

Состояние генетического аппарата клеток стволового компартмента криоконсервированной фетальной печени разных сроков гестации

А.Н. ГОЛЬЦЕВ, Е.Д. ЛУЦЕНКО, Т.Г. ДУБРАВА, М.В. ОСТАНКОВ, Н.Н. БАБЕНКО,

Ю.А. ГАЕВСКАЯ, Е.Е. ЯМПОЛЬСКАЯ, А.Ю. ДИМИТРОВ, О.В. ЧЕЛОМБИТКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

State of Genetic Apparatus of Cryopreserved Stem Cells from Fetal Liver of Different Gestation Terms

A.N. GOLTSEV, E.D. LUTSENKO, T.G. DUBRAVA, M.V. OSTANKOV, N.N. BABENKO,

YU.A. GAYEVSKAYA, E.E. YAMPOLSKAYA, A.YU. DIMITROV, O.V. CHELOMBITKO

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

В последнее время в криобиологических исследованиях наблюдается четкая тенденция, если не переориентации, то смещения акцента в сторону решения прикладных задач медицинского профиля, поскольку криоконсервирование – этап технологического процесса применения препаратов клеточной и тканевой терапии в клинической практике. Одной из базовых структурно-функциональных единиц органно-тканевых субстратов фетальных тканей являются стволовые клетки, в первую очередь, кроветворные (СКК) и мезенхимальные (МСК). Эти клетки – уникальные хранилища генетической информации, необходимой для реализации адекватных программ пролиферации, дифференцировки и в целом их терапевтического потенциала. В связи с этим принципиально значима морфофункциональная сохранность клеток стволового компартмента после криоконсервирования.

Цель работы – оценить уровень экспрессии генов *gata2* и *ido* в клетках стволового компартмента фетальной печени (ФП) разных сроков гестации до и после криоконсервирования.

В работе использованы клетки ФП мышей линии CBA/H 14 и 18-х суток гестации. Фракции СКК и МСК выделяли методом иммуномагнитного сортирования с использованием соответственно «MicroBeads» CD117 и CD105 («Miltenyi Biotec», США). Криоконсервирование клеток ФП проводили под защитой 10%-го раствора диметилсульфоксида по двухэтапной программе [Гольцев А.Н., 1995]. Экспрессию генов *gata2* и *ido* в нефракционированных клетках ФП и выделенных фракциях клеток Lin-CD117⁺ и CD105⁺ определяли методом ПЦР с этапом обратной транскрипции, детекцию продуктов амплификации проводили на чип-анализаторе «Agilent 2100» (США).

Установлено, что по мере пролонгации сроков гестации уровень экспрессии генов *gata2* и *ido* в клетках стволового компартмента ФП снижается. После криоконсервирования уровень экспрессии исследуемых генов в ФП 18 суток гестации существенно повышался, превосходя таковой даже в нативном материале более ранних сроков гестации. Данный факт подчеркивает способность криоконсервирования реализовать «ревитализирующий» эффект в отношении клеток ФП поздних сроков гестации, что расширяет возможности использования такого материала в клинической практике.

Recently in cryobiology a distinct tendency if not to reorientation but to shifting the accent towards the solving of applied tasks of medical expertise, as cryopreservation is the stage of technological process of applying the preparations of cell and tissue therapy in clinical practice. One of the basic structural and functional units of organ and tissue substrates of fetal tissues are stem cells, first of all, hemopoietic (HSCs) and mesenchymal (MSCs) ones. These cells are unique depots of genetic information necessary for the implementation of adequate programs of proliferation, differentiation, generally, their therapeutic potential. Therefore, fundamentally important is morphofunctional integrity of stem cells after cryopreservation.

The research aim was to assess the expression rate of *gata2* and *ido* genes in stem cells of fetal liver (FL) of different gestation terms prior to and after cryopreservation.

We used the FL cells of CBA/H mice of 14th and 18th days of gestation. HSCs and MSCs fractions were isolated by immunomagnetic sorting using respectively CD117 and CD105 MicroBeads (Miltenyi Biotec). The cells were cryopreserved under the protection of 10% dimethyl sulfoxide according to the two-step program [Goltsev A.N., 1995]. Expression of *gata2* and *ido* genes in non-fractionated FL cells and in cells of isolated fractions Lin-CD117⁺ and CD105⁺ was determined by PCR with reverse transcription stage, the amplification products were detected with chip analyzer Agilent 2100 (USA).

It has been found that with prolongation of gestation terms the expression rate of *gata2* and *ido* genes in stem cells of FL reduced. After cryopreservation the expression rate of the studied genes in FL of 18 gestation days increased significantly, exceeding even that of native material of earlier gestation terms. This fact highlights the ability of cryopreservation to implement a 'revitalizing' effect on FL cells of late gestation terms, extending the use of such a material in clinics.

Вплив мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин на неоангіогенез нижніх кінцівок шурів з експериментальною хронічною ішемією

А.Г. ПОПАНДОПУЛО, А.В. ОБЕРЕМКО, П.Л. ВАРШАВЕР, І.Г. ПОСТОЛЮК

ДУ «Інститут невідкладної і відновної хірургії ім. В.К. Гусака НАМН України», м. Донецьк

Effect of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells on Neoangiogenesis of Rat Lower Limbs with Experimental Chronic Ischemia

A.G. POPANDOPULO, A.V. OBEREMKO, P.L. VARSHAVER, I.G. POSTOLYUK

V.K. Gusak Institute of Urgent and Recovery Surgery
of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Donetsk, Ukraine

Метою дослідження було вивчити вплив мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (МСК) червоного кісткового мозку шурів на кровоток в ішемізованих кінцівках.

Всі щури лінії Wistar-Kioto були поділені на 5 груп по 15 тварин: 1 (контрольна) – формування хронічної ішемії без подальшого лікування; 2 – внутрішньом'язове введення фізіологічного розчину; 3 – внутрішньом'язове введення аутокрові як агента формування місцевого асептичного запалення, та як можливого джерела неангіогенезу в уражених кінцівках; 4 – внутрішньом'язове введення мезенхімальних стовбурових клітин як джерела ангіогенезу; 5 – інтраваскулярне введення мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин. Виділені МСК при маркуванні антитілами («BD Biosciences Pharmingen», США) мали фенотип: CD105⁺CD73⁺CD90⁺ (> 95 % позитивних) і CD45⁻CD34⁻CD79a⁻HLA-DR⁻ (< 2% позитивних) та були здатні диференціюватись в остео-, адипо- та хондрогенному напрямку при спрямованій індукції *in vitro*. Для виготовлення трансплантата використовували клітини 2–3-го пасажів та 0,9% розчин хлориду натрію.

