

УДК 57.052:57.041:576.53

ДВОЙСТВЕННОЕ ВЛИЯНИЕ ХЛОРИДА ЛИТИЯ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОБРАЗОВАНИЯ ИПСК МЫШИ

© 2024 г. А. В. Кузнецов¹, Е. В. Скворцова¹, А. Н. Томили¹, А. С. Цимоха^{1,*}

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, Россия

*E-mail: atsimokha@incras.ru

Поступила в редакцию 06.12.2023

После доработки 11.12.2023

Принята к публикации 12.12.2023

Соматические клетки могут быть репрограммированы в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) с помощью определенных факторов. Низкая эффективность процесса репрограммирования ограничивает потенциал их применения для фундаментальных исследований, а гетерогенность получаемых иПСК – в клеточной терапии. В настоящей работе мы показываем, что хлорид лития (LiCl), известный активатор сигнального пути Wnt, снижает или усиливает эффективность генерации иПСК из эмбриональных фибробластов мыши (МЭФ) в зависимости от момента его добавления в течение процесса репрограммирования. Наши результаты не только демонстрируют способ улучшения эффективности формирования иПСК, но также указывают на двойную роль LiCl в этом процессе.

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК), LiCl, витамин С, репрограммирование, эмбриональные фибробласты мыши

Принятые сокращения: иПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; МЭФ – эмбриональные фибробласты мыши; ПСК – плюрипотентные стволовые клетки; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки

DOI: 10.31857/S0041377124030037, EDN: PENZNV

В настоящее время плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) представляют значительный интерес, как для фундаментальных исследований, так и для регенеративной медицины. Плюрипотентными, т. е. способными неограниченно делиться и дифференцироваться во все клеточные типы взрослого организма, являются эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), которые получают из клеток раннего эпибласта (первичной эктодермы) эмбрионов млекопитающих (Гордеев et al., 2021). Клетки, названные индуцированными ПСК (иПСК), обладают сходными с ЭСК характеристиками и впервые были получены в результате репрограммирования соматических клеток мыши с помощью эктопической экспрессии четырех транскрипционных факторов — Oct4, Sox2, Klf4 и c-Мyc (Takahashi, Yamanaka, 2006). К настоящему моменту стало возможным получение иПСК с использованием малых молекул (Hou et al., 2013; Guan et al., 2022), причем профили экспрессии генов в таких иПСК сходны с ЭСК и иПСК, полученных с помощью вирусной доставки транскрипционных факторов. Главным достоинством иПСК по сравнению с ЭСК, очевидно, является отсутствие этических препятствий для их получения.

Сегодня иПСК находят применение в моделировании заболеваний, в разработке и тестировании терапевтических препаратов, однако, наибольший интерес представляет потенциальная возможность их использования в тканезаместительной терапии (Yamanaka, 2020).

Первые полученные линии ЭСК мыши поддерживали в культуре в присутствии сыворотки и с использованием фидерных слоев клеток (Evans, Kaufman, 1981). Позднее, плюрипотентное состояние этих клеток научились поддерживать в культуре более эффективно, получая более однородную по экспрессии маркеров популяцию с помощью бессывороточной среды, названной 2iL и содержащей два низкомолекулярных ингибитора (2i): ингибитор киназы MEK1/2 (PD0325901) и ингибитор киназы GSK3β (CHIR99021) (Ying et al., 2008), а также ингибирующий лейкемию фактор (LIF) (Niwa et al., 2009). Важно отметить, что и репрограммирование клеток в иПСК в такой бессывороточной среде также оказалось более эффективным (Okada et al., 2010). В дальнейшем появилось множество исследований, посвященных улучшению как эффективности самого процесса репрограммирования, так и качества

получаемых клонов иПСК. Для этого использовали различные способы доставки репрограммирующих факторов в клетки, а также оптимизировали условия культивирования клеток (Hong, 2015). Например, было показано, что эффективность генерации иПСК повышалась в присутствии LiCl, который выступает в качестве ингибитора киназы GSK3β (Wang et al., 2011), а также витамина С (Esteban et al., 2010). В результате скрининга была даже разработана среда для репрограммирования, получившая название iCD1, которая отличалась от стандартной 2iL среды тем, что в ее состав были дополнительно введены LiCl, витамин С и основной фактор роста фибробластов (bFGF), но исключен ингибитор PD0325901 (табл. 1) (Chen et al., 2011).

