

УДК 599.323.4:591.1

Г. Будащ, асист., Н. Білько, д-р мед. наук, проф.
Національний університет "Києво-Могилянська академія", Київ

ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ ІНДУКОВАНИХ ПЛЮРИПОТЕНТНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН В КАРДІОМІОЦИТИ В СУСПЕНЗІЙНІЙ КУЛЬТУРІ З ПОСТІЙНИМ ПЕРЕМІШУВАННЯМ ТА В СПЕЦІАЛЬНИХ ПЛАНШЕТАХ З МІКРОЛУНКАМИ

Щоб підвищити ефективність диференціювання індукованих плюрипотентних клітин миші в кардіоміоцити, ми порівняли два методи отримання ембріодних тілець: диференціювання в суспензійній культурі з постійним перемішуванням та формування ембріодних тілець визначеного розміру в мікролунках AggreWell планшет. Використовували трансгенну клітинну лінію індукованих плюрипотентних стовбурових клітин AT25. Клітини лінії експресували IRES-фланкований зелений флуоресцентний білок (eGFP), під контролем кардіоспецифічного α -MHC промотора. Для перевірки ефективності процесів диференціювання були застосовані методи проточної цитометрії та флуоресцентної мікроскопії. Диференціювання плюрипотентних стовбурових клітин у AggreWell планшетах без додавання факторів диференціювання виявилось більш ефективним ніж диференціювання в суспензійній культурі з постійним перемішуванням. Проте перевірявши дію дорзоморфіну, ДМСО, аскорбінової кислоти, G-CSF під час диференціювання згаданими вище методами найбільшу кількість кардіоміоцитів отримали на 11-у добу диференціювання методом суспензійної культури з постійним перемішуванням з додаванням аскорбінової кислоти. Кількість GFP+ клітин становила $2,71 \pm 0,07\%$.

Ключові слова: плюрипотентні стовбурові клітини, індуковані плюрипотентні стовбурові клітини, ембріодні тілця, кардіоміоцити, диференціювання.

Вступ. Диференціація плюрипотентних стовбурових клітин в кардіоміоцити є важливим етапом створення функціональних тканин серця. Найбільш відомим метод індукції диференціювання *in vitro* є формування клітинних агрегатів, які називають ембріодні тілця (ЕТ) [11]. Ззовні ЕТ вкриті шаром ектодермальних клітин, всередині містять ядро з ендодермальних клітин, а між двома цими шарами знаходяться мезодермальні клітини [6]. Для того, щоб стимулювати формування різних типів клітин з ембріональних стовбурових клітин або індукованих плюрипотентних стовбурових клітин (ІПСК) використовуються три основні методи формування ЕТ: формування ЕТ в суспензійній культурі в неадгерентних чашках Петрі, культивування в середовищі з напіврідкою метилцелюлози, та метод "вісячої краплі" [4, 19].

Під час застосування першого методу поодинокі плюрипотентні стовбурові клітин (ПСК) спонтанно об'єднуються і утворюють агрегати клітини. Однак кількість клітин в кожному окремому агрегаті відрізняється. Тому сформовані ЕТ є гетерогеними за розміром та формою [16], і процес диференціації всередині кожного ЕТ відбувається спонтанно і непередбачуваною. За допомогою цього методу були отримані клітин різних типів: нервових клітин-попередники [13], клітин судин [2], кардіоміоцити [8], хондроцити [5], клітини печінки [7] та інші.

Культивування в напіврідкому середовищі, що містить метилцелюлозу переважно використовують для диференціювання гемопоетичних клітин [14]. Окремі клітини висівають в напіврідке середовище, в якому відбувається утворення ЕТ. Недоліком цього способу є те, що матрикс середовища не дозволяє вільне розповсюдження факторів які додаються в ході експерименту. Крім того важко проводити будь-які процедури пов'язані з розкалюванням напівтвердого середовища [10].

ЕТ, сформовані методом вісячої краплі мають тенденцію до утворення клітин мезодермального походження, а саме кардіоміоцитів [15], гладких м'язових клітин [18], хондроцитів [3], клітин нирок [9], адипоцитів [1], гепатоцитів [17] і інших. Цей метод складається з двох етапів: агрегації чітко визначеної кількості ПСК в краплі певного розміру та дозріванні утворених ЕТ під час їх прикріплення до поверхні культурального пластику. Оскільки розмір краплі обмежений до 20-50 мкл, проводити зміну середовища в навколо ЕТ неможливо, а отже майже неможливо впливати на процес диференціювання під час формування ЕТ.

