

НОВЫЕ ЛИНИИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА C612 И C910

*И. В. Кожухарова,¹ И. И. Фридлянская,¹ З. В. Ковалева,¹ Н. А. Пуговкина,¹ Л. Л. Алексеенко,²
В. В. Зенин,¹ К. М. Иванцов,² О. К. Леонтьева,² Т. М. Гринчук,¹ Н. Н. Никольский^{1,*}*

¹ Институт цитологии РАН и ² Международный центр репродуктивной медицины, Санкт-Петербург;

* электронный адрес: Nikolsky@mail.cytspb.rssi.ru

Новые линии эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека C612 и C910 получены из бластоцист на стадии вылупления. Клетки культивировали в среде mTeSR™ без добавок на фидерном слое эмбриональных мышечных фибробластов, обработанных митомицином С. Клетки охарактеризованы по маркерам плюрипотентности: щелочной фосфатазы, Oct3/4, SEEA-4, Nanog и Rex1. Методом проточной цитофлуориметрии выявлены экспрессия таких маркеров, как CD90, CD117, и отсутствие или слабая экспрессия CD13, CD34, CD45, CD130, HLA класса I и HLA класса II, что является характерной особенностью ЭСК человека. Анализ структуры кариотипа метафазных пластинок проводили с применением дифференциальной окраски хромосом на G-диски. Кариологический анализ выявил наличие клеток с нормальным кариотипом как по числу хромосом, так и по их структуре. Клетки исследованных линий являются плюрипотентными, поскольку способны дифференцироваться во все три зародышевых листка, что было показано с помощью специфических антител к нестину, виментину, кератину (маркерам эктодермы), α -фетопротейну (маркеру энтодермы), мышечному α -актину (маркеру мезодермы). Таким образом, полученные линии обладают всеми свойствами, присущими ЭСК человека, и могут быть использованы при решении как фундаментальных, так и практических задач, в частности возможности их применения в заместительной терапии.

Ключевые слова: эмбриональные стволовые клетки человека, клеточные линии, иммуноцитохимия, плюрипотентность, дифференцировка стволовых клеток.

Первые постоянные линии эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека были получены в США в 1998 г. (Thomson et al., 1998). Эта работа была отнесена к одному из наиболее крупных достижений биологии XX века. Такая оценка обусловлена тем, что линии ЭСК человека могут рассматриваться как неограниченный источник трансплантационного материала для лечения различных тяжелых заболеваний. За последние годы постоянные линии ЭСК были получены во многих лабораториях более чем 20 стран (Guhr et al., 2006; Никольский и др., 2007), в том числе в России (Крылова и др., 2003; Гордеева и др., 2006; Lagarkova et al., 2006, 2008).

При работе с любыми клеточными линиями всегда возникает вопрос о стандартизации, о правомочности сравнения данных, полученных на одной и той же линии, но в разных лабораториях. Для ЭСК человека проблема стандартизации приобретает исключительно большое значение из-за перспективы их использования в клинике. При этом стандартные показатели для клеток, предназначенных для исследовательских или терапевтических целей, могут быть различными. С 2004 г. обсуждается вопрос о том, что такое постоянная линия ЭСК, сколь неизменны ее свойства. Оказалось, что в течение культивирования многие постоянные линии ЭСК претерпевают генетические и эпигенетические изменения (Maitra et al., 2005; Никольский и др., 2007; Baker et al., 2007).

Поэтому для будущего применения дифференцированных клеток, полученных на основе ЭСК человека с

целью трансплантации, необходимо иметь запас неизменных ЭСК преимущественно ранних пассажей, который невозможно обеспечить без получения новых линий. Задачей настоящей работы было получение новых линий ЭСК из бластоцист человека.

Материал и методика

Источником клеток для получения линий ЭСК послужили избыточные бластоцисты, которые не могли быть использованы в процессе экстракорпорального оплодотворения.

Получение и культивирование. Бластоцисту 5—6-суточного развития, самостоятельно освободившуюся от белковой оболочки (пеллюциды) или после ее химического растворения с помощью кислого раствора Тироиде, помещали на подготовленный фидерный слой в лунку 4-луночной панели. Клетки культивировали на среде mTeSR при следующих условиях: 37 °С, 85 % влажности и 6 % CO₂ и ежедневная смена среды в течение 9—11 сут.

В качестве фидерной культуры использовали мышечные эмбриональные фибробласты (МЭФ), полученные в результате эксплантации 14-суточных эмбрионов самок линии CBA, скрещенных с самцами линии C57Bl/6. Клетки МЭФ растили на среде DME/F12 с добавлением 2 mM L-глутамин, смеси пенициллина и стрептомицина, 10 %

эмбриональной бычьей сыворотки; пересевали в течение 5 пассажей в соотношении 1 : 2 с использованием смеси трипсина и ЭДТА и замораживали. Для приготовления фидерного слоя культуральную посуду обрабатывали 0.1%-ным раствором желатина, поверх которого высевали клетки МЭФ 3—4-го пассажей, предварительно обработанные митомицином С в концентрации 10 мкг/мл в течение 2.5 ч. Плотность фидерной культуры составляла $25 \cdot 10^3$ кл./см².