Таблица 1. Информация о составе бессывороточных (Б/с) сред 2iL и iCD1

Название (фирма-производитель)	Концентрация или кратность	Б/с среда 2iL	Б/с среда iCD1
DMEM/F12 среда (Thermo, США)	0.5×	+	+
Neurobasal™ среда (Thermo, США)	0.5×	+	+
N2 добавка (Thermo, США)	1×	+	+
B27 добавка (Thermo, США)	1×	+	+
L-глутамин (Thermo, США)	1 мМ	+	+
Пенициллин-Стрептомицин (Thermo, США)	1×	+	+
β-меркаптоэтанол (Sigma, США)	50 мкМ	+	+
BSA 10% р-р (Sigma, США)	0.0025%	+	+
CHIR99021 (Sigma, США)	3 мкМ	+	+
PD0325901 (Sigma, США)	1мкМ	+	-
LIF (лабораторный сток)	500 Ед/мл	+	+
bFGF (Peprotech, США)	5 нг/мл	-	+
Витамин С (Sigma, США)	50 мкг/мл	-	+
LiCl (Sigma, США)	5 мМ	-	+

Несмотря на выраженный интерес к иПСК и на определенные успехи в этой области, эффективность получения и качество иПСК все равно остаются неудовлетворительными, в том числе из-за медленной кинетики процесса и многофакторных требований (Yamanaka, 2020). В связи с этим подбор оптимальных условий для получения иПСК остается актуальной задачей. В данной работе мы сравнили эффективность образования колоний иПСК в бессывороточных средах 2iL и iCD1 при репрограмми-

ровании МЭФ с помощью лентивирусного вектора, несущего четыре репрограммирующих фактора транскрипции — Oct4, Klf4, Sox2 и cMyc. Мы также обнаружили, что присутствие LiCl оказывает положительное или ингибирующее влияние на эффективность генерации иПСК в зависимости от момента его добавления в процессе репрограммирования.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клетки почки эмбриона человека линии HEK293, полученные из Российской коллекции клеточных культур позвоночных (Институт цитологии РАН), культивировали при 37 °С в среде DMEM («Биолот», Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS, Thermo, США), в присутствии пенициллина и стрептомицина («Биолот», Россия). МЭФ получали из 13.5-суточных эмбрионов мыши линии C57BL/6 по стандартной методике (Durkin et al., 2013) и культивировали в среде MEF, содержащей смесь питательных сред DMEM («Биолот», Россия) и DMEM/F-12 («Биолот», Россия) в соотношении 1:1 и 15% FBS (Thermo, США) с добавлением пенициллина и стрептомицина («Биолот», Россия).

ПЦР-анализ клеток на присутствие микоплазмы проводили с помощью набора «БиоМастер» («Биолабмикс», Россия) и специфических праймеров: 5'-TGACCATCTGTCACTCTGTAAACCTC-3' и 5'-GGGAGCAAACAGGATTAAGATACCCT-3'.

Репрограммирование МЭФ и иПСК осуществляли с помощью лентивирусной трансдукции четырех транскрипционных факторов: Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc, схема эксперимента представлена на рис. 1а. Для сборки вирусов, клетки HEK293T ко-трансфицировали плазмидами, кодирующими полицистронную доксициклин-активируемую конструкцию HAGE2-TetO-miniCMV-hOct4-F2A-hKlf4-IRES-hSox2-E2A-hcMyc-W-loxP (OKSM) (Somers et al., 2010) или белок-активатор транскрипции rtTA (FUW-M2rtTA, addgene #20342) (Carey et al., 2009), и белки необходимые для сборки вирусных частиц pMD2.G и psPAX2 (Wiznerowicz, Trono, 2003). Трансфекцию проводили с помощью полиэтиленамина PEI MAX® (PEI, PolyScience, США) согласно рекомендациям фирмы производителя. По прошествии 16 ч среду меняли на свежую, и через 48, 72 и 96 ч производили сбор кондиционированной клетками среды, содержащей вирусные частицы. Полученную среду пропускали через фильтр с диаметром пор 0.45 мкм (Milipore, США). Осадок вирусных частиц, полученный центрифугированием при 47000 g в течение 2 ч при 4 °С, растворяли в среде Opti-MEM (Thermo, США),

аликвотировали по 50 мкл и хранили при -80°C . Титр вирусов определяли методом конечных разведений и окраской клеток НЕК293 с помощью первичных антител к Oct4 (1:300; Santa Cruz, США). За сутки до заражения вирусами МЭФ высевали из расчета 5×10^4 клеток на лунку 24-луночного планшета, поверхность которой обработана 0.1 %-ным желатином (Sigma, США). На следующий день среду заменяли на бессывороточную OptiMEM и выдерживали в течение 1 ч. После этого среду отбирали и добавляли 200 мкл среды OptiMEM, содержащей смесь вирусов, несущих ОКSM и гТА, в равном соотношении. Через 3–4 ч добавляли еще 100 мкл OptiMEM и инкубировали в течение 16 ч. На следующий день среду меняли на среду MEf с добавлением доксициклина (3 мкг/мл, Sigma, США), и этот день считали нулевым с начала репрограммирования (D0). На следующий день (D1)

