

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НОВЫХ ЛИНИЙ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, КОСТНОГО МОЗГА И КРАЙНЕЙ ПЛОТИ ЧЕЛОВЕКА

© Т. А. Крылова, А. М. Кольцова, В. В. Зенин, А. С. Мусорина,
Т. К. Яковлева, Г. Г. Полянская¹

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
¹*электронный адрес: poljansk@mail.cytspb.rssi.ru*

Получены новые неиммortalизованные фибробластоподобные клеточные линии человека из разных источников: из эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) (линии SC5-MSC и SC3a-MSC), из костного мозга 5—6-недельного эмбриона (линия FetMSC) и из крайней плоти 3-летнего ребенка (линия FRSN). Все линии успешно используются в качестве фидера при культивировании ЭСК человека. Среднее время удвоения клеточных популяций колеблется в зависимости от линии от 25.5 ч у линии SC5-MSC до 38.8 ч у линии SC3a-MSC. Кривые роста свидетельствуют об активной пролиферации клеток всех линий. Количественный и структурный кариотипический анализ показал, что эти линии имеют нормальный кариотип: 46, XX (SC5-MSC и SC3a-MSC) и 46, XY (FetMSC и FRSN). Для определения статуса этих линий провели сравнительный анализ поверхностных маркеров с помощью проточной цитофлуориметрии и выявили экспрессию поверхностных антигенов, характерных для МСК человека (CD44, CD73, CD90, CD105 и HLA-ABC), и отсутствие экспрессии CD34 и HLA-DR. Обнаружили межлинейные различия по уровню экспрессии маркера CD117 (c-kit). Иммунофлуоресцентный и цитофлуориметрический анализ экспрессии поверхностных маркеров и транскрипционного фактора Oct-4, характерных для ЭСК человека, показал, что во всех четырех линиях отсутствует экспрессия TRA-1-60 и Oct-4, а по экспрессии SSEA-4 наблюдаются межлинейные различия, не зависящие от происхождения клеток. Пока неясно, имеют ли обнаруженные межлинейные различия существенное влияние на функциональный статус мезенхимных стволовых клеток (МСК). С помощью иммунофлуоресцентного анализа в клетках всех линий показана экспрессия маркеров ранней дифференцировки в производные трех зародышевых листков, характеризующих ЭСК, что, возможно, обеспечивает широкие возможности МСК при репарации разных тканевых повреждений в зависимости от соответствующего микроокружения. Показана способность клеток всех линий направленно дифференцироваться в адипогенном и остеогенном направлениях.

Ключевые слова: линии мезенхимных стволовых клеток человека, иммунофлуоресцентный анализ, поверхностные клеточные маркеры, кариотип.

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), выделенные из ранних эмбрионов млекопитающих, являются уникальными плюрипотентными клеточными популяциями *in vitro*, обладающими способностью к самообновлению, т. е. к неограниченной пролиферации, и одновременно способностью дифференцироваться во все типы соматических клеток и в линию половых клеток. Линии ЭСК являются уникальной экспериментальной моделью для фундаментальных исследований в разных областях клеточной и молекулярной биологии, а также для прикладных исследований в области регенеративной медицины, фармакологии и токсикологии.

В настоящее время в разных странах мира есть уже более 600 постоянных линий ЭСК человека (Cheng et al., 2003; Cowan et al., 2004; Inzunza et al., 2005; Oh et al., 2005; Ellerstrom et al., 2006; Chavez et al., 2008; Кожухарова и др., 2009; Крылова и др., 2009; Aguilar-Gallardo et al., 2010; Englund et al., 2010; Priddle et al., 2010; Skottman, 2010; Ström et al., 2010; Кольцова и др., 2011).