Після моделювання ішемії нижньої кінцівки за дві доби після проведення перев'язування стегнової артерії при гістологічному дослідженні м'язової тканини внутрішньої поверхні стегна у всіх спостереженнях мали місце ознаки вираженої ішемії на фоні порушення кровообігу в судинах мікроциркуляції. На 14 і 21-ю добу експерименту в м'язових біоптатах тварин з введенням МСК фіброзні зміни були виражені достовірно менше. Крім того, при імуногістохімічному фарбуванні з CD34 кількість дрібних міжм'язових капілярів була достовірно вищою, ніж в інших групах тварин.

Результати проведеного дослідження свідчили про покращення кровотока в ішемізованих кінцівках тварин як після інтраваскулярного, так і внутрішньом'язового введення суспензії МСК порівняно з тими тваринами, яким не проводилась трансплантація клітин в ішемізовані тканини, та тими тваринами, яким внутрішньом'язово вводили фізіологічний розчин. Застосування МСК кісткового мозку порівняно з внутрішньом'язовим введенням аутокрові в експерименті на фоні ішемії дозволило швидше відновити кровоток в ішемізованих кінцівках.

The research aim was to study the effect of multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) of rat red bone marrow on blood circulation in ischemic limbs.

All Wistar-Kioto rats were divided into 5 groups by 15 animals: the 1st (control) – developing chronic ischemia without further treatment; the 2nd – intramuscular injection of physiological solution; the 3rd – intramuscular injection of autoblood as agent forming local aseptic inflammation and as a possible source of neoangiogenesis in injured limbs, the 4th – intramuscular injection of mesenchymal stem cells as a source of angiogenesis; the 5th – intravascular introduction of multipotent mesenchymal stromal cells. Antibody labeling (BD Biosciences Pharmingen, USA) revealed that the derived MSCs had a phenotype: CD105⁺CD73⁺CD90⁺ (> 95% positive) and CD45⁻CD34⁻CD79a⁻HLA-DR⁻ (< 2% positive) and were able to differentiate towards osteo-, adipo- and chondrogenic at directed induction *in vitro*. There were used the cells of the 2nd–3rd passages and 0.9% sodium chloride solution to produce transplant.

After simulation of lower limb ischemia in two days after femoral artery ligation at histological examination of inner thigh muscle tissue had signs of severe ischemia on the background of poor circulation in microcirculation vessels. To the 14th and 21st days of the experiment in animal muscle biopsies with introduction of MSCs the fibrotic changes were less expressed. Moreover during immunohistochemical staining with CD34 antigene a number of small intramuscular capillaries was significantly higher than in other animal groups.

The results of the study testified to improved blood circulation in animal ischemic limbs both after intravascular and intramuscular administration of MSCs suspension if compared with those animals, which were not transplanted with the cells into ischemic tissue, and those ones injected intramuscularly with physiological solution. Application of bone marrow MSCs compared with intramuscular autoblood administration in the experiment with ischemia allowed rapid restoration of blood circulation in ischemic limbs.

Новый подход к криоконсервированию мезенхимальных стромальных клеток

Ю.А. ПЕТРЕНКО, В.В. МУТЕНКО, С.П. МАЗУР, В.П. ГРИШУК, Н.А. ВОЛКОВА
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

New Approach to Cryopreservation of Mesenchymal Stromal Cells

YU.A. PETRENKO, V.V. MUTSENKO, S.P. MAZUR, V.P. GRISCHUK, N.A. VOLKOVA
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Перспектива широкого клинического применения мезенхимальных стромальных клеток (МСК) определяет необходимость создания новых и совершенствования существующих методов криоконсервирования этих клеток.

Эффективными при замораживании МСК являются криозащитные среды, содержащие ДМСО и эмбриональную сыворотку ксеногенного происхождения, которые следует удалять перед применением. Это усложняет процесс криоконсервирования и может приводить к значительной потере клеток. При криоконсервировании клеток в качестве непроникающего нетоксичного осмотически активного компонента среды замораживания часто используется сахароза. Целью данной работы явилось исследование целесообразности использования сахарозы при культивировании МСК для подготовки клеток к криоконсервированию и снижения концентрации нежелательных компонентов в криозащитной среде.

Объектом изучения были МСК 4–7 пассажей, полученные ранее с соблюдением норм биомедицинской этики. Для подготовки клеток к криоконсервированию проводили культивирование МСК в присутствии 0,1; 0,15 и 0,2 М сахарозы в течение 1 суток перед замораживанием. Замораживание МСК осуществляли со скоростью 1 град/мин до -80°C , после чего образцы погружали в жидкий азот. Сохранность клеток определяли по тесту трипанового синего. Метаболическую активность оценивали с использованием редокс-индикаторов МТТ и АВ.

Установлено, что культивирование МСК в присутствии сахарозы приводило к значительному увеличению их криоустойчивости. Даже при отсутствии в криозащитной среде ДМСО и сыворотки около 50% клеток после замораживания-отогрева сохраняли жизнеспособность, проявляли метаболическую активность и были способны к адгезии и пролиферации в условиях монослойного культивирования. Введение всего 1% ДМСО в криозащитную среду при условии предварительной обработки монослоя МСК сахарозой приводило к достоверному повышению жизнеспособности, метаболической и пролиферативной активности отогретых клеток до значений, характерных для МСК, криоконсервированных под защитой 10% ДМСО в присутствии сыворотки.

Полученные результаты указывают на целесообразность этапа предобработки культивируемых МСК для подготовки клеток к последующему криоконсервированию.

The prospect of widespread clinical application of mesenchymal stromal cells (MSCs) determines the need to develop new and improve existing methods of cryopreservation of these cells.

The cryoprotective media effective for cryopreservation of MSCs usually contain DMSO and fetal serum of xenogeneic origin that should be removed prior to use. This complicates the cryopreservation protocol and can lead to a significant loss of cells. Sucrose is often used as a non-toxic non-penetrating osmotically active component of freezing medium during cryopreservation of cells.

The aim of the study was to investigate the feasibility of sucrose application during MSC culturing for the preparation of cells for cryopreservation and following reduction of undesirable components concentration in the cryoprotective medium.

The objects of the study were MSCs of 4–7th passages obtained previously according to the principles of biomedical ethics. To prepare cells for cryopreservation MSC culturing was performed in the presence of 0.1, 0.15 and 0.2 M sucrose during a 24 hrs prior to freezing. MSC cryopreservation was performed with the cooling rate of 1 deg/min down to -80°C , then the samples were plunged into liquid nitrogen. Cell survival was determined by trypan blue test. Metabolic activity was evaluated using the redox indicators MTT and AB.

We have found that the culturing of MSCs in the presence of sucrose led to a significant increase of cells cryoresistance. Even when DMSO and serum were absent in cryoprotective medium about 50% of the cells after freeze-thawing preserved their viability, revealed a metabolic activity and were capable to adhesion and proliferation during monolayer culturing. Introduction of 1% DMSO in cryoprotective media after pre-treatment of MSC monolayer with sucrose resulted in a significant increase of viability, metabolic and proliferative activity of thawed cells up to the levels of MSCs cryopreserved under protection of 10% DMSO in the pre-sence of serum.