митотически инактивированные МЭФ (мМЭФ) (инкубация с митомицином С в концентрации 100 мкг/мл в течение 3–4 ч) высевали в количестве 3×10^5 клеток на лунку 6-луночного планшета, предварительно обработанную 0.1 %-ным желатином (Sigma, США). Ещё через день (D2) пересеивали репрограммирующиеся МЭФ на фидерный слой мМЭФ в соотношении: клетки с 1 лунки 24-луночного планшета высевали на 3 лунки 6-луночного планшета. Начиная с 3 дня (D3) репрограммирование МЭФ в иПСК осуществляли в бессывороточной среде 2iL или iCD1 (табл. 1), а также в этих средах с добавлением LiCl и/или витамина С. Репрограммирование проводили при 37°C и 5% CO_2 в течение 15 дней (D15), среду меняли на свежую каждые 2 дня.

Иммунофлуоресцентную микроскопию колоний иПСК проводили на 15 ДР, для чего клетки промы-

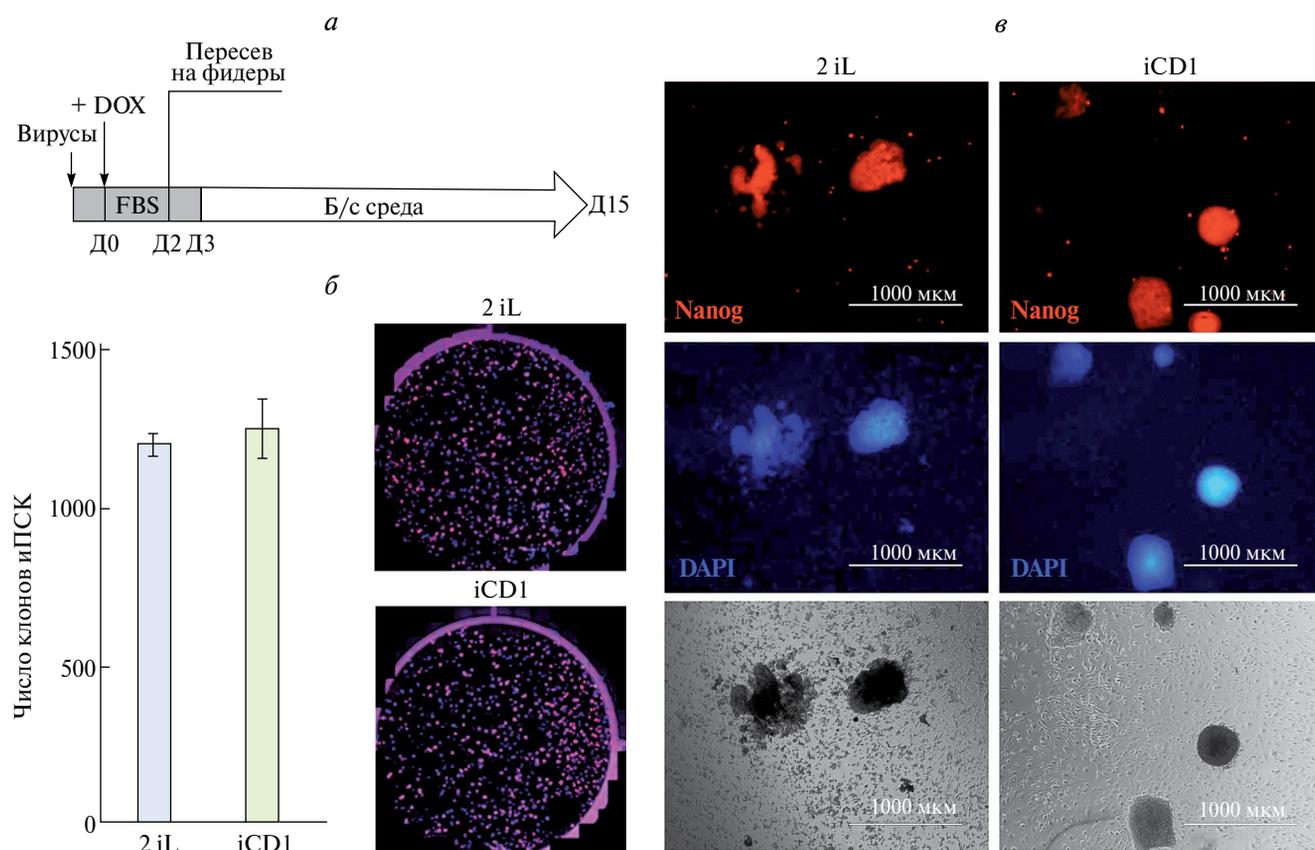


Рис. 1. Эффективность репрограммирования МЭФ в иПСК одинакова для сред 2iL и iCD1. *а* — Схема процесса репрограммирования МЭФ в иПСК; МЭФ инфицировали вирусами и на следующий день (D0) активировали экспрессию ОКSM с помощью доксициклина (DOX). Через 2 дня (D2) репрограммирующиеся МЭФ рассеивали на фидерный слой клеток и через день (D3) среду с сывороткой меняли на бессывороточную. *б* — На диаграмме представлено число Nanog-положительных колоний иПСК, образованных к 15-му дню репрограммирования (D15) в лунке 6-луночного планшета. Данные представлены в виде средних значений и стандартных отклонений SD ($n = 3$). На нижней панели представлены репрезентативные изображения целых лунок 6-луночного планшета, содержащих Nanog-положительные колонии иПСК (красный), окраска ядер DAPI (синий). *в* — Микрофотографии колоний иПСК в проходящем свете, Nanog-положительных (красный), полученных в среде 2iL (слева) и iCD1 (справа). Окраска ядер DAPI (синий). Масштабная линейка: 1000 мкм.

вали PBS и в течение 10 мин, фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида (Sigma, США) в PBS. Далее клетки промывали PBS и пермеабелизировали 0.1%-ным раствором Triton X-100 (Amresco, США) в PBS в течение 15 мин, после чего снова промывали PBS. Центры неспецифического связывания антигенов блокировали 3%-ным раствором BSA (Amresco, США) в PBSt (PBS с добавлением 0.1% Tween 20 (Amresco, США)) при комнатной температуре в течение 30 мин, после чего клетки снова промывали PBSt и инкубировали с первичными антителами к маркеру плюрипотентности Nanog (1:500, Bethyl, США) в течение ночи при 4 °C. В качестве вторичных антител использовали козы антитела против кролика, конъюгированные с флуоресцентным агентом Alexa Fluor® 647 (1:500, Jackson ImmunoResearch Laboratories, США). Ядра клеток окрашивали раствором DAPI (Sigma, США) в концентрации 0.5 мкг/мл в PBSt. Фотографии Nanog-положительных клонов и ПСК получали с помощью флуоресцентного микроскопа EVOS (Thermo, США).