Зважаючи на те наскільки важливим є утворення ЕТ для процесів диференціювання ПСК необхідним є дослідження та покращення методів, які використовуються для формування ЕТ. Тому для того, щоб поліпшити ефективність диференціювання ПСК в кардіоміоцити, ми порівняли два новітні методи отримання ЕТ, які поєднують деякі з переваг основних способів генерації ЕТ. Перший з них це диференціювання в суспензійній культурі з постійним перемішуванням. Неадгерентні чашки Петрі інкубують в CO_2 інкубаторі на горизонтальному орбітальному шейкері. Постійний рух ЕТ покращує їх постачання киснем і дає можливість формувати культури високої щільності [20]. Другий метод це – формування ЕТ визначеного розміру в мікролунках AggreWell планшет. Кожна лунка планшета містить певну кількість міролунок. Після перенесення суспензій клітин різної концентрації у кожній такій мікролунці формується ЕТ визначених розмірів у залежності від заданої кількості клітин в суспензії. Для того щоб сформувати ЕТ розміром 500 клітин кожне використовували суспензію клітин яка містила 6×10^5 клітин в 2 мл середовища диференціювання.

Матеріали та методи. У роботі були використані лінії ІПСК миші AT25. Лінія клітин AT25 була отримана з фібробластів кінчика хвоста миші під дією індукуючих факторів c-myc, Klf4, Sox2, Oct4, Nanog у лабораторії Р. Яніша та А. Мейснера (США). Ця лінія плюрипотентних стовбурових клітин була генетично модифікованою. Клітини експресували пуроміцин-N-ацетил-трансферазу та IRES-зв'язаний зелений флуоресцентний протеїн (GFP) під контролем кардіоспецифічного α -MHC промотора. Генетична модифікація була виконана А. Фатіма в лабораторії Т. Саріча (Німеччина). Здатність кардіоміоцитів експресувати GFP під контролем кардіоспецифічного α -MHC промотора дала нам змогу застосувати методи проточної цитофлуориметрії та флуоресцентної мікроскопії для перевірки ефективності процесів диференціювання [12].

Недиференційовані лінії стовбурових клітин підтримували на підложці з фідерних клітин, отриманих із лінії фібробластів миші MEF-Neo у поживному середовищі, що складалось із середовища DMEM (Invitrogen, Німеччина), до якого додавали 15 % фетальної телячої сироватки (FBS, Invitrogen, Німеччина), 1 % незамінних амінокислот (Invitrogen, Німеччина), 50 μM 2-меркаптоетанолу (Invitrogen, Німеччина) та 1000 Од/мл ростового фактору LIF (Millipore, США).

Під час диференціювання у планшетах AggreWell (AggreWell, StemCell Technologies) використовували 6×10^5 клітин у 2 мл середовища диференціювання. Такий об'єм одноклітинної суспензії поміщали у кожен лунку планшети AggreWell, яка містила мікролунки. З кожної такої лунки можна отримати до 1200 ЕТ. Клітини культивували у планшетах 48 год. у CO_2 -інкубаторі за температури 37°C та 5 % CO_2 . Середовище диференціювання складалось із середовища IMDM (Invitrogen, Німеччина), до якого додавали 20 % FBS, 1 % незамінних амінокислот, $50 \mu\text{M}$ 2-меркаптоетанолу. 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 CO_2 -інкубаторі на орбітальному шейкері (GFL 3006, GFL, Braunschweig, Німеччина). Середовище культивування замінювали через 7 діб, на 9-у добу після формування ЕТ.

Починаючи з 6-ої доби після початку формування ЕТ кожної доби визначали наявність ЕТ, що спонтанно скорочуються та наявність GFP+ клітин. Після 9-ої доби від початку процесу диференціювання перевірку і підрахунок ЕТ, що містять кардіоміоцити, проводили кожної 2-ої доби, тобто на 9-ту, 11-ту, 13-ту, 15-ту, 17-ту добу диференціювання.