Культивирование ЭСК в отличие от большинства других клеток имеет свою специфику. Для успешной пролиферации ЭСК необходимо культивирование их на слое фидерных клеток, которые продуцируют факторы, способствующие росту ЭСК. Фидерными клетками служат фибробласты разного происхождения. В настоящее время многие исследователи используют фибробласты человека, чтобы избежать заражения ЭСК человека ретровирусами или другими патогенами грызунов (Martin et al., 2005; Skottman et al., 2006; Kubikova et al., 2009). В качестве фидеров широко используются фибробласты крайней плоти человека и мезенхимные стволовые клетки (МСК), полученные из разных источников, в частности из ЭСК человека (Olivier et al., 2006; Lian et al., 2007; Choo et al., 2008). Линии МСК, полученные из ЭСК, обладают рядом преимуществ по сравнению со взрослыми мезенхимными клетками. Так, эти клетки имеют большой пролиферативный потенциал, потому что являясь неиммortalизованными, молодыми популяциями, активно делят-

ся длительное время и переживают более 50 удвоений. Проллиферативный же потенциал взрослых мезенхимных клеток существенно зависит от возраста донора. Кроме этого, аутогенный фидер исключает риск заражения возможными инфекциями от аллогенных доноров фидерных клеток (Stojkovic et al., 2005; Choo et al., 2008; Chen et al., 2009; Fu et al., 2010). Генетическая однородность ЭСК с аутогенным фидером, возможно, способствует оптимальному взаимодействию двух клеточных систем при длительном культивировании.

Известно, что помимо «фидерной» функции мультипотентные МСК разного происхождения, так же как и плюрипотентные ЭСК, могут использоваться в регенеративной медицине. Но если ЭСК пока имеют только потенциальную возможность для такого использования в связи с рядом трудностей (Donovan, Geahart, 2001; Odorico et al., 2001; Drukker et al., 2002; Drukker, Benvenisty, 2004; Гордеева, Миталипов, 2008; Lee et al., 2010), то взрослые МСК после определенного тестирования могут относительно безопасно использоваться в клеточной терапии. Однако при их использовании возникают проблемы, связанные с невозможностью получения большого количества клеток из-за их невысокого пролиферативного потенциала и из-за использования инвазивных методов их получения от доноров. МСК, полученные из ЭСК человека, по-видимому, могут явиться альтернативной моделью для использования их в клеточной терапии. Эти клеточные популяции, сходные со взрослыми МСК по гомогенной фибробластоподобной морфологии, основным поверхностным маркерам, иммуномодулирующим свойствам и мультипотентной дифференцировке, являются неограниченным источником получения генетически однородных клеточных популяций без использования инвазивных процедур. Кроме того, они обладают большим, чем взрослые МСК, пролиферативным потенциалом, более низкой экспрессией генов HLA-ABC и увеличенной экспрессией ряда туморсупрессорных генов (Barberi et al., 2005; Lian et al., 2007; Trivedi, Nematti, 2008; de Peppo et al., 2010; Lee et al., 2010; Choo, Lim, 2011; Gruenloh et al., 2011; Nematti, 2011; Tan et al., 2011).

В связи с тем что каждая линия ЭСК человека генетически уникальна, для проведения фундаментальных и биомедицинских прикладных исследований важно иметь линии МСК, полученные из разных генетических источников, т. е. в данном случае из разных линий ЭСК.

Представляет существенный интерес получение МСК из костного мозга раннего эмбриона человека. Известно, что МСК, полученные из эмбрионального материала, имеют ряд преимуществ перед взрослыми МСК при использовании их в регенеративной медицине. Эти клетки близки по своим свойствам к МСК, выделенным из ЭСК, в частности они имеют высокий пролиферативный потенциал и низкий уровень экспрессии генов основного комплекса гистосовместимости (Mimeault, Vatra, 2006; Сухих и др., 2008).

Выше было упомянуто о фибробластах крайней плоти человека, успешно используемых в качестве фидера для культивирования ЭСК (Novatta et al., 2003; Inzunza et al., 2005; Крылова и др., 2009; Ström et al., 2010; Кольцова и др., 2011). Эти клетки могут использоваться и для регенеративной медицины, так как направленно дифференцируются в производные трех зародышевых листков и имеют сходные маркеры с МСК (Toma et al., 2005; Lorenz et al., 2008; Huang et al., 2010).