Бластоциты, помещенные на фидерный слой, начинали увеличиваться в размере через 3 сут, и через 9—11 сут из них появлялись колонии растущих клеток. Выросшие колонии клеток разделяли на 2—4 части с помощью пластикового наконечника для пипетки под микроскопом при фазово-контрастном освещении. Агрегаты клеток переносили на свежий слой МЭФ в лунки 4-луночной панели. В дальнейшем для культивирования использовали культуральные чашки 35 и 60 мм и среду mTeSR или среду следующего состава: knockout DMEM с добавлением 20 % knockout serum replacement (заменителя сыворотки), 2 mM L-глутамина, 1 % заменимых аминокислот, 0.1 mM β-меркаптоэтанол, 25 мкг/мл пенициллина и стрептомицина и 6 нг/мл ростового фактора bFGF. Через каждые 5—6 сут колонии недифференцированных стволовых клеток разделяли на 6—10 частей механически с помощью пластикового наконечника или ножей и переносили на свежий фидер в соотношении 1 : 2; среду полностью меняли ежедневно.

Проточная цитофотометрия. Иммунофенотипирование ЭСК проводили с применением проточного цитофлуориметра Epics XL (Beckman Coulter). Использовали антитела, связанные с FITC (CD34, CD45, CD90, CD130, HLA класса I) или с PE (фикоэритрином) (CD13, CD117, HLA класса II). Пробы для проточного анализа готовили согласно указаниям фирмы-производителя.

Определение экспрессии маркеров плюрипотентности ЭСК человека с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для анализа генной экспрессии тотальную РНК из ЭСК, выделяли, используя RNesy Micro Kit согласно протоколу фирмы-производителя. Синтез кДНК проводили при помощи RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Специфичные гены ЭСК человека были амплифицированы Taq DNA polymerase на амплификаторе Cusco Temp по следующей программе: горячий старт — денатурация, 93 °C, 3 мин, отжиг праймеров, 56—67 °C, 2 мин, удлинение цепи, 72 °C, 1 мин 30 с; денатурация, 93 °C, 45 с; отжиг праймеров, 56—67 °C, 1 мин; удлинение цепи, 72 °C, 1 мин 30 с (30 циклов). Завершающее удлинение цепи — 72 °C, 10 мин. Для анализа экспрессии специфических генов плюрипотентности ЭСК использовали следующие праймеры: *oct4* — прямой праймер 5'cgaccatctgcccgtttgag 3' и обратный 5'ccscctgtccscctccta3', температура отжига 60 °C, размер продукта амплификации 577 п. н.; *rex 1* — прямой праймер 5'gctacgcaaatgaagtcaga3' и обратный 5'cagcatcctaaacagctcgcagaat3', температура отжига 56 °C, размер продукта амплификации 306 п. н. (Henderson et al., 2002); *nanog* — прямой праймер 5'caaggcaaacaccact3' и обратный 5'ctggatgtctggctgg3', температура отжига 60 °C, размер продукта амплификации 427 п. н. (Kim et al., 2005). В качестве контроля использовали ген *gapdh* — прямой праймер 5'gctcagacaccatggggaaggt3' и обратный 5'gtggtgcaggagcattgctga3', температура отжига 67 °C, размер продукта амплификации 474 п. н. (Zeng et al., 2004).

Электрофорез амплифицированного продукта проводили в 2%-ном агарозном геле, содержащем буфер TAE с бромистым этидием. В качестве маркера молекулярной массы использовали 1Kb DNA ladder. ДНК детектировали в ультрафиолете (302 нм) при помощи прибора Transilluminator. Фотографирование гелей производили цифровым фотоаппаратом Canon.

Криоконсервация. Колонии недифференцированных стволовых клеток механически разделяли на агрегаты размером в 2—4 раза больше, чем для посева. Суспензию собирали в коническую пробирку, в которой они оседали в течение 10 мин, затем верхний слой среды сливали, а к суспензии по каплям добавляли равный объем 20%-ного раствора DMSO в эмбриональной сыворотке. Кривоизалы с клетками замораживали со скоростью 1 °C/мин и хранили в жидком азоте. Разморозку клеток проводили, быстро нагревая ампулу в водяной бане при 37 °C, содержимое переносили в коническую пробирку, затем по каплям добавляли 10 мл теплой ростовой среды. Пробирку центрифугировали со скоростью 800 об/мин в течение 3 мин при комнатной температуре. Осадок суспендировали 1—2 раза в 2 мл ростовой среды и распределяли по лункам 4-луночной панели, содержащим приготовленный накануне слой МЭФ. Среду меняли ежедневно, и через 10—12 сут в лунках вырастали 1—2 колонии недифференцированных стволовых клеток.

Иммуноцитохимия. Колонии стволовых клеток выращивали на покровных стеклах, помещенных в чашки Петри 35 мм, в течение 4—5 сут. Стекла окрашивали по общепринятому протоколу. Кратко: клетки фиксировали 4%-ным параформальдегидом на PBS в течение 20 мин, пермеабелизовывали 0.1%-ным раствором Тритона X-100 в течение 10 мин, забивку проводили в растворе 1%-ного BSA в течение 30 мин и инкубировали с первыми и вторыми антителами по 40 мин. Все операции проводили при комнатной температуре. В качестве первых антител использовали мышиные моноклональные антитела против SSEA-4 в разведении 1 : 50, Oct 3/4 (1 : 100), цитокератина 18 (1 : 50), виментина (1 : 20), α-фетопротейна (1 : 500), мышечной изоформы α-актинина (супернатант), поликлональные антитела против нестина (1 : 100). В качестве вторых антител использовали козы антимышинные антитела, конъюгированные с флуорохромом Alex Fluor488 (1 : 800) или Cy3 (1 : 500); для выявления нестина использовали антикроличьи антитела, конъюгированные с Cy3. Ядра клеток подкрашивали иодистым пропидием (0.5 мкг/мл) или DAPI (1 мкг/мл). Покровные стекла заключали в глицериновый буфер, содержащий 1 % пропилгалата, и анализировали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Leica TCS CL (Германия).