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

Проточну цитофлуориметрію проводили на проточному цитофлуориметрі FACScan (BD Pharmingen), при цьому набирали популяцію з 10000 клітин. Аналіз даних проводили за допомогою програмного забезпечення FSC Express 4 Flow Research Edition (De Novo Software, США). Наявність мертвих клітин визначали із використанням забарвлення пропідієм йодидом (Sigma, Німеччина). Підрахунок кількості живих клітин проводили в гемоцитометрі за стандартною методикою.

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

Результати та їх обговорення. Для того щоб підвищити ефективність диференціювання ПСК в кардіоміоцитів, ми порівняли два новітні методи отримання ЕТ: диференціювання в суспензійній культурі з постійним перемішуванням та формування ЕТ визначеного розміру в мікролунках AggreWell планшет.

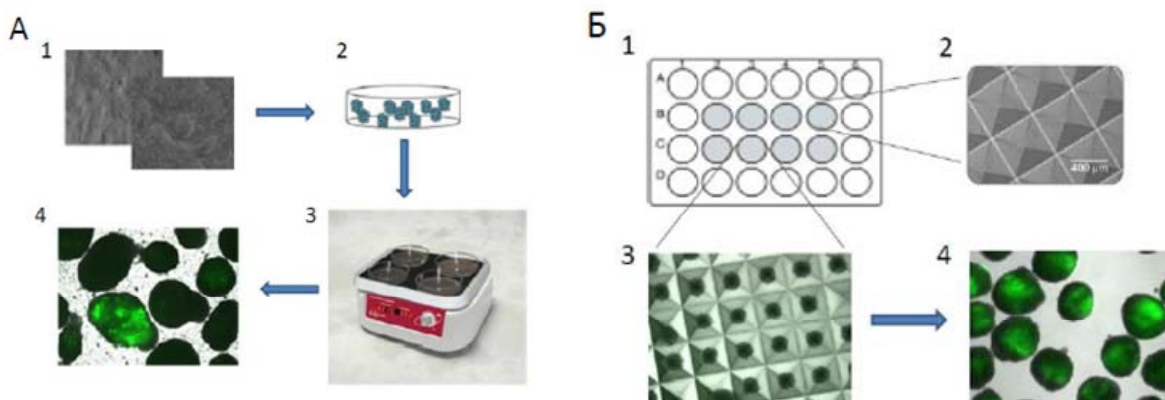


Рис. 1. Схематичне зображення процесу диференціювання ПСК в кардіоміоцити різними методами

А – у суспензійній культурі з постійним перемішуванням: 1 – культура ПСК; 2 – ембріодні тільця в чашці Петрі;

3 – чашки Петрі з ембріодними тільцями на орбітальному шейкері; 4 – ембріодні тільця після культивування.

Б – формування ЕТ визначеного розміру в мікролунках AggreWell планшет: 1 – схематичне зображення AggreWell планшет;

2 – схематичне зображення мікролунок; 3- ембріодні тільця в AggreWell планшеті;

4 – ембріодні тільця після культивування в AggreWell планшетах

Результати порівняння динаміки диференціювання ІПСК в AggreWell планшетах та суспензійній культурі з постійним перемішуванням показали, що під час диференціювання клітин у планшетах AggreWell спостерігалось подовження часу диференціювання у порівнянні з часом диференціювання в суспензійній культурі (рис. 2.). Так, у суспензійній культурі перші поодинокі GFP+клітини були помітні на 7-у добу диференціювання;

на 9-у добу $1,21 \pm 0,01$ % всіх клітин становили кардіоміоцити, які спонтанно скорочувалися. Максимальну кількість кардіоміоцитів отримували на 11-у добу культивування у чашках Петрі з постійним горизонтальним перемішуванням. Кількість GFP+клітин становила $1,38 \pm 0,02$ %. Починаючи з 13-ої доби культивування, кількість кардіоміоцитів у культурі скорочувалася і становила $0,86 \pm 0,003$ % на 13-удобу і $0,63 \pm 0,01$ % на 15-у добу.