Количественный и качественный анализ клонов и ПСК проводили с помощью программы ImageJ (НИН, США) методом визуального подсчета Nanog-позитивных колоний. Полученные значения представлены в виде средних значений и их стандартных ошибок.

Статистическую обработку данных проводили с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Различия полученных результатов считались статистически достоверными при уровне значимости $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе мы использовали полицистронный вектор, экспрессирующий полноразмерные Oct4, Klf4, Sox2 и cMyc человека (OKSM), разделенные пептидами 2A и последовательностью IRES. Этот вектор показал более высокую эффективность при генерации и ПСК, чем другой полицистронный вектор OSKM (Skvortsova et al., 2018). Важно отметить, что высокая гомология этих факторов транскрипции у млекопитающих позволяет использовать их для репрограммирования клеток как человека, так и мыши. Перед каждым экспериментом МЭФ тестировали на присутствие микоплазмы при помощи ПЦР со специфическими праймерами, поскольку, согласно нашему опыту, заражение микоплазмой отражается крайне негативно на эффективности репрограммирования. Репрограммирование проводили согласно схеме, представленной на рис. 1а.

Сначала мы сравнили эффективность репрограммирования МЭФ с использованием двух сред: стандартной среды 2iL и среды iCD1, разработанной специально для репрограммирования клеток в и ПСК при помощи кассеты из трех факторов OKS (Chen et al., 2011). Мы показали, что эффективность генерации и ПСК в классической среде 2iL и в среде iCD1 не отличается при использовании кассеты OKSM (рис. 1б). Однако колонии и ПСК, полученные при репрограммировании МЭФ в этих двух средах, немного отличались морфологически. Так, при культивировании в среде 2iL колонии начинали формироваться раньше (результаты не представлены), и в момент анализа они визуально имели увеличенный диаметр, большую рыхлость и фрагментарность, а также более рваные края, чем в среде iCD1 (рис. 1в). В таких клонах величина сигнала от флуоресцентной метки также могла различаться на разных участках одного и того же клона, что говорило о разной плотности и/или гетерогенности клеточной популяции в пределах одной колонии (рис. 1в). Колонии и ПСК, полученные на среде iCD1, в среднем, были меньше по размеру, имели более высокую плотность клеток, выраженную округлую форму с гладкими краями и равномерно распределенную окраску на Nanog и ДНК (DAPI) в пределах одной колонии (рис. 1в).