Активность щелочной фосфатазы в недифференцированных стволовых клетках определяли с использованием набора реагентов «Sigma Diagnostics Alkaline Phosphatase (AP) leukocyte» согласно протоколу фирм-производителей.

Дифференцировка *in vitro*. Спонтанную дифференцировку стволовых клеток получали, используя методику образования эмбрионидных тел (Itskoviz-Eldor et al., 2000). Колонии стволовых клеток разделяли механически на 4 части и выдерживали в ростовой среде без добавления bFGF в «висячей капле» в течение 2 сут, а затем в течение 1 нед в суспензии в чашках, дно которых было покрыто 1.5%-ным агаром, для того чтобы избежать прикрепления клеток к субстрату. Среду меняли через 2 сут.

Суспензию эмбрионидных тел помещали в чашки Петри с покровными стеклами, покрытыми раствором 0.1%-ного желатина, и культивировали в течение 10 сут на среде DMEM/F12 с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки. Выросшие колонии были окрашены иммуноцитохимически антителами против маркеров дифференцировки в энтодерму (α -фетопротеина), мезодерму (мышечная изоформа α -актинина) и эктодерму (виментина, нестина). Другой способ спонтанной дифференцировки состоял в том, что переросшие колонии стволовых клеток (7—9 сут после пересева) с помощью коллагеназы IV в концентрации 1 мг/мл пересевали на чашки Петри с покровными стеклами, обработанными желатином, но без фидерного слоя МЭФ. Использовали среду DMEM/F12, содержащую 20 % эмбриональной сыворотки, 2 mM L-глутамин, 1 % заменимых аминокислот, 1%-ный раствор ITS (инсулин/трансферрин/селенит). Смену среды проводили через каждые 2 сут; через 12 сут культивирования в чашке появлялись колонии сокращающихся кардиомиоцитов; клетки окрашивали иммунохимически с использованием антител против мышечной изоформы α -актинина (маркер мезодермы).

Кариотипирование. Препараты метафазных хромосом получали по обычной схеме: накопление клеток в стадии метафазы с использованием митостатика, обработка их гипотоническим раствором, фиксация, раскапывание клеточной суспензии на предметные стекла. В качестве митостатика использовали 0.02%-ный раствор колхицина. Колонии ЭСК снимали с подложки смесью раствора трипсина с ЭДТА. Гипотоническую обработку ЭСК проводили 0.56%-ным раствором KCl. Время инкубации ЭСК в присутствии колхицина и KCl подбирали экспериментально. Клетки фиксировали стандартным способом в трех сменах свежеприготовленной охлажденной смеси метилового спирта и ледяной уксусной кислоты (3 : 1). Фиксированный материал раскапывали на влажные охлажденные предметные стекла. Препараты метафазных хромосом высушивали при 37 °C.

Хромосомы окрашивали на G-диски красителем Гимза в фосфатном буфере (pH 6.4) после предварительной обработки 0.25%-ным раствором трипсина по модифицированному методу Сибрайт (Seabright, 1971).

Метафазные пластинки анализировали с помощью светового микроскопа (Carl Zeiss, Германия) с использованием иммерсионного объектива 100 \times и по микрофотографиям. Идентифицировали хромосомы в соответствии со стандартной номенклатурой (Yunis, 1980; Мамаева, 2002).

Для культивирования использовали: knockout DMEM, knockout заменитель сыворотки, L-глутамин, заменимые аминокислоты, ITS (инсулин/трансферрин/селенин), смесь пенициллина и стрептомицина, смесь трипсина и ЭДТА (Gibco, США), DMEM/F12 (Биолот, Россия), mTeSR (StemCellTechnology, Канада), эмбриональную бычью сыворотку (HyClone, США), коллагеназу IV, меркаптоэтанол (ICN, США), bFGF, H₂O, DMSO, кислый раствор Тироиде, желатин (Sigma, США), стеклянные ножи для пересева колоний (SweMed AB, Швеция), 4-луночные панели IVF, чашки Петри 35 и 60 мм (Nunc, Дания); антитела: мышинные моноклональные антитела против виментина, против α -фетопротеина, антикроличьи антитела, конъюгированные с Cy3 (Sigma, США), мышинные моноклональные антитела против SSEA-4, цитокератина 18, кроличьи поликлональные антитела против нестина, козы антимышинные антитела, конъюгированные с флуо-

рохромом Alex Fluoro488 или Cy3 (Chemicon, США), мышинные моноклональные антитела против Oct 3/4 (SantaCruz Biotechnology, США), мышинные моноклональные антитела против α -актинина (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург); другие реагенты: Sigma Diagnostics Alkaline Phosphatase (AP) leukocyte kit, DAPI, PBS, колхицин, агарозу, бромистый этидий, EDTA, минеральное масло (Sigma, США); 1Kb DNA ladder (Gibco, США); RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, Taq DNA polymerase (recombinant) (Fermentas, Литва); RNesy Micro Kit (Qiagen, Израиль); краситель Гимза, таблетки для приготовления (BDH, Англия); нефлуоресцирующее иммерсионное масло (Carl Zeiss, Германия).