The obtained results indicate the feasibility of pre-treatment stage during MSC culture for the preparation of cells to the following cryopreservation.

Новые подходы к криоконсервированию стволовых клеток

А.Ф. Гурчин¹, Н.А. Шубин²

¹Институт мозга человека РАН, г. Санкт-Петербург

²Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург

New Approaches to Cryopreservation of Stem Cells

A.F. GURCHIN¹, N.A. SHUBIN²

¹Institute of Human Brain of the Russian Academy of Sciences, St.-Petersburg, Russia

²Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, St.-Petersburg, Russia

Поиск подходов к практическому применению стволовых клеток является в настоящее время крайне важным и перспективным направлением современной клеточной биологии и экспериментальной медицины. В связи с этим создание низкотемпературных банков – хранилищ данного криоконсервированного биоматериала – актуальнейшая задача прикладной криобиологии.

Известно, что обычно применяемые методики охлаждения стволовых клеток не могут удовлетворять нас в полной мере из-за сравнительно невысокого процента жизнеспособных клеток после деконсервирования.

Нами были проведены эксперименты по определению наиболее оптимальных условий для успешного криоконсервирования мезенхимальных стволовых клеток – клеток-предшественников, выделенных из костного мозга. Эти клетки обладают уникальной регенерационной способностью и крайне важным свойством – подавлять реакции иммунной системы на свое присутствие.

В результате испытаний различных режимов замораживания, что наиболее эффективно использование ультраредленных скоростей охлаждения – до 0,1 град/мин (до температуры кристаллизации клеточной суспензии). Следующим этапом в данных экспериментах стал поиск криопротектора. Известен токсический эффект на биообъекты ДМСО – наиболее универсального криозащитного вещества, применяемого в криобиологии. В качестве безопасного и эффективного криопротектора нами предложен димеколин – 1,6 диметилпипеколиновой кислоты дийодметилат. В медицине димеколин – активный ганглиоблокатор, применяется в виде водного раствора, в основном, при лечении язвенной болезни желудка, колитах.

Предложенный нами метод криоконсервирования мезенхимальных стволовых клеток (а также региональных и кроветворных стволовых клеток) обеспечивает высокий процент после замораживания-оттаивания и не требует отмывания клеточной суспензии от криопротектора после деконсервирования.

The search for approaches to practical application of stem cells is today extremely important and perspective trend of current cell biology and experimental medicine. In this connection the establishment of low temperature banks, the stores for this cryopreserved biological material is the most actual task of applied cryobiology.

It is known that traditionally applied methods of cooling of stem cells can not be completely satisfactory due to comparatively low percentage of viable cells after thawing.

We have carried-out the experiments on determining the most optimal conditions for successful cryopreservation of mesenchymal stem cells, progenitor cells isolated from bone marrow. These cells possess a unique regenerative ability and very important feature: to suppress immune system responses to their presence.

As a result of trials of different freezing protocols the use of ultraslow cooling rates up to 0.1 deg/min (to cell suspension crystallization temperature) has been demonstrated to be the most effective. The following stage in these experiments was the search of cryoprotectant. The effect of DMSO as the most general cryoprotective substance used in cryobiology on bioobjects is known to be toxic. As safe and effective cryoprotectant we proposed dimecolinum, 1,6-dymethyl pipecolinic acid diiodine methylate. In medicine dimecolinum is active ganglionic blocking agent is applied as aqueous solution mainly for treatment of ulcer gastric diseases, colites.

The proposed by us cryopreservation method of mesenchymal stem cells (as well as regional and hemopoietic stem cells) provides a high percent after freeze-thawing and does not require the washing of cell suspension from cryoprotectant after thawing.

Лінійна селекція кардіоміоцитів, отриманих із ембріональних та індукованих плюрипотентних стовбурових клітин

М. ДЯЧЕНКО, Д. БІЛЬКО, І. БОРБУЛЯК, Н. БІЛЬКО

Центр молекулярних та клітинних досліджень

Національний університет «Києво-Могилянська академія», м. Київ

Linear Selection of Cardiomyocytes Derived from Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells

М. DYACHENKO, D. BIL'KO, I. BORBULYAK, N. BIL'KO

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

Отримання індукованих плюрипотентних стовбурових клітин (iPS) відкрило нові перспективи для клітинної терапії. Проте, все ще залишається ряд запитань, які необхідно вирішити перш ніж клінічне застосування плюрипотентних клітин стане можливим. Основною перешкодою є здатність ембріональних стовбурових (ES) та iPS-клітин формувати тератоми при введенні в організм реципієнта. Метою дослідження було розробити ефективну методику селекції резидуальних недиференційованих стовбурових клітин із тератомогенними властивостями від пулу зрілих лінійноспецифічних клітин у процесі диференціювання.

Для проведення дослідження використовували клітини ES та iPS ліній aPig44 та AT25 відповідно. Це плюрипотентні клітини миші, що експресують ген зеленого флуоресцентного білка (GFP) та ген резистентності до пуроміцину під контролем промотора важкого ланцюга альфа-міозину. Клітини рутинно підтримувались на фідерному шарі ембріональних фібробластів миші. Для диференціювання клітини культивували на горизонтальному шейкері у середовищі IMDM із додаванням 20% FCS. Культивування утворених ембріонічних тілець (EBs) продовжували до появи GFP-позитивних EBs на 8-й день диференціювання, після чого у живильне середовище додавали пуроміцин (8 мкг/мл) та цитостатики у відповідних концентраціях (етопозид фосфат, 5-флюоурацил, блеоміцин та цисплатин).

Концентрація напівмаксимального інгібування росту клітин складала для блеоміцину 10 мкг/мл, для етопозиду фосфату – 1 мкг/мл, для цисплатини – 5 мкг/мл, для 5-флюоурацилу – 2 мкмоль. Такі концентрації препаратів не мали токсичного впливу на зрілі кардіоміоцити. Виявлено різницю у чутливості двох досліджуваних ліній клітин. Так, рівень GFP-позитивних клітин після додавання цитостатиків для кардіоміоцитів, отриманих із лінії AT25, був у 2,51–3,09 рази вищим від контрольних значень ($p < 0,05$). Статистично достовірне зростання кількості GFP-позитивних кардіоміоцитів, отриманих із клітин лінії aPig44, виявлено лише при додаванні блеоміцину (1,86 проти 0,57% у контрольній групі, $p < 0,05$), який не лише дозволяв провести селекцію зрілих кардіоміоцитів, але й підвищував рівень скорочень EBs (100% EBs скорочувались, інтенсивність 1,4 уд. порівняно з 0,8 уд. для контрольної групи, $p < 0,05$).

Отримані результати дозволяють зробити висновок, що цитостатики можуть використовуватись як нетоксичний та ефективний засіб для елімінації незрілих тератомогенних клітин у процесі диференціації. Відсутність маніпуляцій із генетичним матеріалом клітин для проведення лінійної селекції дозволить застосовувати запропонований метод для клітин, що будуть використовуватись у терапевтичних цілях.

