. Будаш Г. Застосування QS11- синергіста wnt/ β -катенінового сигнального шляху для покращення диференціювання плюрипотентних стовбурових клітин / Будаш Г. // "Фундаментальні та прикладні дослідження в біології та екології": збірник тез IV Міжнародної наукової конференції. – Вінниця. – 2016. – С. 232.

17. Budash G. The way to produce robust amount of cardiomyocytes / Budash G. // BREATH summer school. – Hannover (Germany). – 2015. – P. 4.

18. Budash G.V. Differentiation of pluripotent stem cells into cardiomyocytes is influenced by the seeding density of embryoid bodies / Budash G.V., Bilko N.M. // International Symposium on Cell Biology jointly with 5th Ukrainian Congress for Cell Biology. – Odesa. – 2016. – С. 78.

АНОТАЦІЯ

Будаш Г.В. Оцінка морфофункціональних характеристик плюрипотентних стовбурових клітин та їх диференціювання у напрямку кардіоміоцитів в культурі клітин *in vitro*. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2016.

Перспективними джерелами отримання кардіоміоцитів є стовбурові клітини з плюрипотентними властивостями, а саме ембріональні стовбурові клітини та

індуковані плюрипотентні клітин. Дисертаційна робота присвячена визначенню особливостей проліферації та диференціювання ембріональних та індукованих плюрипотентних стовбурових клітин миші в кардіоміоцити в умовах впливу різних факторів диференціювання. Досліджено вплив щільності посіву клітин, часу прикріплення ембріодних тілець до поверхні та рухливості клітин в суспензії під час формування ембріодних тілець. Виявлено, що найбільш ефективним методом диференціювання, як для ембріональних стовбурових клітин, так і для індукованих плюрипотентних стовбурових клітин, є метод диференціювання в суспензійній культурі з постійним перемішуванням. Вперше доведено синергічний ефект додавання до культурального середовища аскорбінової кислоти разом з QS11. Одержано пріоритетні дані щодо оптимальних термінів додавання циклоспорину. Розроблено схему підвищення ефективності диференціювання плюрипотентних клітин в кардіоміоцити миші.

Ключові слова: індуковані плюрипотентні стовбурові клітини, ембріональні стовбурові клітини, диференціювання стовбурових клітин, кардіоміоцити, циклоспорин.

АННОТАЦІЯ

Будаш Г.В. Оценка морфофункциональных характеристик плюрипотентных стволовых клеток и их дифференцирование в направлении кардиомиоцитов в культуре клеток *in vitro*. - Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.11 – цитология, клеточная биология, гистология. – Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко МОН Украины, Киев, 2016.

Стволовые клетки с плюрипотентными свойствами, а именно эмбриональные стволовые клетки и индуцированные плюрипотентные клетки являются перспективными источниками получения кардиомиоцитов. Диссертация посвящена определению особенностей пролиферации и дифференцировки эмбриональных и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток мыши в кардиомиоциты в условиях воздействия различных факторов дифференцировки. Исследовано влияние плотности посева клеток, времени прикрепления эмбриодных телец к поверхности и подвижности клеток в суспензии во время формирования эмбриодных телец. Выведено, что наиболее эффективным методом дифференцирования, как для эмбриональных стволовых клеток, так и для индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, является метод дифференцирования в суспензионной культуре с постоянным перемешиванием. Впервые доказано синергический эффект добавления к культуральной среде аскорбиновой кислоты вместе с QS11. Получены пріоритетные данные относительно оптимальных сроков добавления циклоспорина. Разработана схема повышения эффективности дифференцирования плюрипотентных клеток в кардиомиоциты мыши.

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, эмбриональные стволовые клетки, дифференцирование стволовых клеток, кардиомиоциты, циклоспорин.

SUMMARY

Budash G.V. Evaluation of morphological and functional characteristics of pluripotent stem cells and their *in vitro* differentiation towards cardiomyocytes in cell culture. – Manuscript.

Dissertation for the degree of Candidate of Biological Sciences degree in specialty 03.00.11 – cytology, cell biology, histology. – Taras Shevchenko National University of Kyiv Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2016.

Pluripotent stem cells such as embryonic stem cells (ESCs) and induced pluripotent stem cells (iPSCs) due to their ability to expand in culture and development potential can be the main source of cardiomyocytes. There are a lot of protocols available for cardiac differentiation from pluripotent stem cells, although the efficiency still might be improved. Low yield of cardiomyocytes is the major hindrance for use of PSCs in developmental studies, drug safety or discovery research, exploration of disease in dish models and tissue repair. The aim of the research was to define the characteristics of proliferation and differentiation of embryonic and induced pluripotent stem cells into murine cardiomyocytes under the influence of various differentiation factors. Transgenic murine iPSC line and ESC line were genetically modified and express IRES-flanked enhanced green fluorescent protein (GFP) under the control of cardiac alpha myosin heavy chain promoter. We applied flow cytometry and fluorescence microscopy to test the efficiency of the differentiation processes.

We investigated the influence of cell seeding density, the time when embryoid bodies were attached to the surface and the mobility of cells in suspension when the embryoid bodies were formed on the process of differentiation. We found that modifying such parameter as seeding density of cells before the formation of embryoid bodies can beneficially effect differentiation of pluripotent stem cells into cardiomyocytes. Among the embryoid bodies formed within range from 250 cells to 2000 cells per embryoid body the highest percentage of GFP+ cells was obtained from embryoid bodies formed with 500 cells. However, this method prolonged the process of differentiation for iPSC and failed to differentiate ESC into cardiomyocytes. Amount of embryoid bodies with beating areas produced with hanging drop method is significantly higher compared to the mass culture method, but this method is very time- and labor-consuming, and could not be applied for large scale production of cardiomyocytes. Attachment of embryoid bodies on early stages of differentiation prolongs the whole process of differentiation. Mass culture method proved to produce the most robust yield of cardiomyocytes. Ascorbic acid and QS11 enhanced cardiac differentiation of murine ESCs and iPSCs greatly when they were applied together. We got the priority data with the optimal timing of cyclosporine applying. The scheme of efficient differentiation of pluripotent cells into cardiomyocytes was obtained.

Keywords: induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells, differentiation of stem cells, cardiomyocytes, cyclosporine.