Результаты и обсуждение

Хотя недавно было показано, что соматические клетки с помощью трансфекции определенным набором генов можно репрограммировать в ЭСК (Ju et al., 2007), главным источником материала для получения ЭСК человека являются бластоцисты. Бластоциста состоит из двух клеточных типов: внутренней массы и трофэктодермы. ЭСК происходят из клеток внутренней массы; клеточные линии из трофэктодермы практически не получают. Однако присутствие трофэктодермы затрудняет рост клеток внутренней массы, поэтому для успешного размножения в культуре их нужно изолировать от трофэктодермы. Для этого существуют механический способ с помощью игл (Amit et al., 2002) или лазера (Turetsky et al., 2008) и наиболее распространенный метод иммунохирургии. Последний метод основан на использовании специфических сывороток к клеткам человека и последующей обработке бластоцист комплекментом. Однако в настоящее время от такого подхода предпочитают отказываться, потому что процедура предполагает использование материалов животного происхождения, что недопустимо для использования ЭСК в терапевтических целях, и потому что нестандартное качество используемых реагентов создает определенные трудности. Этот метод получения ЭСК человека был заимствован из первоначальных работ по получению мышинных ЭСК, однако многие исследователи, получающие новые линии мышинных ЭСК, предпочитают избегать его и используют цельные бластоцисты (Bryja et al., 2006). Использование бластоцист на стадии вылупления, когда трофэктодерма нарушается естественным образом, описано и для получения ЭСК человека (Heins et al., 2004). Линии C612 и C910 были получены нами также из целых бластоцист без использования метода иммунохирургии.

После помещения бластоцист с удаленной пеллюцидой на фидерный слой рост клеток внутренней массы наблюдали на 3—4-е сут. Через 9—10 сут вырастали большие колонии, которые пересевали механически, выбирая колонии с типичной морфологией и разделяя их на кусочки с помощью пластикового наконечника пипетки. Последующие пассажи делали через 5—6 сут. К настоящему времени максимальное число пассажей (около 40) прошла линия C612. Обе линии поддерживаются на фидере МЭФ, инактивированных митомицином С, и пересеваются механически без использования ферментативной обработки. Такой способ является довольно трудоемким, но позволяет дольше сохранять исходные свойства линии при длительном культивировании.

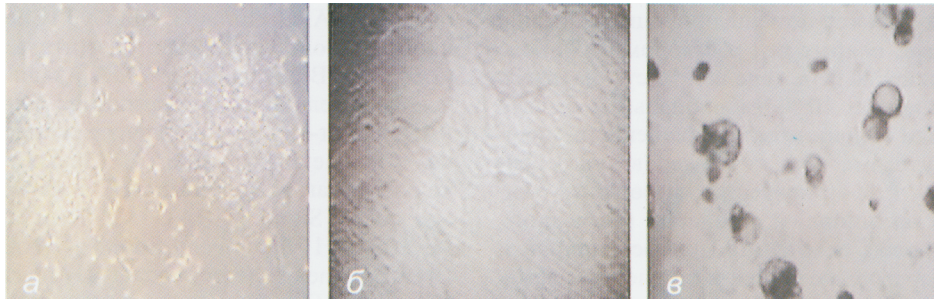


Рис. 1. Тип роста эмбриональных стволовых клеток человека линий С612 (а) и С910 (б) при культивировании на фидерном слое (а, б) или в суспензии на неадгезивной поверхности для образования эмбрионидных тел (в).

Фазовый контраст. Об. 10×.

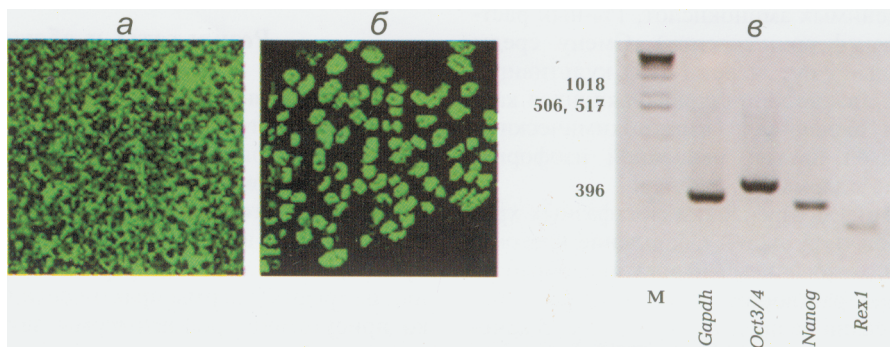


Рис. 2. Иммунофлуоресцентный (а, б) и ПЦР-анализ (в) экспрессии плюрипотентных маркеров в клетках линии С612.

Обе линии имеют сходную морфологию колоний: округлую или овальную с четко выраженными границами. Колонии состоят из плотно упакованных клеток с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением (рис. 1). Поскольку обе линии практически не различаются по своим характеристикам, их подробное описание будет дано в основном для линии С612.

Экспрессия маркеров плюрипотентности ЭСК человека. Плюрипотентные маркеры определяли методами иммунофлуоресценции, цитохимии и ПЦР (рис. 2, 3). На рис. 2 видно, что клетки экспрессируют поверхностный плюрипотентный маркер SSEA-4 и Oct-4, который локализуется в ядре. Экспрессия Oct-4 показана также и методом ПЦР. Помимо этого, ПЦР выявила экспрессию генов *nanog* и *rex1*. Клетки были позитивны при окраске на щелочную фосфатазу. Окраска клеток на щелочную фосфатазу позволяет не только оценить их плюрипотентность в растущих колониях, но и гетерогенность всей популяции (O'Conner et al., 2008). Практически 100 % колоний линии С612 окрашиваются на щелоч-

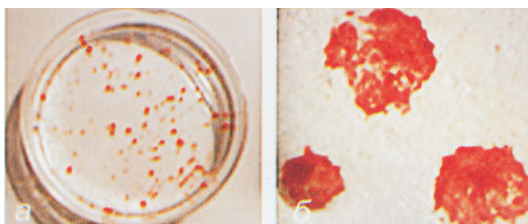


Рис. 3. Экспрессия щелочной фосфатазы в клетках линии С612.