Derivation of induced pluripotent stem cells (iPS) has opened new perspectives for cell therapy. However there are several problems have to be solved before the clinical application of pluripotent cells will be possible. The main difficulty is the ability of embryonic stem (ES) and iPS cells to form teratoma when injecting them into recipient's organism. The research aim was to develop an effective selection method of residual non-differentiated stem cells with teratomogenic properties of pool of mature linear-specific cells during differentiation.

In the research there were used ES and iPS cells of aPig44 and AT25 lines, respectively. They are mice pluripotent cells expressing gene of green fluorescent protein (GFP) and puromycin resistance gene under the control of alpha-myosin heavy chain promoter. The cells were routinely maintained on feeder layer of mice embryonic fibroblasts. For differentiation the cells were cultured in a horizontal shaker in IMDM with addition of 20% FCS. Culturing of the formed embryoid bodies (EBs) was continued until appearance of GFP-positive EBs to the 8th differentiation day, after that puromycin (8 mg/ml) and cytostatic agents in appropriate concentrations (etoposide phosphate, 5-fluouracyl, bleomycin and cisplatin) were added to the nutritional medium.

Concentration of semi-maximum inhibition of cell growth for bleomycin was 10 mg/ml, 1 mg/ml for etoposide phosphate, 5 mg/ml for cisplatin, 2 μ mol for 5-fluouracyl. The substances in such concentrations had no toxic effect on mature cardiomyocytes. It was revealed sensitivity difference of two studied cell lines. Herewith, level of GFP-positive cells after addition of cytostatic agents to cardiomyocytes derived from AT25 line was in 2.51–3.09 times higher than the control values ($p < 0.05$). A statistically significant increase of GFP-positive cardiomyocytes number derived from aPig44 cell line was revealed only after bleomycin addition (1.86 vs. 0.57% in the control group, $p < 0.05$), allowing not only selection of mature cardiomyocytes, but also increasing contractions level of EBs (100% EBs contracted, intensity was 1.4 beats if compared with 0.8 ones for the control group, $p < 0.05$).

The obtained results suggest that cytostatic agents can be used as non-toxic and effective means for eliminating teratomogenic immature cells during differentiation. Linear selection without manipulations with cell genetic material will enable to apply the proposed method for cells to be used for therapy.

Систематическая оптимизация параметров при разработке протоколов криоконсервирования суспензий мезенхимальных стволовых клеток

Д. ПОГОЖИХ^{1,2}, Н. ХОФМАНН¹, Т. МЮЛЛЕР³, Б. ГЛАСМАХЕР¹

¹Ганноверский Университет им. Лейбница, Институт мультифазных процессов, Ганновер

²Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков

³Медицинская Школа Ганновера, Институт Трансфузионной Медицины, Ганновер

Development of Optimal Cryopreservation Protocol for Suspensions of Mesenchymal Stem Cells with Application of Systematic Parameter Optimization

D. POGOZHUKH^{1,2}, N. HOFMANN¹, T. MUELLER³, B. GLASMACHER¹

¹Leibniz Universitaet Hannover, Institute for Multiphase Processes, Hannover, Germany

²Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

³Hannover Medical School, Institute for Transfusion Medicine, Hannover, Germany

На сегодняшний день криоконсервирование является единственным доступным способом долгосрочного хранения биологических объектов. Существует ряд особенностей, связанных с фазовым переходом воды в лед и наоборот. Клетки различных типов по-разному реагируют на воздействие низких температур, что приводит к необходимости точного и тщательного подбора протоколов замораживания для каждого типа. Изучение стволовых клеток – одно из наиболее перспективных направлений в области биологии и регенеративной медицины. Успешное криоконсервирование суспензий стволовых клеток позволит повысить эффективность их применения.

Для успешного криоконсервирования клеточных суспензий, позволяющего обеспечить высокую выживаемость клеток, а также потенциал к рекультивации, необходимо оптимизировать параметры охлаждения и оттаивания. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) обезьян-игрунок (*Callithrix jacchus*) использовали в качестве клеточной модели для подбора оптимальных параметров замораживания, модифицируя скорости охлаждения и концентрацию криопротектора (КП). В исследование были включены 48 двухступенчатых протоколов с разными скоростями охлаждения (В) в диапазоне от 1 до 10 К/мин (В1 в диапазоне от 4 до –30°C и В2 от –30 до –80°C). Все протоколы изучали при четырех различных концентрациях наиболее часто применяемого криопротектора ДМСО. Для систематического сочетания этих параметров была применена растровая схема равномерного распределения. Для контроля скоростей охлаждения использовали устройство «Micrometer-freezer», разработанный в Институте мультифазных процессов (Ганновер, Германия). Прибор позволяет проводить параллельное измерение в 96 пробах при 12 различных скоростях охлаждения. Для оценки жизнеспособности клеток применяли автоматический счетчик со встроенным окрашиванием TrypanBlue®. После оттаивания выжившие клетки тестировали на способность к пролиферации и дифференцировке. Для получения эффективных параметров замораживания была разработана система оптимизации влияющих факторов (скорость замораживания, концентрация КП). С помощью такого подхода был подобран оптимальный протокол для криоконсервирования МСК. В предыдущих исследованиях данный подход также использовали для улучшения протоколов криоконсервирования линии клеток легочного эндотелия человека ST1.6R и первичных кератиноцитов человека. Для этих клеточных моделей дополнительно изучали характеристики и перспективы применения альтернативных КП (эктоина и пролина). Наилучшие результаты были достигнуты при применении протоколов: 5 К/мин (В1) в сочетании с 7,5 К/мин (В2); 5 К/мин в сочетании с 10 К/мин; 7,5 К/мин в сочетании с 10 К/мин. Оптимальные концентрации ДМСО составляли 7,5 и 10%.

Исследования проводились при поддержке Немецкого научно-исследовательского общества для кластера передового опыта REBIRTH (EXC 62/1).

Cryopreservation is the only available method today for the long-term storage of biological objects. However, there are many difficulties and peculiarities connected with the phase transitions of water into ice and vice versa. Cells of different types respond to the impact of low temperatures in a different manner, which requires precise freezing protocols for each type. Today, stem cell research is one of the most promising areas in biology and regenerative medicine. Successful cryopreservation of suspensions of stem cells would allow increasing effectiveness of their application. Effective cryopreservation of cellular suspensions requires optimization of cooling and thawing parameters in order to guarantee high survival rate and potential for reculturing.

Mesenchymal stem cells (MSCs) of marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*) were used as a cell model and optimal freezing parameters were developed by means of controlling freezing rates and concentration of cryoprotective agent (CPA). The investigation included 48 protocols with different cooling rates (B) in the range of 1 K/min to 10 K/min in two-step freezing protocols (B1 in the range of 4°C to –30°C and B2 from –30°C to –80°C). All protocols have been studied with four different concentrations of the most frequently applied CPA, DMSO. An evenly distributed measuring raster was applied for systematic combination of these parameters. For controlled freezing rates, we used a micrometer-freezer device, developed at the Institute for Multiphase Processes at LUH (Hannover, Germany). It allows parallel measurement of 96 samples with 12 various cooling rates. For the evaluation of the cellular viability an automatic cell counter with integrated TrypanBlue® staining was applied. After thawing, survived cells were tested for proliferation and differentiation.