Задачей настоящей работы было получение из разных источников: ЭСК, костного мозга раннего эмбриона и крайней плоти 3-летнего ребенка, четырех линий фибробластоподобных клеток, их идентификация как МСК, а также сравнение линий между собой по морфологии, пролиферативной активности, кариотипу, поверхностным маркерам и способности к направленной дифференцировке.

Основной вывод работы состоит в том, что в составе популяций фибробластов независимо от их происхождения (крайняя плоть, костный мозг, ЭСК) содержатся клетки, имеющие сходные характеристики, которые позволяют использовать их как в качестве фидера для ЭСК, так и для эмбриологических исследований и регенеративной медицины.

Материал и методика

Для получения МСК из линий ЭСК человека колонии ЭСК диссоциировали до единичных клеток при помощи 0.05 %-ной смеси трипсина и версена (Trypsin/EDTA, Invitrogen, США), переводили на гидрофобную (неадгезионную) поверхность пластиковой чашки и культивировали в среде для ЭСК без добавления основного фактора роста фибробластов (bFGF; Chemicon, США). В этих условиях клетки культивировали в течение 10 сут до образования эмбрионидных телец (ЭТ). Через 10 сут образовавшиеся ЭТ переносили на гидрофильную (адгезионную) поверхность чашки и последующее культивирование проводили в среде α -MEM с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (FBS; NuClone, США). Через несколько суток вокруг прикрепившихся ЭТ выявляли зону роста дифференцированных клеток. Из полученной популяции выделяли однородные зоны пролиферирующих фибробластоподобных клеток, аккуратно изолировали их, контролируя под микроскопом, и после диссоциации до единичных клеток переносили на новые пластиковые чашки. В результате длительного культивирования получили линии фибробластоподобных клеток.

Помимо получения МСК из ЭСК, МСК выделяли из костного мозга абортивного материала 5—6-недельного эмбриона. Клетки костного мозга выделяли из зачатков конечности путем многократного промывания ее фосфатно-солевым буфером, не содержащим ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} (PBS; Биолот, Россия). Полученную клеточную суспензию центрифугировали в течение 5—7 мин при 1000 об/мин. После промывания осадка в PBS и последующего центрифугирования его ресуспендировали в среде DMEM/F12 (Биолот, Россия), содержащей 20 % FBS. Клеточную суспензию переносили на поверхность пластиковых чашек и культивировали в течение 2 сут в ростовой среде с добавлением уже 10 % FBS. Затем прикрепившиеся к поверхности чашек клетки промывали 2 раза в PBS и культивировали в течение 10 сут в ростовой среде, меняя ее каждые 2—3 сут, до образования монослоя фибробластоподобных клеток. В результате последующего длительного культивирования получили линию фибробластоподобных клеток.

Для выделения фибробластов крайней плоти использовали донорский материал от здорового ребенка 3 лет, предоставленный детской клиникой «Вабу» с разрешения родителей пациента.

Кусочек кожи тщательно отмывали от крови в PBS, отделяли дерму от эпидермиса, а затем разрезали на фраг-

менты объемом 1 мм³ с помощью стерильных ножниц. Затем измельченную ткань инкубировали в 0.1 %-ном растворе коллагеназы I типа (Gibco, США) при 37 °C в течение 30 мин на шейкере, инактивируя действие фермента добавлением FBS. Полученную суспензию клеток центрифугировали, осадок промывали в PBS и ресуспендировали в среде IMDM (Invitrogen, США), содержащей 10 % FBS. Далее единичные клетки переносили в чашки, поверхность которых была предварительно проинкубирована с FBS в течение 1 ч при 37 °C и затем высушена. Прикрепившиеся клетки культивировали, меняя среду каждые 2—3 сут, до образования монослоя.

Все клеточные линии постоянно культивировали в условиях 5 % CO₂, при 37 °C и 90 % влажности.

Криоконсервацию всех клеточных линий проводили в кондиционированной среде, содержащей 5 %-ный (для линии FRSN) или 10 %-ный (для остальных) криопротектор диметилсульфоксид (DMSO; Биолот, Россия).