а — чашка Петри с окрашенными колониями; б — отдельные колонии под микроскопом, Об. 10×.

ную фосфатазу (рис. 3), что свидетельствует о том, что линия С612 по экспрессии плюрипотентных маркеров гомогенна. Аналогичные результаты получены на линии С910.

Кариотипический анализ с использованием окраски на G-диски показал, что полученные нами клетки имеют нормальный кариотип как по числу, так и по структуре хромосом. На рис. 4 представлен кариотип клетки линии С612 на 10-м пассаже.

Иммунофенотипирование. Общепринятыми маркерами плюрипотентности ЭСК человека являются транскрипционные факторы *Nanog*, *Oct-4*, поверхностные гликолипидные (*SSEA3* и *SSEA4*) и кератин-сульфатные (*TRA-1-60* и *TRA-1-81*) антигены и др. Однако оказалось что ЭСК человека экспрессируют также поверхностные антигены, ранее рассматриваемые как маркеры других клеток (Carpenter et al., 2004). На рис. 5 представлены результаты иммунофенотипирования клеток С612 с антителами к гемопоэтическим маркерам и HLA-антигенам. Согласно литературным данным, HLA-I-антигены, экспрессирующиеся почти во всех клетках организма человека, в ЭСК экспрессируются слабо; антигены HLA-II обнаруживаемые на поверхности В-лимфоцитов, макрофагов и дендритах, в ЭСК практически не выявляются (Drukker et al., 2002). С этими наблюдениями полностью совпадают наши результаты, полученные с помощью проточной цитометрии (рис. 5). На рис. 5 видно, что клетки С612 характеризуются высоким уровнем экспрессии CD90 (известный также как *Thy-1*-антиген) и CD117 (известный также как *c-kit*). CD90-антиген, обнаруженный впервые на тимоцитах, впоследствии был идентифицирован у многих клеток, хотя по-прежнему функция его остается малоизвестной. Оказалось, что его присутствие является типичным и для ЭСК (Carpenter et al., 2004; Vodyanik et al.,

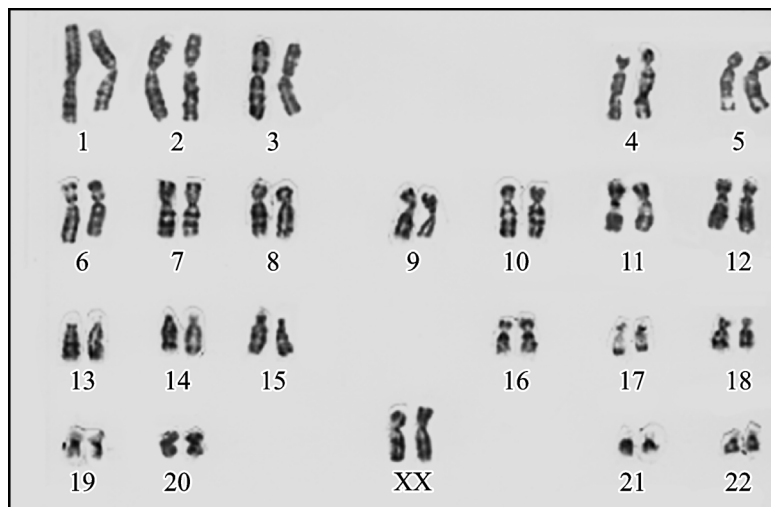
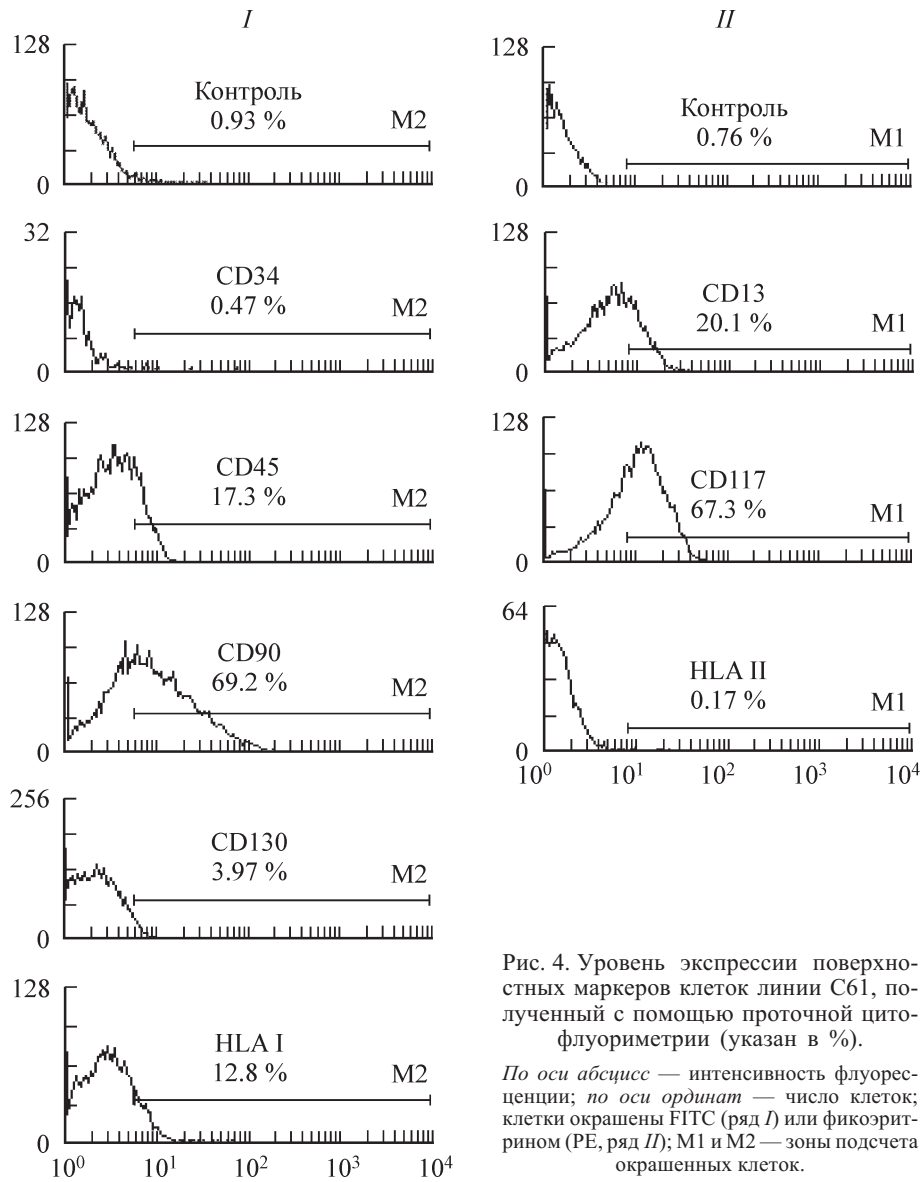