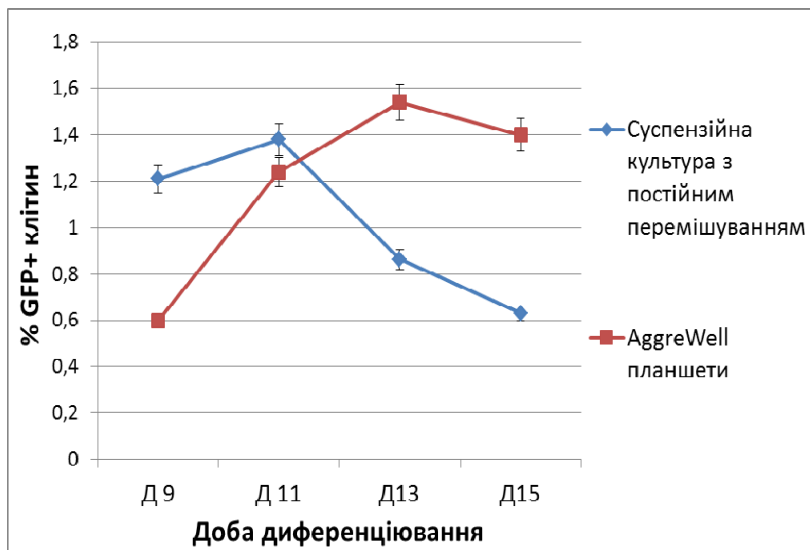


Рис. 2 Динаміка диференціювання ІПСК у суспензійній культурі з постійним перемішуванням та методом формування ЕТ визначеного розміру в мікролунках AggreWell планшет

При формуванні ЕТ у планшетах AggreWell перші GFP+ клітини спостерігали під флуоресцентним мікроскопом на 8-удобу культивування. На 9-удобу методом проточної цитофлуориметрії виявляли лише $0,6 \pm 0,01$ % кардіоміоцитів, що вдвічі менше, ніж під час диференціювання в суспензійній культурі з постійним перемішуванням. На 11-удобу диференціювання отримували $1,24 \pm 0,02$ % клітин, які спонтанно скорочувалися. І хоча спостерігалася різниця в $0,14 \pm 0,01$ % між культивуванням у планшетах AggreWell і суспензійній культурі, вона була недостовірною ($P \leq 0,05$). Максимальну кількість кардіоміоцитів під час диференціювання у планшетах отримували на 13-удобу культивування. Вона становила

$1,54 \pm 0,03$ % GFP+ клітин і була на 44 % більшою, ніж під час диференціювання методом суспензійної культури, та на 10 % більшою, ніж максимальна кількість кардіоміоцитів, отриманих при диференціюванні в суспензійній культурі на 11-удобу диференціювання.

Паралельно також було досліджено процес диференціювання ЕТ розміром 500 клітин у суспензійній культурі з постійним перемішуванням та у планшетах AggreWell із додаванням факторів, що сприяють диференціюванню. Використовували такі речовини, як аскорбінова кислота (30 ммоль), ДМСО (1%), дорзоморфін (2 мкмоль), G-CSF; у контрольних експериментах фактори не додавали (рис.3.).

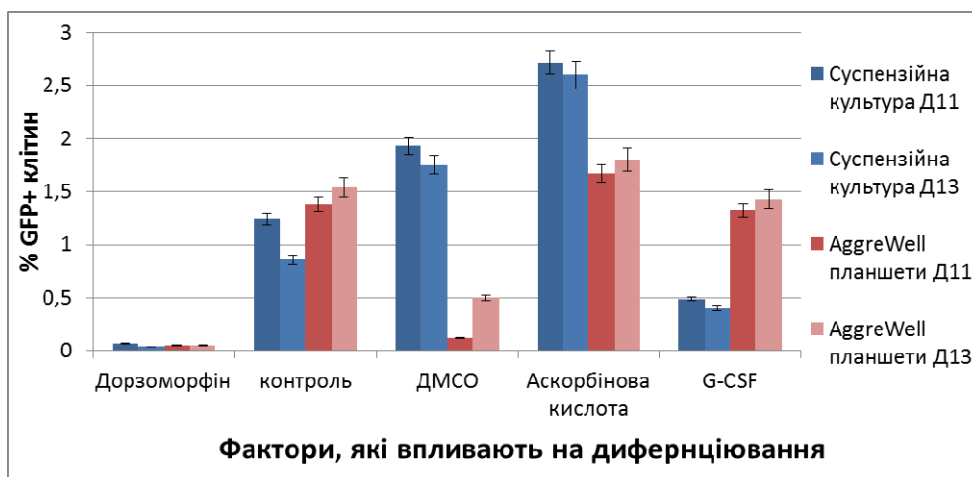


Рис. 3. Ефективність диференціювання ІПСК у кардіоміоцити в планшетах AggreWell та суспензійній культурі з додаванням факторів, які сприяють диференціюванню на 11-у та 13-у добу диференціювання