С целью получения более однородной клеточной популяции линии МСК, полученные из ЭСК, подвергали низкотемпературному шоку. Для этого снятые с поверхности чашки клетки отмывали PBS от остатков культуральной среды и ферментов, помещали в криопробирки по 1.5—2 млн в каждую и повторно центрифугировали в течение 3—5 мин при 1000 об/мин для получения плотного осадка. Всю надосадочную жидкость тщательно убирала. Криопробирки с плотным осадком из клеток помещали в криоконтейнер Mr. Frosty (Nuncclone, США) и оставляли в холодильной камере при –80 °C на 1—2 сут, не добавляя криопротектор. Ранее подобный метод применяли для получения истинных МСК, выделенных из подкожно-жировой ткани человека (Савченкова, Коржикова, 2010).

Для характеристики пролиферативной активности оценивали индекс пролиферации (ИП) — отношение числа клеток в данный момент к исходному числу посеянных клеток — и строили кривые роста клеточных популяций. Для измерения среднего времени удвоения клеточной популяции в каждом варианте анализировали 3 повторности при ежесуточном подсчете числа клеток в течение 5 сут (120 ч). Среднее время одного удвоения клеточной популяции определяли по формуле (Седова, 2008):

$$a_0 = \frac{t \ln 2}{\ln \frac{M_t}{M_0}},$$

где M_t — количество клеток в момент времени t , M_0 — начальное количество клеток, t — время логарифмической фазы роста клеточной культуры, a_0 — период удвоения клеточной массы.

Кариотипический анализ полученных линий проводили на 12—14-м пассажах культивирования. Для получения препаратов метафазных хромосом за 4 ч до фиксации в культуру вводили колcemид (CaroMAX, 0.1 мкг/мл; GIBCO, США), снимали клетки с субстрата смесью трипсина и версена (1 : 3), проводили гипотоническую обработку смесью 0.075 М раствора KCl и 1 %-ного раствора цитрата натрия. Клетки фиксировали смесью метанола с ледяной уксусной кислотой (3 : 1). Для количественного кариотипического анализа препараты метафазных хромосом окрашивали водным раствором Гимза (1 : 50). Модальное число хромосом и пределы изменчивости клеток по числу хромосом определяли при анализе 100 метафазных пластинок; долю полиплоидных клеток оценивали при анализе 500 метафазных пластинок в каж-

дой клеточной линии. Для структурного кариотипического анализа проводили дифференциальное G-окрашивание хромосом в соответствии с ранее описанной методикой (Ozkinay, Mitelman, 1979). Анализировали не менее 20 метафаз в каждой линии (50, 50, 22 и 20 в SC5-MSC, SC3a-MSC, FetMSK и FRSN соответственно). Кариотипы анализировали с помощью микроскопа Axio Imager.M1 (Carl Zeiss, ФРГ) с системой автоматического кариотипирования Ikaros 4 Karyotyping System (MetaSystems, Германия) и описывали в соответствии с Международной номенклатурой хромосом человека ISCN (2009).

Для определения статуса полученных клеточных линий анализировали экспрессию поверхностных антигенов с помощью проточной цитофлуориметрии на цитометре Beckman Coulter (США). Экспрессию каждого маркера оценивали по 4 экспериментам для клеток, находящихся между 4-м и 14-м пассажами. Иммунофенотипирование полученных клеточных линий проводили с помощью панели конъюгатов CD-маркерных моноклональных антител с флуорохромами. В работе использовали моноклональные антитела против CD-45, CD-34, CD-117 (c-kit), HLA-ABC и HLA-DR (Caltac, США), CD-44, CD-73, CD-105 (Beckman Coulter, США) и CD-90 (Chemicon, США). В качестве негативного контроля использовали очищенные мышиные антитела IgG1/Fitc и IgG1/RFE (DAKO, Дания). Клетки снимали с поверхности чашки с помощью 0.05 %-ного раствора трипсина с версеном и отмывали от него раствором PBS, не содержащим ионов Ca²⁺ и Mg²⁺. Полученную суспензию клеток (1 млн/мл) аликвотировали на пробы по 30 мкл, добавляли к каждой из них по 3 мкл антител и инкубировали при 4 °C в течение 30 мин. Далее пробы доводили до оптимального объема (0.3—0.4 мл) буфером FACS (PBS, содержащий 1 % BSA и 0.05 % азида натрия).