Рис. 5. Кариотип клеток линии С610 (2n = 46, XX).

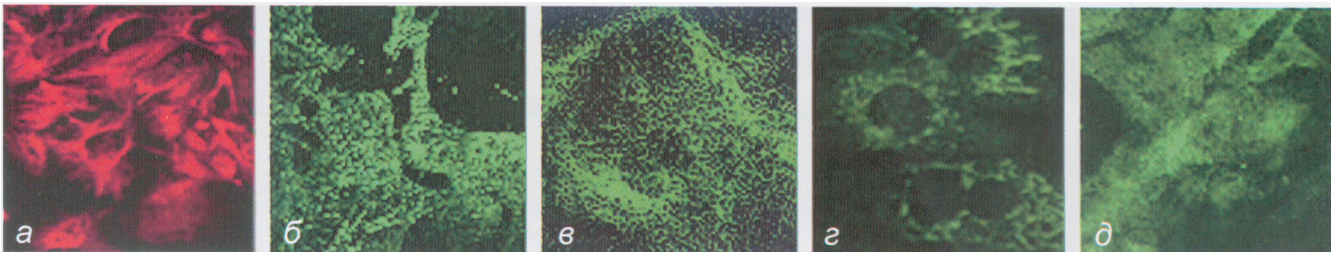


Рис. 6. Спонтанная дифференцировка клеток линии С612.

Окраска клеток на нестин (а), мышечный α -актинин (б), виментин (в), α -фетопротеин (г), цитокератин 18 (д). Об. 63 \times .

2005; Zhou et al., 2007). В полученных нами линиях ЭСК также обнаружен высокий уровень экспрессии этого антигена. Типичным для ЭСК (Hoffman, Carpenter, 2005; Vodyanik et al., 2005) является высокий уровень экспрессии антигена CD117 (c-kit), который был открыт как поверхностный маркер гемапоэтических предшественников в костном мозге. Этот антиген является тирозин-киназным рецептором III для цитокинового фактора стволовых клеток (SCF). CD117 контролирует жизнеспособность клеток и их дифференцировку. Другие гемапоэтические маркеры (CD13, CD34 и CD45) в изучаемых нами клетках экспрессировались слабо или вовсе не идентифицировались (рис. 4). На поверхности клеток С612 (рис. 5) не выявлен также антиген CD130 (или gp130).

Данные об экспрессии gp130 в ЭСК противоречивы. С одной стороны, он не идентифицируется методом проточной цитофлуориметрии (Carpenter et al., 2004; Hoffman, Carpenter, 2005); с другой стороны, его экспрессия выявляется ПЦР и иммуноблотингом (Daheron et al., 2004; Humphrey et al., 2004; Davey et al., 2007). Gp130 является рецептором для цитокинов семейства LIF/IL6 и играет важную роль в поддержании плюрипотентности и самообновления мышинных ЭСК. Известно, что плюрипотентность мышинных ЭСК регулируется LIF. Недифференцированное состояние мышинных ЭСК поддерживается активацией STAT3, которая регулируется сигнальным путем через CD130 (Yoshida et al., 1994). В ЭСК человека LIF также индуцирует фосфорилирование STAT3 и перемещение его в ядро (Daheron et al., 2004). Однако, несмотря на возможную функциональную активность сигнального пути STAT3—LIF, плюрипотентные свойства ЭСК человека в отличие от мышинных ЭСК не зависят от LIF. В плюрипотентных ЭСК человека, культивируемых на подложках, заменяющих фидерные клетки, STAT3 неактивен, что свидетельствует об иных сигнальных механизмах, контролирующих самообновление ЭСК человека (Daheron et al., 2004).