In order to optimize freezing parameters, we have developed a systematic factor-optimization system. With the application of such an approach, we have found optimal cryopreservation protocol for MSCs. In previous investigations this setup was also used to improve the cryopreservation protocols for human pulmonary microvascular endothelial cells-ST1.6R and primary human keratinocytes. For these cellular models, application perspectives and characteristics of alternative CPAs (ectoine and proline) were additionally investigated. The best results were achieved with the application of protocols: 5 K/min (B1) combined with 7.5 K/min (B2); 5 K/min combined with 10 K/min; and 7.5 K/min combined with 10 K/min. Concentrations of DMSO were 7.5 and 10%.

This work is supported by funding from the German Research Foundation for the Cluster of Excellence REBIRTH (EXC 62/1).

Новые возможности терапевтического потенциала криоконсервированных фетальных нервных клеток. Способность коррекции цитокин-продуцирующей функции тимуса при развитии экспериментального аллергического энцефаломиелита

Е.А. ПОРОЖАН, М.В. ОСТАНКОВ, А.Н. ГОЛЬЦЕВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

New Possibilities of Therapeutic Potential of Cryopreserved Fetal Neural Cells Correctability of Cytokine-Producing Thymus Function in Development of Experimental Allergic Encephalomyelitis

E.A. POROZHAN, M.V. OSTANKOV, A.N. GOLTSEV

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Накоплен огромный опыт экспериментального и клинического применения фетальных нервных клеток (ФНК) при различных патологических состояниях организма [Skardelly M. *et al.*, 2011]. Обязательным этапом клинического использования ФНК является криоконсервирование. Ранее нами были получены результаты применения ФНК для коррекции состояния центральной нервной системы, однако актуальным остается изучение их иммуномодулирующей активности. Экспериментальный аллергический энцефаломиелит (ЭАЭ) как аналог рассеянного склероза человека характеризуется рядом функциональных нарушений главного органа иммуногенеза – тимуса, в частности его цитокин-продуцирующей функции. Исходя из того, что ФНК могут проникать через гематоэнцефалический барьер [Bubanovic V., 2003], существенный интерес для выяснения механизмов иммуномодулирующей активности этих клеток представляет изучение их влияния на разбалансированное состояние тимуса. Цель работы – оценить способность криоконсервированных ФНК корректировать цитокин-продуцирующую активность тимуса в динамике развития ЭАЭ.

Исследования выполнены на белых беспородных крысах с индукцией ЭАЭ [Давыдова Г.С., 1969]. Криоконсервирование ФНК крыс 11 суток гестации проводили по двум режимам: P1 [Грищенко В.И. и др., 2004] и P2 [Гольцев А.Н. и др., 2011], затем вводили животным внутривенно на 14-е сутки развития ЭАЭ в концентрации 5×10^6 кл./мл. Контролем служили нативные ФНК и взрослые нервные клетки. Методом проточной цитофлуориметрии с использованием соответствующих моноклональных антител (BD, США) определяли IL-10⁺- и IFN- γ -клетки тимуса. Анализ продукции цитокинов тимуса осуществляли методом ELISA с использованием моноклональных антител к IFN- γ , IL-10 и TGF- β (BD, США).

Установлено нарушение цитокин-продуцирующей активности тимуса при развитии ЭАЭ. Так, на начальных этапах развития патологии концентрация TGF- β существенно увеличивалась (в 1,8 раза), постепенно снижаясь к концу срока наблюдения. Несмотря на повышенное содержание в тимусе IL-10⁺- и IFN- γ -клеток на пике развития ЭАЭ, продукция ими указанных медиаторов была снижена, что свидетельствует о функциональной неполноценности этих клеток. Введенные ФНК (независимо от вида) достоверно снижали количество IL-10⁺- и IFN- γ -клеток и повышали концентрацию IFN- γ , IL-10 и TGF- β , тем самым проявляя цитокин-корректирующий эффект в отношении тимуса. При этом криоконсервированный материал по ряду критериев имел преимущество перед нативным. Обсуждаются возможные механизмы действия ФНК на цитокиновый профиль тимуса при ЭАЭ.

There has been accumulated a huge experience of experimental and clinical application of fetal neural cells (FNCs) at different pathological states of an organism [Skardelly M. *et al.*, 2011]. Cryopreservation is a mandatory stage of clinical use of FNCs. Previously we have obtained the results of FNCs application to correct the state of central nervous system, however the study of their immune modulating activity has remained an actual one. Experimental allergic encephalomyelitis (EAE) as the analogue of human multiple sclerosis is characterized with some functional disorders of immune genesis main organ, thymus, in particular its cytokine-producing function. Regarding to the fact that FNCs can penetrate through blood-thymus barrier [Bubanovic V., 2003], a strong interest for elucidating the mechanisms of immune modulating activity of these cells is driven by the study of their effect on misbalanced thymus state. The research aim was to estimate the ability of cryopreserved FNCs to correct the cytokine-producing activity of thymus in EAE development dynamics.

The investigations are carried-out in white breedless rats with induced EAE [Davydova G.S., 1969]. The rats' FNCs of 11th gestation day were cryopreserved according to two regimens: R1 [Grischenko V.I. *et al.*, 2004] and R2 [Goltsev A.N. *et al.*, 2011], then the animals were intraperitoneally introduced with these cells in concentration of 5×10^6 cells/ml at the 14th day of EAE development. Native FNCs and adult nerve cells served as the control. By the method of flow cytometry using corresponding monoclonal antibodies (BD, USA) the thymus cells IL-10⁺ and IFN- γ were examined. Thymus cytokine production was analyzed by ELISA using monoclonal antibodies to IFN- γ , IL-10 and TGF- β (BD, USA).

There was found an impairment of cytokine-producing activity of thymus at EAE development. So, at initial stages of pathology development the concentration of TGF- β significantly increased (in 1.8 times), gradually reducing to the end of observation term. Despite an increased content in thymus of IL-10⁺ and IFN- γ cells at the peak of EAE development, the production by them of the mentioned mediators was decreased, testifying to a functional incompetence of these cells. The introduced FNCs (independently on type) statistically and significantly reduced the number of IL-10⁺ and IFN- γ cells and increased the concentration of IFN- γ , IL-10 and TGF- β , thereby manifesting cytokine-correcting effect in respect of thymus. Herewith the cryopreserved material according to some criteria had advantages versus native one. There are discussed possible mechanisms of FNCs effect on cytokine profile of thymus at EAE.