При застосуванні факторів, що сприяють диференціюванню, тільки в одному випадку в планшетах AggreWell спостерігалася більша кількість кардіоміоцитів, у порівнянні з диференціюванням у суспензійній культурі. Так, застосування G-CSF на 13-удобу диференціювання в планшетах AggreWell збільшувало в 2,9 разів в порівнянні з диференціюванням в суспензійній культурі з застосуванням цього ж фактора на

11-удобу та в 3,6 разів на 13-удобу диференціювання. Було отримано $1,43 \pm 0,001$ % GFP+ клітин в планшетах AggreWell на 13-удобу, в той час як у суспензійній культурі отримали $0,49 \pm 0,002$ % і $0,4 \pm 0,003$ % на 11-у та 13-у добу диференціювання.

При застосуванні аскорбінової кислоти і ДМСО відбувалося достовірне збільшення кількості отриманих кардіоміоцитів у суспензійній культурі в порівнянні із

застосуванням планшетів AggreWell. Ефективність диференціювання із застосуванням аскорбінової кислоти в суспензійній культурі в середньому була в 1,5 разу більшою, ніж під час диференціювання в планшетах AggreWell. Так, під час диференціювання в суспензійній культурі на 11-добу було отримано $2,71 \pm 0,07$ % кардіоміоцитів, на 13-добу – $2,6 \pm 0,06$ %, а під час диференціювання в AggreWell планшетах – $1,67 \pm 0,02$ % і $1,8 \pm 0,04$ %, відповідно.

У разі диференціювання з додаванням до живильного середовища ДМСО максимальну кількість кардіоміоцитів отримували в суспензійній культурі на 11-добу диференціювання; вона становила $1,93 \pm 0,03$ % диференційованих клітин. У той же час додавання ДМСО у планшети AggreWell пригнічувало процес диференціювання. Так, якщо в контролі на 11-добу було отримано $1,38 \pm 0,1$ % GFP+ клітин, то в разі додавання фактора їх кількість на цей час зменшувалось до $0,12 \pm 0,001$ % від загальної кількості клітин в суспензії, а на 13-добу вона становила $0,5 \pm 0,02$ % у порівнянні із $1,54 \pm 0,03$ % у контролі.

Додавання дорзорморфіну пригнічувало диференціювання при застосуванні обох методів до межі нульових значень; їх кількість коливалася в межах від $0,04 \pm 0,001$ % до $0,07 \pm 0,001$ % GFP+ клітин.

Диференціювання ІПСК у AggreWell планшетах виявилось більш ефективним ніж диференціювання в суспензійній культурі, проте такий метод займає більше часу. Максимальну кількість диференційованих клітин отримували лише на 13-у добу диференціювання. Крім того, оскільки, даний метод є дуже коштовним, лініє специфічним, довготривалим і має обмеження в кількості утворених агрегатів він не може бути застосований для масового виробництва кардіоміоцитів.

Кількість ЕТ, отриманих з плюрипотентних стовбурових клітин шляхом їх культивування в CO₂-інкубаторі з додаванням середовища диференціювання в суспензійній культурі з постійним перемішуванням становила 15000 – 20000 на одну 10 см чашку Петрі, що в десятки разів перевищувало кількість ЕТ, отриманих з стовбурових клітин спеціалізованих планшетах, де з однієї лунки можна отримати 1200 ЕТ, а загалом з планшети можна отримати до 9600 ЕТ.

Таким чином, на сьогодні найперспективнішим для отримання максимальної кількості кардіоміоцитів *in vitro* для використання в замісній терапії виявився метод отримання ЕТ в суспензійній культурі. Саме він може стати основою для розробки пацієнтспецифічної терапії серцево-судинних захворювань ІПСК в майбутньому.