Дифференцировочные потенции клеток С612 и С910. При культивировании *in vitro* ЭСК человека сохраняют способность дифференцироваться во все 3 зародышевых листка, т. е. практически во все клетки взрослого организма. Спонтанную дифференцировку клеток С612 и С910 индуцировали или посевом переросших колоний ЭСК в среде с сывороткой на подложку, покрытую желатином, т. е. на бесфидерный слой, или предварительно получали эмбрионные тельца и затем перенесли их в те же условия. Эмбрионные тельца обычно получают (Itskovitz-Eldor et al., 2000), культивируя агрегаты ЭСК в ростовой среде без добавления bFGF в суспензион-

ных условиях, т. е. в сосудах, у которых поверхность не обладает адгезивными свойствами (некультуральная пластиковая посуда). Для того чтобы агрегаты ЭСК не прикреплялись к субстрату, мы покрывали поверхность чашек 1.5%-ным агаром. Через 10—12 сут культивирования клеток в таких условиях образовывались эмбрионные тельца. Сначала большинство из них является простыми эмбрионными тельцами, которые состояли из плотно упакованных клеток. Со временем в центре таких структур образуется полость, в которой накапливается жидкость. Такие структуры называют цистическими эмбрионными тельцами и в них обнаруживают клетки, принадлежащие всем 3 зародышевым листкам. На рис. 1, в видны эмбрионные тельца (простые и цистические), образованные клетками линии С612. Клетки эмбрионных телец, высеванные на адгезивные подложки, подвергаются дальнейшей спонтанной дифференцировке. Способность ЭСК С612 дифференцироваться в разных направлениях была исследована методом иммунофлуоресценции в помощь маркеров, специфичных для клеток, происходящих из разных зародышевых листков (рис. 6). В спонтанно дифференцирующихся культурах клетки С612 окрашивались антителами против нестина, цитокератина 18, виментина (маркеров эктодермы), α -фетопротеина (маркера энтодермы), мышечной изоформы α -актинина (маркера мезодермы), а также наблюдалось спонтанное сокращение кардиомиоцитов, т. е. их функциональная дифференцировка. Эти наблюдения подтверждали иммунофлуоресцентным исследованием. При окраске таких культур антителами против мышечной изоформы α -актинина, локализованного в Z-дисках миофибрилл, в клетках хорошо видна исчерченность (рис. 6, б).

Таким образом, полученные нами линии С612 и С910 характеризуются всеми свойствами ЭСК человека (самообновлением, экспрессией плюрипотентных маркеров, способностью дифференцироваться в клетки всех трех зародышевых листков) и могут быть использованы как в фундаментальных исследованиях, так и в практических целях для решения медицинских и фармакологических задач.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФАНИ (госконтракт № 02.512.11.2219).

Список литературы

Гордеева О. Ф., Красникова Н. Ю., Ларионова А. В., Крылова Т. А., Полянская Г. Г., Зиновьева Р. Д., Гуляев Д. В., Прыжкова Д. В., академик Никольский Н. Н., академик Хру-