Для анализа с помощью проточной цитофлуориметрии суспензии клеток фиксировали 1 %-ным раствором параформальдегида в течение 20 мин при комнатной температуре. После отмывки раствором PBS без ионов Ca²⁺ и Mg²⁺ клетки инкубировали в течение ночи при 4 °C с первыми антителами против SSEA-4 и TRA-1-60 (Chemicon, США, разведение 1 : 50), заново отмывали и инкубировали со вторыми конъюгированными флуоресцеином антителами (Millipore, США). Вторые антитела разводили в соотношении 1 : 500 и инкубировали с ними препараты в течение 1 ч в темноте при комнатной температуре.

Для иммунофлуоресцентного анализа экспрессии поверхностных маркеров, характерных для эмбриональных стволовых клеток, и экспрессии маркеров ранней дифференцировки в производные трех зародышевых листков использовали антитела против SSEA-4, TRA-1-60 и транскрипционного фактора Oct-4 (Santa Cruz, США), а также против α -актинина (тест на мезодерму), α -фетопро-теина (тест на эндодерму) (Sigma США) и нестина (тест на эктодерму) (Chemicon, США). Клетки фиксировали 4 %-ным раствором параформальдегида в течение 20 мин при комнатной температуре, блокировали 0.1 %-м раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA, Sigma, США) в течение 1 ч, пермеабилizовывали 0.1 %-ным раствором Тритона X-100 в течение 15 мин при комнатной температуре и инкубировали в течение ночи при 4 °C с первыми антителами. Все антитела разводили в соотношении 1 : 50. Вторые антитела (Fitz, Millipore, США) разводили в соотношении 1 : 500 и инкубировали с ними препараты в течение 1 ч в темноте при комнатной температуре. После трех отмывок препараты докрашивали

ядерным красителем Hoechst 33342 (2 мкг/мл, Sigma, США) в течение 10 мин при комнатной температуре. В качестве отрицательного контроля использовали клетки, меченные только вторыми антителами. Анализ проводили с использованием микроскопа Zeiss LSM 5 Pascal.

Для подтверждения статуса МСК проводили индукцию остеогенной и адипогенной дифференцировки по модифицированному методу (Reyes et al., 2001).

Для направленной остеогенной дифференцировки клетки в концентрации 10 тыс. кл./см² высевали в среду следующего состава: 90 % α -МЕМ (Биолот, Россия), 10 % FBS, 10 мМ β -глицерофосфата натрия (Sigma, США), 10⁻⁸ М дексаметазона (Sigma, США), 50 мкг/мл аскорбата натрия (ICN, США). Индукцию дифференцировки проводили в течение 2 нед. Среду меняли через каждые 3—4 сут.

В качестве маркеров дифференцировки исследовали активность клеточной щелочной фосфатазы и распределение солей кальция во внеклеточном матриксе культуры клеток.

Для определения активности щелочной фосфатазы клетки в течение 20 мин фиксировали 4 %-ным параформальдегидом, а затем 30 мин обрабатывали BCIP/NBT Liquid Substrate System (Sigma, США) при 37 °С.

Реакцию von Kossa, позволяющую выявить нерастворимые соли кальция в межклеточном пространстве, проводили следующим образом: клетки фиксировали в метаноле 2 мин при -20 °С. В течение 1 ч окрашивали 2 %-ным раствором нитрата серебра (AgNO₃) (Вектон, Россия) под лампой мощностью 60 Вт. Окрашенные клетки промывали дистиллированной водой и на 5 мин помещали в 2.5 %-ный раствор тиосульфата натрия (Na₂S₂O₅). Затем окрашенные клетки снова промывали водой и высушивали.

