**Будаш Галина Володимирівна, асистент кафедри лабо&shy;раторної діагностики біологічних систем Національного уні&shy;верситету &laquo;Києво-Могилянська академія&raquo;: &laquo;Оцінка морфо- функціональних характеристик плюрипотентних стовбуро&shy;вих клітин та їх диференціювання у напрямку кардіоміоцитів в культурі клітин in vitro&raquo; (03.00.11 - цитологія, клітинна біо&shy;логія, гістологія). Спецрада Д 26.001.38 у Київському націо&shy;нальному університеті імені Тараса Шевченка**

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**«КИЄВО-МОГИЛЯНСЬКА АКАДЕМІЯ»**

**На правах рукопису**

**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**

**Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук**

**Науковий керівник**

**завідувач кафедри лабораторної**

**діагностики біологічних систем**

**НУ«Києво-Могилянська академія»**

**МОН України**

**доктор медичних наук, професор**

**Білько Надія Михайлівна**

**Київ 2016**

**2**

**ЗМІСТ**

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ 5**

**ВСТУП 7**

**РОЗДІЛ І. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ 14**

**1.1. Характеристика плюрипотентних стовбурових клітин –**

**ембріональних стовбурових та індукованих плюрипотентних**

**стовбурових клітин**

**14**

**1.2. Диференціювання плюрипотентних стовбурових клітин в**

**кардіоміоцити**

**17**

**1.3. Фактори, що сприяють диференціюванню стовбурових клітин в**

**кардіоміоцити**

**22**

**1.3.1. Основні сигнальні шляхи, задіяні в процесах розвитку серця 27**

**1.4. Порівняння особливостей диференціювання ембріональних**

**стовбурових клітин та індукованих плюрипотентних стовбурових**

**клітин**

**34**

**РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ 37**

**2.1. Клітинні лінії, використані у роботі та умови їх культивування 37**

**2.2. Культивування та підтримання недиференційованого стану**

**ембріональних стовбурових клітин та індукованих**

**плюрипотентних стовбурових клітин**

**40**

**2.3. Спосіб диференціювання ембріональних стовбурових клітин та**

**індукованих плюрипотентних стовбурових клітин в кардіоміоцити**

**в суспензійній культурі з постійним перемішуванням**

**43**

**2.4. Диференціювання в кардіоміоцити методом «висячої краплі» 47**

**2.5. Диференціювання в кардіоміоцити в спеціальних планшетах**

**(AggreWell), які забезпечують гомогенність ембріоїдних тілець**

**49**

**2.6. Селекція диференційованих кардіоміоцитів 50**

**3**

**2.7. Підрахунок кількості живих клітин 50**

**2.8. Визначення GFP+ клітин методом проточної цитофлюориметрії 50**

**2.9. Світлова та флуоресцентна мікроскопія 51**

**2.10. Вимірювання трансмембранних струмів 51**

**РОЗДІЛ 3. 53**

**Особливості диференціювання плюрипотентних стовбурових**

**клітин в культурі тканин in vitro в залежності від умов**

**культивування**

**53**

**3.1. Вплив щільності посіву плюрипотентних стовбурових клітин миші**

**на ефективність їхнього диференціювання в кардіоміоцити**

**53**

**3.1.1. Вплив щільності посіву індукованих плюрипотентних стовбурових**

**клітин миші на ефективність їхнього диференціювання в**

**кардіоміоцити**

**55**

**3.1.2. Вплив щільності посіву ембріональних стовбурових клітин миші на**

**ефективність їхнього диференціювання в кардіоміоцити**

**60**

**3.2. Залежність ефективності диференціювання плюрипотентних**

**стовбурових клітин миші від часу прикріплення ЕТ методом**

**«висячої краплі»**

**61**

**3.3. Диференціювання ембріональних стовбурових клітин та**

**індукованих плюрипотентних стовбурових клітин в культурі**

**тканин in vitro за умови постійного перемішування**

**66**

**3.4. Порівняння ефективність диференціювання плюрипотентних**

**стовбурових клітин методом «висячої краплі», в культурі тканин in**

**vitro за умови постійного перемішування та в спеціальних**

**планшетах, які забезпечують гомогенність сформованих**

**ембріоїдних тілець**

**71**

**РОЗДІЛ 4. 