Висновки. Результати дослідження вказують, що диференціювання ІПСК у AggreWell планшетах без додавання факторів диференціювання виявилось більш ефективним ніж диференціювання в суспензійній культурі з постійним перемішуванням. Проте перевіривши дію дорзорморфіну, ДМСО, аскорбінової кислоти, G-CSF під час диференціювання в суспензійній культурі з постійним перемішуванням та в спеціалізованих планшетах з мікролунками найбільшу кількість кардіоміоцитів отримали на 11-у добу диференціювання методом суспензійної культури з додаванням аскорбінової кислоти. Кількість GFP+ клітин становила $2,71 \pm 0,07$ %.

Список використаної літератури

1. Dani C. Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes *in vitro* / C. Dani, A.G. Smith, S. Dessolin [et al.] // J. Cell Sci. – 1997. – Vol. 110. – P.1279–1285. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9202388>

2. Feraud O. Embryonic stem cell derived embryoid bodies development in collagen gels recapitulates sprouting angiogenesis / O. Feraud, Y. Cao, D. Vittet // Lab. Invest. – 2001. – Vol. 81, N 12. – P.1669–1681. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11742037>

3. Hegert C. Differentiation plasticity of chondrocytes derived from mouse embryonic stem cells / C. Hegert, J. Kramer, G. Hargus [et al.] // J. Cell. Sci. – 2002. – Vol. 115. – P.4617–4628. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12415006>

4. Höpfl G. Differentiating embryonic stem cells into embryoid bodies / G. Höpfl, M. Gassmann, I. Desbaillets // Methods Mol. Biol. – 2004. – Vol. 254. – P.79–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15041757>

5. Hwang N.S. Enhanced chondrogenic differentiation of murine embryonic stem cells in hydrogels with glucosamine / N.S. Hwang, S. Varghese, P. Theprungsirikul [et al.] // J. Biomaterials. – 2006. – Vol. 27, N 36. – P.6015–6023. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16872674>

6. Itskovitz-Eldor J. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies comprising the three embryonic germ layers / J. Itskovitz-Eldor, M. Schuldiner, D. Karsenti [et al.] // Mol. Med. – 2000. – Vol. 6, N 2. – P.88–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10859025>

7. Jones E.A. Hepatic differentiation of murine embryonic stem cells / E. Jones, D. Tosh, D.I. Wilson [et al.] // Exp. Cell Res. – 2002. – Vol. 272, N 1. – P.15–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11740861>

8. Klug M.G. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts / M.G. Klug, M.H. Soonpaa, G.Y. Koh [et al.] // J. Clin. Invest. – 1996. – Vol. 98, N 1. – P.216–224. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8690796>

9. Kramer J. Cells differentiated from mouse embryonic stem cells via embryoid bodies express renal marker molecules / J. Kramer, J. Steinhoff, M. Klinger [et al.] // Differentiation. – 2006. – Vol. 74, N 2-3. – P.91–104. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16533308>

10. Kurosawa H. Methods for inducing embryoid body formation: *in vitro* differentiation system of embryonic stem cells / H. Kurosawa // Journal of bioscience and bioengineering. – 2007. – Vol. 103, N 5. – P.389–398. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17609152>

11. Lee M.Y. High density cultures of embryoid bodies enhanced cardiac differentiation of murine embryonic stem cells / M.Y. Lee, E. Cagavi Bozkulak, S. Schliiffke [et al.] // Biochem Biophys Res Commun. – 2011. – Vol. 416, N 1-2. – P.51–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22079290>

12. Meissner A. Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells / A. Meissner, M. Wernig, R. Jaenisch // Nat Biotechnol. – 2007. – Vol. 25, N 10. – P.1177–1181. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17724450>

13. Plachta N. Developmental potential of defined neural progenitors derived from mouse embryonic stem cells / N. Plachta, B. Bibel, K.L. Tucker [et al.] // Development. – 2004. – Vol. 131, N 21. – P.5449–5456. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15469972>

14. Kennedy M. A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis / M. Kennedy, M. Firpo, K. Choi [et al.] // Nature. – 1997. – Vol. 386, N 6624. – P.488–493. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9087406>