Для направленной адипогенной дифференцировки клетки (в концентрации 10 тыс. кл./см²) высевали в среду следующего состава: 90 % α -МЕМ, 10 % FBS, 10⁻⁸ М дексаметазона, 50 мкг/мл аскорбата натрия, 1×ITS (100-кратный раствор, включающий в себя инсулин, трансферрин, селенит натрия в концентрациях, не указанных производителем) (Invitrogen, США), 1×LA-BSA (100×-раствор, содержащий 1 мкг/мл линолевой кислоты и 100 мкг/мл BSA). Обработку клеток проводили в течение 2 нед. Среду меняли через каждые 3—4 сут.

Для выявления дифференцировки клетки промывали PBS без ионов Ca²⁺ и Mg²⁺, фиксировали в метаноле в течение 2 мин при -20 °С. Фиксированные клетки промывали 50 %-ным этанолом и окрашивали красителем Oil Red O в течение 10 мин. Окрашенные клетки промывали

50 %-ным этанолом, затем дистиллированной водой и высушивали на воздухе.

Полученные результаты по направленной дифференцировке всех линий оценивали под световым микроскопом (Nicon eclipse TS 100, Япония).

Результаты обрабатывали статистически с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при вероятности нулевой гипотезы, $P < 0.05$.

Результаты и обсуждение

В результате длительного культивирования получили линии фибробластоподобных клеток, которые назвали согласно источнику их получения SC5-MSC и SC3a-MSC (из ЭСК), FetMSC (из костного мозга раннего эмбриона человека) и FRSN (из крайней плоти ребенка).

Морфологический анализ линий SC5-MSC, SC3a-MSC, FetMSC и FRSN показал гомогенность клеточных популяций. Клеточные линии SC5-MSC, SC3a-MSC и FetMSC были представлены мелкими, а линия FRSN — крупными, сильно вытянутыми фибробластоподобными клетками (рис. 1). Все 4 линии могут быть использованы в качестве фидера при культивировании ЭСК, которые имеют нормальную морфологию в виде плоских колоний и обладают всеми характеристиками, подтверждающими статус ЭСК человека (данные не показаны).

Анализ клеток полученных линий, прошедших 12—14 пассажей, показал, что все они активно делятся. Но есть и ряд различий по характеру кривых роста (рис. 2). Рост клеточной популяции SC5-MSC резко отличается от остальных линий. Так, пролиферация клеток SC5-MSC начинается практически сразу же после посева клеток и активно продолжается в течение 96 ч. У клеток линии SC3a-MSC активный рост начинается на 2-е сут и продолжается до 96 ч, а у клеток линий FetMSC и FRSN активный рост начинается на 3-и сут и завершается к 72 ч. Среднее время одного удвоения клеточной популяции для этих линий составляет 25.5 ± 0.1 (линия SC5-MSC), 38.8 ± 1.0 (SC3a-MSC), 33.5 ± 1.4 (FetMSC) и 30.0 ± 0.8 (FRSN) ч. Для линии SC3a-MSC среднее время удвоения было достоверно больше, чем для SC5-MSC, FRSN ($P < 0.01$) и для FetMSC ($P < 0.05$). Наименьшее, достоверно отличающееся от остальных трех линий время удвоения было для линии SC5-MSC ($P < 0.01$). Следует отметить, что наибольшие различия были установлены между двумя линиями, полученными из линий ЭСК, которые существенно отличались друг от друга по ряду характеристик, в частности для линии SC5 время удвоения