78**

**Диференціювання ембріональних стовбурових клітин та 77**

**4**

**індукованих плюрипотентних стовбурових клітин миші в**

**кардіоміоцити в умовах впливу різних індукторів диференціювання**

**4.1. Вплив циклоспорину на процес диференціювання ембріональних**

**стовбурових клітин та індукованих плюрипотентних стовбурових**

**клітин в кардіоміоцити**

**78**

**4.2. Вплив ДМСО на процеси диференціювання ембріональних**

**стовбурових клітин та індукованих плюрипотентних стовбурових**

**клітин в кардіоміоцити**

**85**

**4.2.1. Застосування ДМСО для покращення диференціювання**

**ембріональних стовбурових клітин**

**85**

**4.2.2. Результати впливу ДМСО на процес диференціювання**

**індукованих плюрипотентних стовбурових клітин**

**88**

**4.2.3. Порівняльний аналіз здатності до диференціювання ембріональних**

**стовбурових клітин та індукованих плюрипотентних стовбурових**

**клітин в умовах додавання ДМСО**

**91**

**4.3. Застосування QS11 для покращення диференціювання**

**ембріональних стовбурових клітин та індукованих**

**плюрипотентних клітин**

**93**

**4.4. Функціональні властивості кардіоміоцитів, які були отримані з**

**плюрипотентних стовбурових клітин з додаванням аскорбінової**

**кислоти та QS11 в середовище культивування**

**97**

**АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ 102**

**ВИСНОВКИ 117**

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ 119**

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

**АК – аскорбінова кислота**

**ДПС – друге поле серця**

**ЕСК – ембріональні стовбурові клітини**

**ЕТ – ембріоїдні тільця**

**ІПСК – індуковані плюрипотентні стовбурові клітини**

**МЕФ – мишачі ембріональні фібробласти**

**ППС – перше поле серця**

**ПСК – плюрипотентні стовбурові клітини**

**СК – стовбурові клітини**

**ANF – атріопептин, передсердний натрійуретичний гормон, кардіонатрін**

**BMP – кістковий морфогенетичний білок**

**cTnT - кардіо тропонін Т**

**DMEM – Dulbecco’s modified Eagle medium (середовище Ігла, модифіковане**

**Дульбекко)**

**FBS – fetal bovine serum (фетальна теляча сироватка)**

**GFP – green fluorescent protein (зелений флуоресцентний білок)**

**IMDM - Iscove's Modified Dulbecco's Medium (модифіковане середовище**

**Дульбекко)**

**IRES – Internal Ribosome Entry Site (ділянка внутрішньої посадки рибосоми)**

**Klf4 – Kruppel-like factor 4**

**LIF – інгібіторний фактор лейкемії**

**NEAA – non-essential amino acids (замінні амінокислоти)**

**Oct-4 - абревіатура від Octamer-4**

**QS11- хімічна назва (2S)-2-[2-(Indan-5-yloxy)-9-(1,1'-biphenyl-4-yl)methyl)-9Hpurin-6-ylamino]-3-phenyl-propan-1-ol**

**SCNT – переніс ядра соматичних клітин**

**Sox-2 - SRY [sex determining region Y]-box 2 – ділянка Y, яка визначає стать,**

**блок 2**

**6**

**TGF-β – трансформуючий фактор росту бета**

**α-MHC – важкий ланцюг α-міозину**

**7**

**ВСТУП**

**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 [91], у тому числі отримати інформацію про**

**експресію генів [64], утворення міофібрил [38], розвиток і функціонування**

**іонних та кальцієвих каналів [111], розвиток рецепторів [48]. 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 [3, 5]. Індукована**