15. Takahashi T. Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiomyocytes / T. Takahashi, B. Lord, P. Schulze [et al.] // Circulation. – 2003. – Vol. 107, N 14. – P.1912–1916. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12668514>

16. Wartenberg M. The embryoid body as a novel *in vitro* assay system for antiangiogenic agents / M. Wartenberg, J. Günther, J. Hescheler, and H. Sauer // Lab. Invest. – 1998. – Vol. 78, N 10. – P.1301–1314. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9800956>

17. Yamada T. *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into hepatocyte-like cells identified by cellular uptake of indocyanine green / T. Yamada, M. Yoshikawa, S. Kanda [et al.] // Stem Cells. – 2002. – Vol. 20, N 2. – P.146–154. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11897871>

18. Yamada T. *In vitro* functional gut-like organ formation from mouse embryonic stem cells / T. Yamada, M. Yoshikawa, M. Takaki [et al.] // Stem Cells. – 2002. – Vol. 20, N 1. – P.41–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11796921>

19. Yoshida Y. Recent stem cell advances: induced pluripotent stem cells for disease modeling and stem cell-based regeneration / Y. Yoshida, S. Yamanaka // Circulation. – 2010. – Vol. 6, N 122. – P.80–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20606130>

20. Zweigerdt R. Generation of confluent cardiomyocyte monolayers derived from embryonic stem cells in suspension: a cell source for new therapies and screening strategies / R. Zweigerdt, M. Burg, E. Willbold [et al.] // Cytotherapy. – 2003. – Vol. 5, N 5. – P.399–413. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14578102>

References

1. Dani C, Smith AG, Dessolin S, Leroy P, Staccini L, Villageois, et al. Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes *in vitro*. J. Cell Sci. 1997; 110:1279–85.

2. Feraud O, Cao Y, Vittet D. Embryonic stem cell-derived embryoid bodies development in collagen gels recapitulates sprouting angiogenesis. *Lab. Invest.* 2001;81(12):1669–81.
3. Hegert C, Kramer J, Hargus G, Müller J, Guan K, Wobus AM, et al. Differentiation plasticity of chondrocytes derived from mouse embryonic stem cells. *J. Cell. Sci.* 2002;115(Pt 23):4617–28.
4. Höpfl G, Gassmann M, Desbaillets I. Differentiating embryonic stem cells into embryoid bodies. *Methods Mol. Biol.* 2004;254:79–98.
5. Hwang NS, Varghese S, Theprungsirikul P, Canver A, Elisseeff J. Enhanced chondrogenic differentiation of murine embryonic stem cells in hydrogels with glucosamine. *Biomaterials.* 2006;27(36):6015–23.
6. Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies comprising the three embryonic germ layers. *Mol. Med.* 2000;6(2):88–95.
7. Jones EA, Tosh D, Wilson DI, Lindsay S, Forrester M. Hepatic differentiation of murine embryonic stem cells. *Exp. Cell Res.* 2002;272(1):15–22.
8. Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J. Clin. Invest.* 1996;98(1):216–24.
9. Kramer J, Steinhoff J, Klinger M, Fricke L, Rohwedel J. Cells differentiated from mouse embryonic stem cells via embryoid bodies express renal marker molecules. *Differentiation.* 2006;74(2-3):91–104.
10. Kurosawa H. Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells. *Journal of bioscience and bioengineering.* 2007;103(5):389–98.
11. Lee MY, Cagavi Bozkulak E, Schliffke S, Amos PJ, Ren Y, et al. High density cultures of embryoid bodies enhanced cardiac differentiation of murine embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;416(1-2):51–7.
12. Meissner A, Wernig M, Jaenisch R. Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* 2007;25(10):1177–81.
13. Plachta N, Bibel B, Tucker KL, Barde Y. A developmental potential of defined neural progenitors derived from mouse embryonic stem cells. *Development.* 2004;131(21):5449–56.
14. Kennedy M, Firpo M, Choi K, Roberts SP, Kabrun N, Keller G. A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis. *Nature.* 1997;386(6624):488–93.
15. Takahashi T, Lord B, Schulze PC, Fryer RM, Sarang SS, Gullans SR, Lee RT. Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circulation.* 2003;107(14):1912–6.
16. Wartenberg M, Günther J, Hescheler J, Sauer H. The embryoid body as a novel in vitro assay system for antiangiogenic agents. *Lab. Invest.* 1998;78(10):1301–14.
17. Yamada T, Yoshikawa M, Kanda S, Kato Y, Nakajima Y, Ishizaka S, Tsunoda Y. In vitro differentiation of embryonic stem cells into hepatocyte-like cells identified by cellular uptake of indocyanine green. *Stem Cells.* 2002;20(2):146–54.
18. Yamada T, Yoshikawa M, Takaki M, Torihashi S, Kato Y, Nakajima Y, et al. In vitro functional gut-like organ formation from mouse embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2002;20(1):41–9.
19. Yoshida Y, Yamanaka S. Recent stem cell advances: induced pluripotent stem cells for disease modeling and stem cell-based regeneration. *Circulation.* 2010;122(8):80–7.
20. Zweigerdt R, Burg M, Willbold E, Abts HF, Ruediger M. Generation of confluent cardiomyocyte monolayers derived from embryonic stem cells in suspension: a cell source for new therapies and screening strategies. *Cytotherapy.* 2003;5(5):399–413.