Предложенная ранее среда iCD1 (Chen et al., 2011) несколько отличается от стандартной среды 2iL, в том числе наличием в ее составе витамина С и LiCl (табл. 1). Положительный эффект от добавления этих соединений на генерацию и ПСК также был ранее показан (Esteban et al., 2010; Wang et al., 2011). Мы использовали данные компоненты для модификации стандартной среды 2iL в процессе репрограммирования МЭФ в и ПСК и показали, что присутствие витамина С (50 мкг/мл) с 3-го по 15-й день репрограммирования не оказывало статистически значимого влияния на эффективность колониеобразования и ПСК, тогда как присутствие 5 мМ LiCl оказывало ингибирующий эффект (рис. 2б). Интересно, что сочетанное воздействие витамина С и LiCl сглаживало негативный эффект LiCl на генерацию и ПСК (рис. 2б). Важно отметить, что мы обнаружили положительное влияние витамина С на репрограммирование МЭФ в условиях 2-кратного снижения числа клеток фидерного слоя (данные не представлены), что может указывать на возможное влияние витамина С на поддержание жизнеспособности фидерных клеток в процессе репрограммирования, что, в конечном счете, может оказывать положительное влияние на эффективность репрограммирования. Этот эффект можно также объяснить компенсирующим

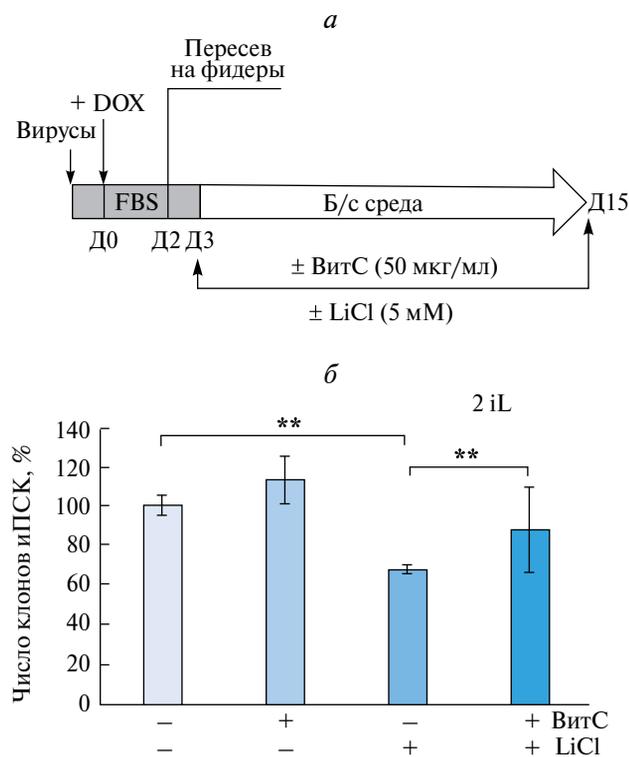


Рис. 2. Присутствие LiCl с 3-го дня репрограммирования МЭФ снижает эффективность генерации клонов иПСК в среде 2iL. *а* — Схема эксперимента по репрограммированию МЭФ в иПСК в среде 2iL. Экспрессию ОКSM активировали с помощью доксицилина (DOX). Витамин С (ВитС) в концентрации 50 мкг/мл и (или) 5 мМ LiCl добавляли начиная с 3-го дня репрограммирования (Д3) и до конца эксперимента (Д15). *б* — На диаграмме представлено процентное содержание Nanog-положительных клонов на 15-й день репрограммирования. Данные представлены в виде средних значений и стандартного отклонения ($n = 3$), ** — достоверные отличия по сравнению со средой 2iL ($p < 0.01$).

недостаток фидерных клеток влиянием витамина С и на сами репрограммирующиеся МЭФ.

Далее, поскольку вместо ожидаемого эффекта от присутствия LiCl на количество получаемых клонов иПСК наблюдали его ингибирующее влияние, мы проверили влияние LiCl на эффективность репрограммирования МЭФ в иПСК, проводимое согласно описанному ранее протоколу (Wang et al., 2011). Согласно данному протоколу, МЭФ заражали вирусами, кодирующими мышинные факторы Oct4, Sox2, Klf4 и с-Мус, а репрограммирование проводили в среде с сывороткой, которую заменяли на шестой день (Д6) на среду, содержащую вместо сыворотки ее заменитель KSR (KnockOut™ Serum Replacement, Thermo, США). Согласно протоколу, 10 мМ LiCl добавляли с 3-го по 8-й день репрограммирования (рис. 3а). Во-первых, важно отметить, что