**плюрипотентна стовбурова клітина вперше була отримана із соматичних клітин**

**миші у 2006 році [107]. 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**

**диференціюватись у клітини трьох зародкових шарів, як in vivo так і in vitro [45,**

**83]. 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 [14, 54]. 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 [8, 102, 126]. Перевагою індукованих плюрипотентних клітин є**

**8**

**те, що вони після індукції і диференціювання в заданому напрямку можуть**

**бути повернені до хазяїна [1, 10, 107].**

**Майже одразу після народження серце ссавців втрачає велику частину**

**своїх регенеративних можливостей. Через постійну боротьбу зі стресом і**

**пошкодженням клітин відбувається втрата функціональних кардіоміоцитів**

**[115]; як наслідок, спостерігається гіпертрофія вже існуючих клітин та їх заміна**

**клітинами сполучної тканини, які нездатні до скорочення [128]. 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 [4].**

**Відновлення функції серцевого м’яза можливе завдяки застосуванню**

**методів клітинної терапії, які дозволяють отримувати кардіоміоцити в культурі**

**клітин in vitro [2]. 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 [53, 70, 73]. 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**

**9**

**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 ембріоїдні тільця 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 ембріоїдних 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 ембріоїдних 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 ембріоїдних 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.**

**10**

**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 ембріоїдних тілець, адгезії ембріоїдних**

**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**

**11**

**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 проведені**

**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**

**12**

**кріомедицини НАН України (Харків, 2012), VII Міжнародній конференції**

**молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2012), ІІ**

**Всероссийской с международным участием школе-конференции молодых**

**ученых «Биология будущего: традиции и новации» (Екатеринбург, Россия,**

**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), ІV**

**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, рекомендованих ДАК**

**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).**

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

Отриманоембріоїднітільцязембріональнихтаіндукованих

плюрипотентнихстовбуровихклітинмишівкультуріклітин

Показанощорозмірембріоїднихтілецьсуттєвовпливаєна

ефективністьдиференціюванняклітинНайбільшийвідсотокклітин

отримализембріоїднихтілецьрозміромклітинвінстановив±

кардіоміоцитіввідзагальноїкількостіклітинр˂

Прикріпленняембріоїднихтілецьдоповерхнісубстратупокращує

ефективністьпроцесівдиференціюванняПротеприкріпленняембріоїдних

тілецьнабільшранніхетапахїхформуваннясповільнюєпроцес

диференціювання

Середсполукякісприяютьдиференціюваннюциклоспорин

кардіодженолдорзоморфінДМСОаскорбіновакислотанайбільш

ефективнимвиявивсяциклоспоринДодаванняциклоспоринузїдоїдоби

формуванняембріоїднихтілецьпризводилодозбільшеннякількості

клітинтаплощіскоротливихосередківвембріоїднихтільцяхупорівнянніз

контролемр˂

Застосуванняразомзаскорбіновоюкислотоюмало

синергічнийефектякдляЕСКтакідляІПСКОднакдіяцихмолекулможлива

лишеввизначенийпроміжокчасу

Найбільшефективноюсхемоюпідвищенняефективності

диференціюванняплюрипотентнихстовбуровихклітинвкардіоміоцитиє

культивуванняклітинзембріоїднихтілецьвсуспензійнійкультурізпостійним

перемішуваннямзаумовдодаванняциклоспоринущозбільшуєвихід



кардіоміоцитівудвічідляембріональнихстовбуровихклітинтавразидля

індукованихплюрипотентнихстовбуровихклітин

Розробленийспосібдиференціюванняплюрипотентних

стовбуровихклітинєпідґрунтямдлястворенняпротоколівотримання

визначеноїкількостіжиттєздатнихкардіоміоцитівдлятрансплантології