**Доказательство состоятельности противоопухолевой терапии
криоконсервированными клетками фетальной печени
в экспериментальной модели рака молочной железы**

Н.А. БОНДАРОВИЧ, М.В. ОСТАНКОВ, А.В. КУЗНЯКОВ, О.В. ЧЕЛОМБИТЬКО, А.Н. ГОЛЬЦЕВ
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

**Evidence for Consistency of Anticancer Therapy with Cryopreserved
Fetal Liver Cells in Experimental Model of Breast Cancer**

N.A. BONDAROVICH, M.V. OSTANKOV, A.V. KUZNYAKOV, O.V. CHELOMBITKO, A.N. GOLTSEV
*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine*

Целесообразность применения клеток фетальной печени (КФП) для лечения рака молочной железы обоснована широким спектром продуцируемых ими биологически активных субстанций. В опубликованных нами работах подтверждается состоятельность лечения данной патологии и криоконсервированных КФП [Goltsev A.N. *et al.*, 2009], причем в схемах превентивного их применения. Криоконсервирование КФП – обязательный компонент технологического процесса их применения в эксперименте и клинике. Одним из методов ранней диагностики и оценки эффективности превентивной терапии рака молочной железы является мониторинг стволовых раковых клеток (СРК) в молочной железе.

Цель данного исследования – оценить содержание СРК в МЖ экспериментальных животных с генетически детерминированным развитием рака МЖ до и после превентивной терапии криоконсервированными КФП.

Мышам линии СЗН/Не, генетически детерминированным к развитию рака МЖ, в 6 месяцев вводили криоконсервированные или нативные КФП 14 суток гестации в концентрации 1 или 5×10^6 клеток. КФП криоконсервировали по двухэтапной программе на программном замораживателе УОП-06 под защитой 10% ДМСО. Контролем были мыши линии СВА/Н, СЗН/Не без лечения и мыши линии СЗН/Не, которым вводили клетки взрослой печени (КВП). Оценку содержания СРК в МЖ мышей проводили методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител к антигенам CD44, CD24 в 7 месяцев. Кроме того, оценивали выживаемость животных к 16-му месяцу, а также частоту развития опухоли у выживших к этому сроку мышей.

В МЖ 7-месячных мышей линии СЗН/Не без лечения методом цитофлуориметрического анализа были идентифицированы клетки с фенотипом CD44^{hi}, относящиеся к наиболее инвазивным СРК, и отмечено увеличение концентрации субпопуляции клеток с фенотипом CD44⁺CD24⁻. Продемонстрировано максимальное снижение количества СРК после превентивной терапии криоконсервированными КФП в концентрации 5×10^6 и нативными КФП в концентрации 1×10^6 , что коррелировало со снижением частоты развития опухоли и повышением выживаемости животных. Терапевтический эффект был присущ именно фетальному материалу, так как введение КВП не оказывало такого действия.

The feasibility of using fetal liver cells (FLCs) for the treatment of breast cancer is proved by a wide spectrum of biologically active substances produced by them. Our published studies confirm the feasibility of treatment of this pathology and cryopreserved FLCs [Goltsev A.N. *et al.*, 2009], notably in the schemes of their preventive use. Cryopreservation of FLCs is a mandatory component in the technological process of their application in experiment and clinics. One of the methods for early diagnostics and evaluation of the efficiency of preventive therapy of breast cancer is to monitor the cancer stem cells (CSCs) in mammary gland (MG).

The research aim was to evaluate the content of CSCs in MG of experimental animals with genetically determined development of breast cancer prior to and after preventive therapy with cryopreserved FLCs.

Mice C3H/He of 6 months genetically determined to the development of breast cancer were injected with cryopreserved or native FLCs of 14 gestation days in the concentrations of 1 or 5×10^6 cells. FLCs were cryopreserved by two-step program with programmable freezer UOP-06 under 10% DMSO protection. CBA/H and C3H/He mice without treatment and C3H/He mice injected with adult liver cells (ALCs) were the control. Evaluation of the CSC content in MG of 7-month-old mice was performed by flow cytometry with monoclonal antibodies to CD44, CD24 antigens. In addition the survival of animals was evaluated to the 16th month as well as tumor incidence in the mice survived by this time.

In MG of C3H/He 7-month-old mice without treatment by flow cytometric analysis the cells with the phenotype CD44^{hi} referred to the most invasive CSCs were identified and an increased concentration of subpopulation of cells with the phenotype CD44⁺CD24⁻ was noted. Maximum reduction of CSC number after preventive therapy with cryopreserved FLCs in a dose of 5×10^6 and native FLCs in a concentration of 1×10^6 was demonstrated. This correlated with a reduction of tumors incidence and increase of animal survival. The therapeutic effect was characteristic for a fetal material as the introduction of ALCs did not affect in such a way.

Оценка отдаленных эффектов аллогенной трансплантации клеток фетальной печени при экспериментальном циррозе печени у крыс

О.В. ОЧЕНАШКО, А.С. ЛЕБЕДИНСКИЙ, А.Н. СУКАЧ, А.Ю. ПЕТРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Assessment of Distant Effects after Allogeneic Transplantation of Fetal Liver Cells under Experimental Cirrhosis in Rats

O.V. OCHENASHKO., A.S. LEBEDINSKY, A.N. SUKACH, A.YU. PETRENKO

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Возможность применения в регенерационной медицине стволовых и прогениторных клеток, полученных из фетальных тканей, является предметом активных дискуссий и научных исследований. Мощный биологический потенциал фетальных клеток и слабая изученность отдаленных последствий трансплантации вызывают резонные замечания относительно безопасности их использования в лечебных целях.

В работе оценивали терапевтическую эффективность и отдаленные последствия аллогенной трансплантации криоконсервированных клеток фетальной печени (КФП) на модели экспериментального цирроза у крыс. Цирроз печени (ЦП) формировали путем длительного введения малых доз CCl_4 в течение 4 мес. КФП для трансплантации выделяли из печени плодов крыс 14–15-го дня гестации и криоконсервировали под защитой 10%-го раствора ДМСО. Животным со сформированной моделью вводили в селезенку 10^7 КФП на 10-й день после отмены инъекций CCl_4 . Контрольным группам вводили эквивалентный объем среды криоконсервирования. Срок наблюдения после трансплантации составил 6 мес. Состояние животных оценивали по общим физиологическим параметрам, биохимическим показателям крови, морфологии печени.

Было показано, что через 1 месяц после ложной трансплантации у животных контрольной группы сохранялись все признаки ЦП. Введение КФП приводило к достоверному улучшению гепатоспецифических показателей крови, частичному восстановлению индекса массы печени и структуры органа, а также тенденции к увеличению массы тела животных. Дальнейшее наблюдение показало, что через 6 месяцев после ложной трансплантации и введения КФП полной нормализации структуры печени не происходило, хотя биохимические показатели крови восстанавливались уже через 3 месяца в обеих группах. В период от 1 до 6 месяцев выживаемость в контрольной группе составила 80%, а у животных, которым вводили КФП – 100%. Гистологический анализ печени, проведенный через 6 мес, не выявил негативного влияния введения КФП.