- цов Н. Г. 2006. Анализ экспрессии генов, специфических для плюрипотентных и первичных половых клеток, в линиях эмбриональных стволовых клеток человека и мыши. Докл. РАН 406 : 835—839.
- Крылова Т. А., Зенин В. В., Мусорина Н. С., Баранов В. С., Бичева Н. К., Корсаков В. С., Никольский Н. Н., Пинаев Г. П., Полянская Г. Г. 2003. Получение и характеристика постоянных линий эмбриональных стволовых клеток человека. Цитология. 45 (12) : 1172—1177.
- Мамаева С. Е. 2002. Атлас хромосом постоянных клеточных линий человека и животных. М.: Наука. 231 с.
- Никольский Н. Н., Габай И. А., Сомова Н. В. 2007. Эмбриональные стволовые клетки человека. Проблемы и перспективы. Цитология. 49 : 529—537.
- Amit M., Itskovitz-Eldor J. 2002. Derivation and spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. J. Anat. 200 : 225—232.
- Baker E. C., Harrison N. J., Maltby E., Smith K., Moore H. D., Shaw O. J., Health P. R., Holden H., Andrews P. 2007. Adaptation of culture of human embryonic stem cells and oncogenesis *in vivo*. Nat. Biotechnol. 25 : 206—215.
- Bryja V., Bonilla S., Cajanek L., Parish C. L., Schwartz C. M., Luo Y., Rao M. S., Arenas E. 2006. An efficient method for the derivation of mouse embryonic stem cells. Stem Cells. 24 : 844—849.
- Carpenter M. K., Rosler E. S., Gregory J., Fisk J. G., Brandenberger R., Ares X., Miura T., Lucero M., Rao M. S. 2004. Properties of four human embryonic stem cell lines maintained in a feeder-free culture system. Develop. Dynamics. 229 : 243—258.
- Dahéron L., Opitz S. L., Zaehres H., Lensch W. M., Andrews P. A., Itskovitz-Eldor J., Daleya G. Q. 2004. LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. Stem Cells. 22 : 770—778.
- Davey R. E., Onishi K., Mahdavi A., Zandstra P. W. 2007. LIF-mediated control of embryonic stem cell self-renewal emerges due to an autoregulatory loop. FASEB J. 21 : 2020—2032.
- Drukker M., Katz G., Urbach A., Schuldiner M., Markel G., Itskovitz-Eldor J., Reubinoff B., Mandelboim O., Benvenisty N. 2002. Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 99 : 9864—9869.
- Guhr A., Kurtz A., Friedgen K., Oser P. L. 2006. Current state of human embryonic stem cell research: an overview of cell lines and their use in experimental work. Stem Cells. 24 : 2187—2191.
- Heins N., Englund M. C., Sjöblom C., Dahl U., Tønning A., Bergh C., Lindahl A., Hanson C., Semb H. 2004. Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells. Stem Cells. 22 : 367—376.
- Henderson J. K., Draper J. S., Baillie H. S., Fishel S., Thomson J. A., Moore H., Andrews P. W. 2002. Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. Stem Cells. 20 : 329—337.
- Hoffman L. M., Carpenter M. K. 2005. Human embryonic stem cell stability. Stem Cell Rev. 1 : 139—144.
- Humphrey R. K., Beattie G. M., Lopez A. D., Bucay N., King C. C., Firpo M. T., Rose-John S., Hayek A. 2004. Maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells is STAT3 independent. Stem Cells. 22 : 522—530.
- Itskovitz-Eldor J., Schuldiner M., Karsenti D., Eden A., Yanuka O., Amit M., Soreq H., Benvenisty N. 2000. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies comprising the three embryonic germ layers. Mol. Med. 6 : 88—95.
- Lagarkova M. A., Volchkov P. Y., Lyakisheva A. V., Philonenko E. S., Kiselev S. L. 2006. Diverse epigenetic profile of novel human embryonic stem cell lines. Cell Cycle. 5 : 416—420.
- Lagarkova M. A., Volchkov P. Y., Philonenko E. S., Pfannkuche K., Prokhorovich M. A., Zabolina T., Hescheler J., Kiselev S. L. 2008. CD 30 is a marker of undifferentiated human embryonic stem cells rather than a biomarker of transformed hESCs. Cell Cycle. 7 : 3610—3612.
- Maitra A., Arking D. E., Shivapurkar N., Ikeda M., Stastny V., Kassaei K., Sui G., Cutler D. J., Liu Y., Brimble S. N., Noaks-son K., Hyllner J., Schulz T. C., Zeng X., Freed W. J., Crook J., Abraham S., Colman A., Sartipy P., Matsui S. I., Carpenter M., Gazdar A. F., Rao M., Chakravarti A. 2005. Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. Nat. Genet. 37 : 1099—1103.
- O'Conner M. D., Kardel A., Iosrfini I., Youssef D., Lu M., Li M. M., Vercauteren S., Nagy A., Eaves C. J. 2008. Alkaline phosphatase-positive colony formation is a sensitive, specific and quantitative indicator of undifferentiated human embryonic stem cells. Stem Cells. 26 : 1109—1116.
- Seabright M. 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. Lancet. 11 : 971—972.
- Thomson J. A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S. S., Waknitz M. A., Swiergiel J. J., Marshall V. S., Jones J. M. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science. 282 : 1145—1147.
- Turetsky T., Aizenman E., Gil Y., Weinberg N., Shufaro Y., Revel A., Laufer N., Simon A., Abeliovich D., Reubinoff B. E. 2008. Laser-assisted derivation of human embryonic stem cell lines from IVF embryos after preimplantation genetic diagnosis. Hum. Reprod. 23 : 46—53.
- Vodyanik M. A., Bork J. A., Thomson J. A., Igor I., Slukvin I. I. 2005. Human embryonic stem cell-derived CD34⁺ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. Blood. 105 : 617—626.
- Yoshida K., Chambers I., Nichols J., Smith A., Saito M., Yasukawa K., Shoyab M., Taga T., Kishimoto T. 1994. Maintenance of the pluripotential phenotype of embryonic stem cells through direct activation of gp130 signalling pathways. Mech. Develop. 45 : 163—171.
- Yu J., Maxim A., Vodyanik M. K., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J. L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G. A., Ruotti V., Stewart R., Igor I., Slukvin I. I., Thomson J. A. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science. 318 : 1917—1920.
- Yunis J. J. 1980. Nomenclature for high resolution human chromosomes. Cancer Genet. Cytogenet. 2 : 221—229.
- Zeng X., Miura T., Luo Y., Bhattacharya B., Condie B., Chen J., Ginis I., Lyons I., Mejido J., Puri R. K., Rao M. S., Freed W. J. 2004. Properties of pluripotent human embryonic stem cells BG01 and BG02. Stem Cells. 22 : 292—312.
- Zhou B. Y., Ye Z., Chen G., Gao Z. P., Zhang Y. A., Chen L. 2007. Inducible and reversible transgene expression in human stem cells after efficient and stable gene transfer. Stem. Cells. 25 : 779—789.

NOVEL HUMAN EMBRYONIC STEM CELL LINES C612 AND C910

*I. V. Kozhucharova,¹ I. I. Fridlyanskaya,¹ Z. V. Kovaleva,¹ N. A. Pugovkina,¹ L. L. Alekseenko,¹
V. V. Zenin,² K. M. Ivantsov,² O. K. Leontieva,² T. M. Grinchuk,¹ N. N. Nikolsky^{1,*}*

¹ Institute of Cytology RAS and ² International Centre of Reproductive Medicine, St. Petersburg;
* e-mail: Nikolsky@mail.cytspb.rssi.ru

Novel human embryonic stem cell lines C612 and C910 have been established from hatching blastocytes. Cells were cultivated in mTeST™ medium on mouse fibroblast feeder-layers. They express common pluripotent markers such as alkaline phosphatase, Oct 3/4, SEEA-4, Nanog, Rex1. Immunophenotyping of these cells by flow cytometry revealed expression of CD90 (Thy-1) and CD117 (c-kit) antigens and weak or no expression of CD13, CD34, CD45, CD130, HLA class I and HLA class II antigens. This pattern of surface antigen expression is common for human embryonic stem cells. G-banding assay of C612 and C910 metaphase plates showed that karyotypic structure of these cells was normal both in chromosome number and structure. The cells are pluripotent because of their capability to generate embryoid bodies, undergo spontaneous differentiation and express markers of all germ layers: nestin, keratin, vimentin (ectoderm), α -fetoprotein (entoderm), and muscle α -actinin (mesoderm). Thus, C612 and C910 cells have all attributes of typical human embryonic stem cells (diploid, capable of self-renewal, express pluripotent markers and differentiate into three germ layers) and may be of potential use for fundamental and regenerative medicine researches.

Key words: human embryonic stem cells, cell lines, pluripotent markers, spontaneous differentiation, immunofluorescentation.