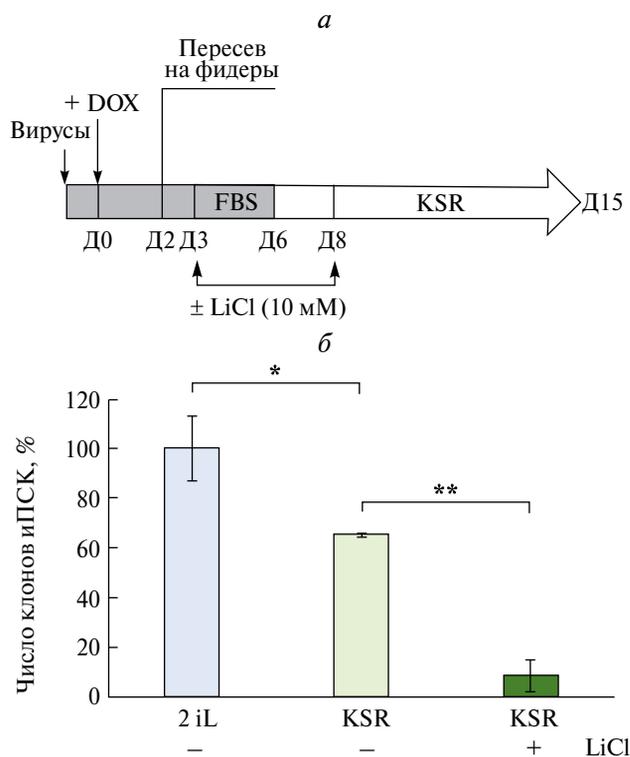


Рис. 3. Присутствие LiCl снижает эффективность генерации клонов иПСК из МЭФ в среде с заменителем сыворотки (KSR). *а* — Схема эксперимента по репрограммированию МЭФ в иПСК в среде с заменителем сыворотки (KSR). Экспрессию ОКSM активировали с помощью доксицилина (DOX). 10 мМ LiCl добавляли в период с 3-го (Д3) по 8-й день (Д8) репрограммирования. Смену среды с сывороткой на среду с KSR производили с 6-го дня репрограммирования (Д6). *б* — На диаграмме представлено процентное содержание Nanog-положительных клонов на 15-й день репрограммирования. Данные представлены в виде средних значений \pm стандартное отклонение ($n = 3$). Звездочками обозначены достоверные различия между группами (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$).

репрограммирование в среде с KSR была заметно ниже, чем в стандартной среде 2iL. Во-вторых, мы обнаружили, что LiCl оказывал негативное влияние на эффективность формирования колоний иПСК в среде KSR (рис. 3б).

Следующей задачей стало изучение роли LiCl в составе среды iCD1 на разных этапах репрограммирования. Для этого мы использовали iCD1 без LiCl (iCD1*), в которую добавляли LiCl в разные периоды репрограммирования (рис. 4). Интересно, что в iCD1* формировалось большее число колоний иПСК чем в iCD1 или стандартной среде 2iL (рис. 4б), в то время как репрограммирование в средах 2iL и iCD1 не отличалось по эффективности (рис. 1б). Это означало, что LiCl оказывает негативный эффект

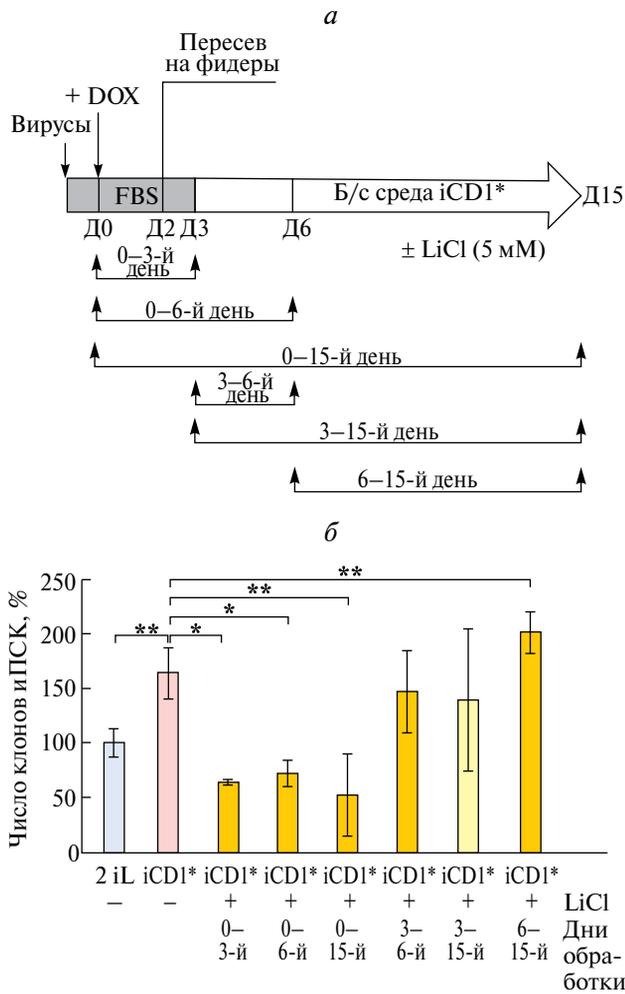


Рис. 4. Присутствие LiCl МЭФ с начала репрограммирования снижает эффективность генерации клонов иПСК в среде iCD1*, но увеличивает с 6-го дня репрограммирования. *а* — Схема эксперимента по репрограммированию МЭФ в иПСК в среде iCD1*. Экспрессию OKSM активировали с помощью доксициклина (DOX). 5 мМ LiCl добавляли в разные периоды репрограммирования. Смену среды с сывороткой на бессывороточную производили на 3-й день репрограммирования (Д3). *б* — На диаграмме представлено процентное содержание Nanog-положительных клонов на 15-й день репрограммирования. Данные представлены в виде средних значений и стандартных отклонений ($n = 3$). Звездочками обозначены достоверные отличия по сравнению со средой iCD1* (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

на колониеобразование иПСК при его добавлении с 3 дня репрограммирования.