Результаты работы демонстрируют, что максимальный эффект после однократного введения криоконсервированных аллогенных КФП проявляется в пределах первого месяца после трансплантации. Длительное наблюдение за животными показало увеличение их выживаемости и не выявило отдаленных негативных последствий трансплантации клеток фетальной печени.

The possibility to apply stem and fetal tissue-derived progenitor cells in regenerative medicine is a subject of active discussions and scientific investigations. The powerful biological potential of fetal cells and poor knowledge about distant consequences of transplantation cause reasonable remarks concerning safety of their usage in medical purposes.

Therapeutic efficiency and distant outcomes of allogeneic transplantation of cryopreserved fetal liver cells (FLCs) under model of experimental cirrhosis in rats were estimated in the work. Liver cirrhosis (LC) was simulated by long-term introduction of small doses of CCl_4 during 4 months. FLCs for transplantation were isolated from rat fetus liver of the 14–15th day of gestation and cryopreserved under protection of 10% DMSO. Animals with the formed model cirrhosis were injected into the spleen by 10^7 FLCs to the 10th day after the cancellation of CCl_4 injections. The control groups were injected the equivalent volume of cryopreservation medium. Observation term after transplantation was 6 months. The state of animals was estimated by general physiological parameters, biochemical blood counts, liver morphology.

It was shown that in 1 month after sham transplantation all the signs of the LC in animals of the control group were kept. Introduction of FLCs led to statistical and significant improvement of hepatospecific indicators of blood, partial restoration of weight liver index and organ structure and also a tendency of increasing the weight of animals' body. Further observation showed that in 6 months after false transplantation and introduction of FLCs there was no complete normalization of liver structure, though biochemical indicators of blood were restored in 3 months in both groups. During the period from 1 to 6 months the survival rate in the control group was 80% and in the animals with FLC injections was 100%. Histologic liver analysis which had been carried-out in 6 months did not reveal negative influence of FLC introduction.

The research results demonstrate that the maximum effect after single introduction of cryopreserved allogeneic FLCs are shown within the first month after transplantation. Long-term observation of the animals showed the increase in their survival rate and did not reveal the distant negative effects of fetal liver cell transplantation.

Иммуномодулирующие особенности клеток стромально-мезенхимальной фракции, выделенной из жировой ткани

Н.И. ЛИСЯНЫЙ, И.А. ГНЕДКОВА, М.А. ГНЕДКОВА
ГУ «Институт нейрохирургии им. акад. А.П.Ромоданова», г. Киев

Immune-Modulating Peculiarities of Stromal-Mesenchymal Cell Fraction Derived from Adipose Tissue

N.I. LISYANYI, I.A. GNEDKOVA, M.A. GNEDKOVA
A.P. Romodanov Institute of Neurosurgery
of Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

В настоящее время для проведения клеточной терапии используют мезенхимальные стволовые клетки (МСК), выделенные из аутологичной или аллогенной жировой ткани. Цель исследований – выделение из жировой ткани мыши, согласно протоколу, клеток мезенхимально-стромальной фракции (КМСФ), культивирование их в течение 24, 72 и 8 суток, изучение участия фракции прилипающих к пластику клеток в реакции бласттрансформации (БТ) аутологичных и аллогенных лимфоцитов мыши и ксеногенных человека.

Было установлено, что КМСФ в дозе 5×10^5 в соотношении 1:4 оказывали супрессорное действие на спонтанный и индуцированный ConA пролиферативный ответ лимфоцитов мыши и ФГА-индуцированный – человека. КМСФ снижали БТ аутологичных лимфоцитов мыши с $(33,1 \pm 2,5)$ до $(7,1 \pm 1,1)\%$. При добавлении той же концентрации КМСФ к ксеногенным лимфоцитам человека отмечалось снижение и спонтанной, и индуцированной БТ на ФГА с $(35,5 \pm 5,9)$ до $(10,5 \pm 3,1)\%$. Полученные данные свидетельствуют, что иммуносупрессорное действие КМСФ во многом обусловлено клеточным составом и особенностями экспрессии рецепторов на мембранах КМСФ молекул адгезии ICAM и VCAM. Супернатанты клеточных культур оказывали достоверный супрессорный эффект в реакции БТ только после 24 ч культивирования. Через 72 ч подавление БТ лимфоцитов человека было отмечено в 50% случаев, в 50% – стимулирующий эффект. Способность МСК влиять на выживаемость опухолевых линий, отмеченная некоторыми авторами, по-видимому, больше связана с факторами, продуцируемыми КМСФ. Еще одним важным фактором, определяющим особенности КМСФ, является жировая ткань, из которой получены клетки, так, как известно, что адипоциты секретируют про- и противовоспалительные цитокины. Возможно, КМСФ, выделенные из жировой ткани, сохраняют особенности цитокинового профиля адипоцитов.

Таким образом, КМСФ обладали супрессорным эффектом на активированные периферические лимфоциты мыши и человека, что объясняет природу иммуносупрессорной активности КМСФ и указывает на один из механизмов реализации иммуносупрессорного действия этих клеток. Вопрос об опосредованном действии КМСФ через гуморальные факторы пока не совсем ясен. Эти феномены целесообразно учитывать при проведении клеточной терапии.

Nowadays mesenchymal stem cells (MSCs), derived from autologous or allogeneic adipose tissue are used in cell therapy. The research aim was to derive from murine fatty tissue, according to the protocol, mesenchymal stromal cell fraction (MSCF), to culture them during 24, 72 hrs and 8 days, to study the fraction participation of cells, adhering to plastic in response of blast transformation (BT) of murine autologous and allogeneic lymphocytes and human xenogeneic cells.

It was found that MSCF of 5×10^5 amount in 1:4 ratio had a suppressive effect on spontaneous and ConA-induced proliferative response of murine lymphocytes and PHA-induced human cells. MSCF reduced BT of autologous murine lymphocytes from (33.1 ± 2.5) to $(7.1 \pm 1.1)\%$. When adding the same concentration of MSCF to xenogeneic human lymphocytes the decrease of either spontaneous or induced BT to PHA from (35.5 ± 5.9) to $(10.5 \pm 3.1)\%$ was revealed. The obtained data testify to immunosuppressive effect of MSCF depends on cellular composition and expression peculiarities of receptors on MSCF membranes of ICAM and VCAM adhesion molecules. Cell culture supernatants had a significantly suppressive effect in BT response after 24 hr culturing. After 72 hrs the suppression of BT of human lymphocytes was observed in 50% of cases, stimulating effect was found in 50%. The ability of MSCs to affect the survival of tumor lines, mentioned by some authors, seemingly, is more associated with the factors produced with MSCF. Another important factor, determining abilities of MSCF, is adipose tissue from which the cells were derived, as it is known that adipocytes secrete pro- and anti-inflammatory cytokines. Probably MSCF derived from adipose tissue preserves peculiarities of cytokine profile and adipocytes.