Надійшла до редколегії 01.04.16

Г.Будаш, асист., Н. Билько, д-р мед. наук, проф.
Национальный университет "Киево-Могилянская академия", Киев, Украина

ДИФФЕРЕНЦИРОВАНИЕ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК В КАРДИОМИОЦИТЫ В СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЕ С ПОСТОЯННЫМ ПЕРЕМЕШИВАНИЕМ И В СПЕЦИАЛЬНЫХ ПЛАНШЕТАХ С МИКРОЛУНКАМИ

Для того чтобы повысить эффективность дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток мыши в кардиомиоциты, мы сравнили два метода получения эмбрионидных телец: дифференцирование в суспензионной культуре с постоянным перемешиванием и формирования эмбрионидных телец определенного размера в микролунках AggreWell планшет. Использовали трансгенную клеточную линию индуцированных плюрипотентных стволовых клеток AT25. Клетки линии экспрессировали IRES-фланкированный зеленый флуоресцентный белок (eGFP), под контролем кардиоспецифического α -MHC промотера. Для проверки эффективности процессов дифференцировки были применены методы проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии. Дифференцирование индуцированных плюрипотентных клеток в AggreWell планшетах без добавления факторов дифференцировки оказалось более эффективным, чем дифференцирование в суспензионной культуре с постоянным перемешиванием. Однако проверка действия дорсоморфина, ДМСО, аскорбиновой кислоты, G-CSF выше перечисленными методами наибольшее количество кардиомиоцитов получили на одиннадцатые сутки методом суспензионной культуры с добавлением аскорбиновой кислоты. Количество GFP+ клеток составила $2,71 \pm 0,07\%$.

Ключевые слова: плюрипотентные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, эмбрионидные тельца, кардиомиоциты, дифференцирование.

G. Budash, assistant, N. Bilko, DSc
National University of "Kyiv-Mohyla Academy", Kyiv, Ukraine

INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS DIFFERENTIATION INTO CARDIOMYOCYTES BY ROTATING SUSPENSION CULTURE AND IN SPECIFIC PLATES WITH MICROWELLS

In order to enhance the differentiation of induced pluripotent cells into cardiomyocytes, we compared two methods of embryoid bodies formation: differentiation in rotating suspension culture and formation of embryoid bodies from a predetermined numbers of pluripotent stem cells in microwells of AggreWell plates. We used transgenic murine induced pluripotent stem cell line AT25. Cell line expressed IRES-flanked enhanced green fluorescent protein (eGFP) under the control of cardiac alpha myosin heavy chain promoter (α MHC). We applied flow cytometry and fluorescence microscopy in order to test the efficiency of differentiation processes. Thus, differentiation of pluripotent stem cells in AggreWell plates without adding differentiation factors was more effective than differentiation in rotating suspension culture. However, we obtained the most amounts of cardiomyocytes on the 11-th day in rotating suspension culture with ascorbic acid, after we applied dorsomorphin, DMSO, ascorbic acid, G-CSF with the above-mentioned methods. The amount of GFP + cells was $2,71 \pm 0,07\%$.

Keywords: pluripotent stem cells, induced pluripotent stem cells, embryoid bodies, cardiomyocytes, differentiation.