Репрограммирование — это сложный процесс, который принято разделять на три фазы: инициация, созревание и стабилизация (David, Polo, 2014). Мы проверили, какое влияние оказывает присутствие LiCl на разных этапах репрограммирования. Для этого 5 мМ LiCl добавляли в iCD1* в различные периоды

этого процесса (рис. 4*а*). Также мы анализировали влияние LiCl при добавлении его с 3-го по 6-й день репрограммирования или до конца эксперимента, что соответствовало экспериментам в iCD1 среде (рис. 1*б*). Последний временной интервал влияния LiCl был с 6-го дня и до конца репрограммирования. Сравнительный анализ эффективности формирования иПСК колоний в этих экспериментах мы проводили относительно iCD1* среды. Как оказалось, добавление LiCl с момента активации экспрессии кассеты OKSM оказывало сильный ингибирующий эффект на формирование клонов иПСК независимо от того, присутствовал LiCl лишь в течение первых трех дней или на протяжении всего срока репрограммирования (рис. 4*б*). Это означало негативное влияние LiCl на фазе инициации репрограммирования. При этом присутствии LiCl в среде начиная с 3-го дня репрограммирования не оказывало никакого влияния на эффективность генерации клонов иПСК. Более того, начиная с 6-го дня, т. е. в фазе созревания, наблюдалось положительное влияние LiCl на конечный итог репрограммирования. При этом в среде 2iL влияние LiCl было негативным во всех временных промежутках (данные не представлены).

Известно, что Li ингибирует киназу GSK3 β (Jope, 2003), а ингибиторы GSK3 β поддерживают плюрипотентное состояние ЭСК посредством активации передачи сигналов Wnt-сигналинга (Sato et al., 2004). Показано, что передача сигналов Wnt также оказывает значимое влияние на фазу созревания иПСК, поскольку экзогенная стимуляция пути Wnt между 6-м и 9-м днями после индукции репрограммирования усиливала образование Nanog-положительных колоний (Ho et al., 2013). Поэтому неудивительно, что выраженный положительный эффект LiCl проявлялся лишь с 6-го дня после инициации репрограммирования.

С другой стороны, в недавней работе была показана роль LiCl в усилении митохондриального дыхания в нейрональных клетках-предшественниках, полученных из иПСК (Osete et al., 2021). Известно, что во время репрограммирования соматических клеток в иПСК происходят существенные изменения в клеточном метаболизме и окислительно-восстановительной передаче сигналов (David, Polo, 2014). Двойственный механизм действия митохондриальных активных форм кислорода при репрограммировании был описан (Skvortsova et al., 2022). Поэтому влияние LiCl может приводить к дисбалансу уровней митохондриальных активных форм в клетках на ранней стадии репрограммирования и, тем самым, ингибировать образование иПСК.