Thus, MSCF had a suppressive effect on activated peripheral murine and human lymphocytes, explaining the nature of immunosuppressive activity of MSCF and points to one of the implementation mechanisms of immunosuppressive action of these cells. The task of mediated action of MSCF through humoral factors is not clear. These phenomena are useful to consider during cell therapy.

Диференціювання ембріональних стовбурових та індукованих плюрипотентних клітин миші в кардіоміоцитарному напрямку

Г.В. БУДАШ, Д.І. БІЛКО

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

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

G.V. BUDASH, D.I. BILKO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Характеристика mTiPSCs – потенційної лінії iPSC миші, отриманої за допомогою системи транспозонів Sleeping beauty

С. МАЛИШЕВА^{1,2}, Г. БУДАШ^{1,2}, Д. БІЛКО¹, Н. БІЛКО¹, Т. САРІЧ²

¹Національний університет «Києво-Могилянська академія», м. Київ

²Інститут нейрофізіології Кельнського університету, м. Кельн

Characterization of mTiPSCs – Potential Mouse iPSC Obtained by Means of Sleeping Beauty Transposon System

S. MALYSHEVA^{1,2}, G. BUDASH^{1,2}, D. BILKO¹, N. BILKO¹, T. SARICH²

¹National University of Kyiv-Mohyla Academy, Kyiv, Ukraine

²Institute of Neurophysiology, University of Cologne, Cologne

Відкриття індукованих плюрипотентних стовбурових клітин (iPSC) [Yamanaka, 2007] – перспективної альтернативи ембріональним стовбуровим клітинам (ЕСК), стало надзвичайною подією у клітинній біології. Проте традиційні вірусні методи отримання iPSC пов'язані з певним ризиком для потенційного подальшого застосування цих клітин у медичній практиці. Використання заснованої на мобільних генетичних елементах системи Sleeping beauty – принципово новий механізм репрограмування соматичних клітин у індуковані плюрипотентні [Izsvak, 2010]. У даній роботі досліджено ключові характеристики отриманої за допомогою цієї системи потенційно нової лінії iPSC миші – mTiPSCs (murine Transposon-Induced Pluripotent Stem Cells).

Трансфекцію ембріональних фібробластів репрограмуючою системою плазмід здійснювали на «Neon Transfection System» («Invitrogen»). Отримані колонії відбирали індивідуально та культивували як лінії ЕСК/iPSC на мітотично інактивованих фідерних клітинах у присутності LIF. Рівень експресії SSEA-1 визначали за допомогою проточної цитофлуориметрії, локалізацію експресії транскрипційного фактора Oct4 – імуногістохімічно. Експресію генів вивчали на рівні мРНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції зі зворотньою транскрипцією. Диференційний потенціал отриманих клонів оцінювали при їх спонтанному диференціюванні *in vitro* [Okada, 2010] та формуванні тератом *in vivo* у імунодефіцитних тварин і лабораторних мишей лінії c57Bl6/N.

Було досліджено експресію факторів плюрипотентності на рівні білку – лужної фосфатази, SSEA-1, Oct4. Кількість SSEA-1 – позитивних клітин варіювала у різних клонах від 59,60% у клона 20 до 94% у клона 17, а у загальновідомих ліній плюрипотентних клітин AT25 і α PIG44 становила 91,5% і 93,0% відповідно. Показано реактивацію ендогенної експресії генів, асоційованих із плюрипотентністю – *nanog*, *rex1*, *stella*, *sall4*, *utf*, *tcl*. При спонтанному диференціюванні виявлено активацію експресії ранніх ентодермальних маркерів (AFP і Sox17) на 12-ту добу диференціювання, мезодермальних tBra – із 7-ї доби в усіх досліджуваних лініях, α MHC – лише у клоні 7 і контрольних лініях на 12-ту добу. Експресію гену *nestin*, що вважався ектодермальним маркером, спостерігали у недиференційованому стані та на усіх етапах диференціювання. При підшкірному введенні імунодефіцитним тваринам по 2×10^6 клітин отриманих клонів спостерігали формування тератом починаючи із 25-ї доби експерименту. Клонами 6 і 9 сформовано по одній пухлині, а клоном 7 і лінією α PIG44 – по дві. У мишей лінії c57Bl6/N формування тератом не виявлено.

Експериментальні дані є переконливим доказом плюрипотентності отриманих клонів, що свідчить про репрограмування соматичних клітин у потенційну лінію iPSC за допомогою системи Sleeping beauty.

Discovery of induced pluripotent stem cells (iPSCs) [Yamanaka, 2007], a prospective alternative to embryonic stem cells, was an extraordinary event in cell biology. However, the traditional viral methods of iPSC derivation are associated with certain risk for potential further use of these cells in medical practice. Usage of Sleeping Beauty system based on mobile genetic elements is a fundamentally new mechanism for reprogramming somatic cells into induced pluripotent ones [Izsvak, 2010]. Basic characteristics of potentially new mouse iPSC line, mTiPSCs (murine Transposon-induced Pluripotent Stem Cells), obtained by means of Sleeping Beauty were investigated in this research.

Transfection of embryonic fibroblasts by reprogrammed plasmid system was performed with NeonTransfection system (Invitrogen). The obtained colonies were individually selected and cultured as ESC/iPSC lines on mitotically inactivated feeder cells in the presence of LIF. Expression level of SSEA-1 was determined by flow cytometry, expression localization of transcription factor Oct4 was done by immunohistochemistry. Gene expression at the level of mRNA was studied with polymerase chain reaction with reverse transcription. Differentiation potential of obtained clones was evaluated during their spontaneous differentiation *in vitro* [Okada, 2010] and formation of teratomas *in vivo* in immunodeficient animals and c57Bl6/N mice.

The expression of pluripotency factors was studied at protein level: alkaline phosphatase, SSEA-1, Oct4. The number of SSEA-1 positive cells varied in different clones from 59.60% in clone 20 upto 94% in clone 17, while standard AT25 and α PIG44 lines their number was 91.5 and 93.0%, respectively. We have found the reactivation of endogenous expression of genes associated with pluripotency: *nanog*, *rex1*, *stella*, *sall4*, *utf*, *tcl*. During spontaneous differentiation we revealed activation of early endodermic markers expression (AFP and Sox17) to the 12th day of differentiation; mesodermal tBra starting from the 7th day in all the studied lines, and α MHC was found only in clone 7 and the control lines to the 12th day. Expression of *nestin* gene, supposed as ectodermic marker, was observed in undifferentiated state and at all the stages of differentiation. Subcutaneous introduction to immunodeficient animals of 2×10^6 cells from the experimental clones resulted in formation of teratomas starting from the 25th day of the experiment. Clones 6 and 9 formed one tumor each, and clones 7 and line α PIG44 formed by 2 tumors each. In c57Bl6/N mice no teratomas were found.

The experimental data showed strong evidence that derived clones are pluripotent, that testified the reprogramming of somatic cells to potential iPSC line using Sleeping beauty system.