В заключение, следует отметить, что в силу сложности и многофакторности процесса репрограммирования пока не существует универсальных протоколов культивирования клеток в течение всего процесса. Каждый эксперимент требует начальной оптимизации условий культивирования клеток для повышения количества и качества получаемых колоний и ПСК.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-14-00390). Получение первичной культуры МЭФ проводилось при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-29-04117).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных или людей в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гордеев М. Н., Бахмет Е. И., Томилин А. Н. 2021. Динамика плюрипотентности в эмбриогенезе и в культуре. Онтогенез. V. 52. P. 429. (Gordeev M. N., Bakhmet E. I., Tomilin A. N. 2021. Pluripotency dynamics during embryogenesis and in cell culture. Russ. J. Dev. Biol. V. 52. P. 379.)
- Carey B. W., Markoulaki S., Hanna J., Saha K., Gao Q., Mitalipova M., Jaenisch R. 2009. Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. Proc. Natl. Acad. Sci. V. 106. P. 157.
- Chen J., Liu J., Chen Y., Yang J., Chen J., Liu H., Zhao X., Mo K., Song H., Guo L. 2011. Rational optimization of reprogramming culture conditions for the generation of induced pluripotent stem cells with ultra-high efficiency and fast kinetics. Cell Res. V. 21. P. 884.
- David L., Polo J. M. 2014. Phases of reprogramming. Stem Cell Res. V. 12. P. 754.
- Durkin M. E., Qian X., Popescu N. C., Lowy D. R. 2013. Isolation of mouse embryo fibroblasts. Bio-protocol. V. 3. P. e908.
- Esteban M. A., Wang T., Qin B., Yang J., Qin D., Cai J., Li W., Weng Z., Chen J., Ni S. 2010. Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell. V. 6. P. 71.
- Evans M. J., Kaufman M. H. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature. V. 292. P. 154.
- Guan J., Wang G., Wang J., Zhang Z., Fu Y., Cheng L., Meng G., Lyu Y., Zhu J., Li Y. 2022. Chemical reprogramming of human somatic cells to pluripotent stem cells. Nature. V. 605. P. 325.
- Ho R., Papp B., Hoffman J. A., Merrill B. J., Plath K. 2013. Stage-specific regulation of reprogramming to induced pluripotent stem cells by Wnt signaling and T cell factor proteins. Cell Rep. V. 3. P. 2113. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.015>
- Hong K. 2015. Cellular reprogramming and its application in regenerative medicine. Tiss. Eng. Regen. Med. V. 12. P. 80.
- Hou P., Li Y., Zhang X., Liu C., Guan J., Li H., Zhao T., Ye J., Yang W., Liu K. 2013. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. Science. V. 341. P. 651.
- Jope R. S. 2003. Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes. Trends Pharm. Sci. V. 24. P. 441.
- Niwa H., Ogawa K., Shimosato D., Adachi K. 2009. A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. Nature. V. 460. P. 118.
- Okada M., Oka M., Yoneda Y. 2010. Effective culture conditions for the induction of pluripotent stem cells. Biochim. Biophys. Acta (BBA)-General Subjects. V. 1800. P. 956.
- Osete J. R., Akkouch I. A., de Assis D. R., Szabo A., Frei E., Hughes T., Smeland O. B., Steen N. E., Andreassen O. A., Djurovic S. 2021. Lithium increases mitochondrial respiration in iPSC-derived neural precursor cells from lithium responders. Mol. Psych. V. 26. P. 6789.
- Sato N., Meijer L., Skaltsounis L., Greengard P., Brivanlou A. H. 2004. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. Nat. Med. V. 10. P. 55.
- Skvortsova E. V., Nazarov I. B., Tomilin A. N., Sinenko S. A. 2022. Dual mode of mitochondrial ROS action during reprogramming to pluripotency. Int. J. Mol. Sci. V. 23: 10924.
- Skvortsova E. V., Sinenko S. A., Tomilin A. N. 2018. Immortalized murine fibroblast cell lines are refractory to reprogramming to pluripotent state. Oncotarget. V. 9: 35241.
- Somers A., Jean J.-C., Sommer C. A., Omari A., Ford C. C., Mills J. A., Ying L., Sommer A. G., Jean J. M., Smith B. W. 2010. Generation of transgene-free lung disease-specific human induced pluripotent stem cells using a single excisable lentiviral stem cell cassette. Stem Cells. V. 28. P. 1728.
- Takahashi K., Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell. V. 126. P. 663.
- Wang Q., Xu X., Li J., Liu J., Gu H., Zhang R., Chen J., Kuang Y., Fei J., Jiang C. 2011. Lithium, an anti-psychotic drug, greatly enhances the generation of induced pluripotent stem cells. Cell Res. V. 21. P. 1424.
- Wiznerowicz M., Trono D. 2003. Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. J. Virol. V. 77. P. 8957.
- Yamanaka S. 2020. Pluripotent stem cell-based cell therapy — promise and challenges. Cell Stem Cell. V. 27. P. 523.
- Ying Q.-L., Wray J., Nichols J., Battle-Morera L., Doble B., Woodgett J., Cohen P., Smith A. 2008. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. Nature. V. 453. P. 519.

THE DUAL EFFECT OF LITHIUM CHLORIDE ON THE EFFICIENCY OF GENERATING MOUSE-INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS

A. V. Kuznetsov^a, E. V. Skvortsova^a, A. N. Tomilin^a, A. S. Tsimokha^{a, *}

^a*Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, Russia*

^{*}*e-mail: atsimokha@incras.ru*

Somatic cells can be reprogrammed into induced pluripotent stem cells (iPSCs) using certain factors. The low efficiency of the reprogramming, as well as the heterogeneity of iPSCs, limits the potential application for iPSCs in cell therapy. Here, we show that lithium chloride (LiCl), a known activator of the Wnt signaling pathway, reduces or enhances the efficiency of iPSC generation from mouse embryonic fibroblasts (MEFs) depending on the timing of its addition during the reprogramming. Our results not only demonstrate a method to improve the efficiency of iPSC formation by LiCl, but also indicate its dual role in this process.

Keywords: induced pluripotent stem cells (iPSCs), LiCl, embryonic fibroblasts (MEF), reprogramming, vitamin C