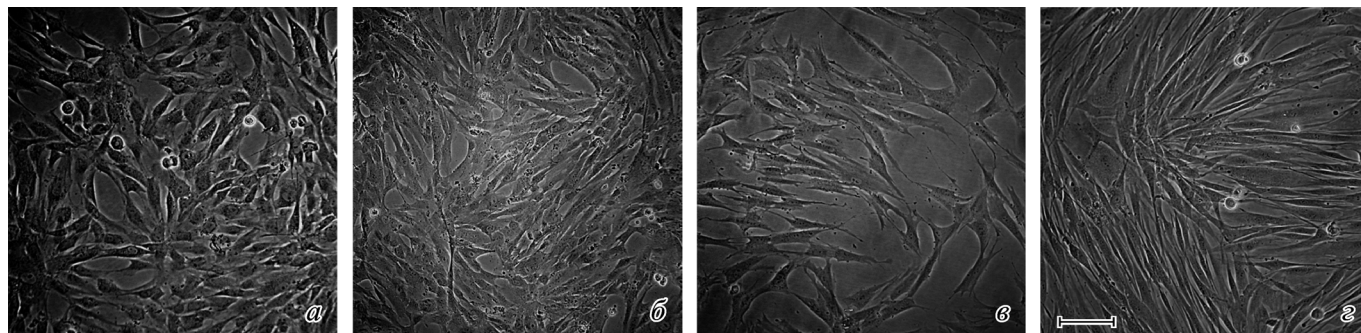


Рис. 1. Морфология клеток линий SC5-MSC (а), SC3a-MSC (б), FetMSC (в) и FRSN (г). Масштабная линейка — 200 мкм.

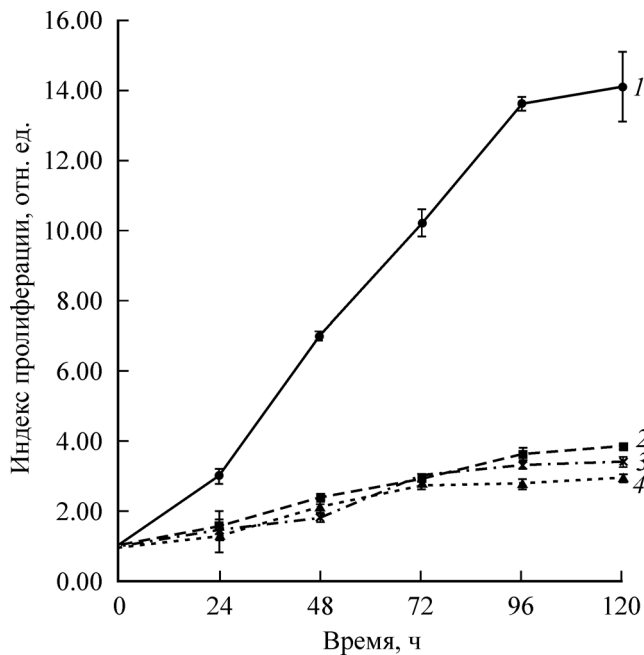


Рис. 2. Кривые роста клеточных линий SC5-MSC (1), SC3a-MSC (2), FetMSC (3), FRSN (4).

было достоверно больше, чем для SC3a ($P < 0.01$) (Кольцова, 2011). Таким образом, характер различий между линиями ЭСК и их производными оказался противоположным, что может свидетельствовать о том, что ЭСК и ЭСК-МСК, являясь разными по своим свойствам, все же сохраняют различия по данному параметру, хотя и отраженные зеркально. Исходя из указанных выше номеров пассажей анализ пролиферативной активности соответствует 26 (SC5-MSC и SC3a-MSC) и 20 (FetMSC и FRSN) удвоениям клеточных популяций. Длительное культивирование линии SC5-MSC показало, что пролиферативная активность не снижается во всяком случае до 27-го пассажа, что соответствует 59 удвоениям клеточной популяции, и совпадает с ранее полученными данными (De Perro et al., 2010). Напротив, при культивировании линии FetMSC пролиферативная активность после 16-го пассажа (27 удвоений клеточной популяции) существенно не снижается, но начинает постепенно ухудшаться рост ЭСК на этом фидере. Сходный эффект был отмечен при культивировании фибробластов крайней плоти человека. Клетки проходят более 50 удвоений клеточной популяции, но активная пролиферация и хороший рост ЭСК на этом фидере наблюдаются до 25-го пассажа (Unger et al., 2008). Это явление демонстрирует возрастную зависимость пролиферативной активности, свойственную неиммортизированным клеточным линиям, согласно теории Хейфлика (1997).

Количественный кариотипический анализ линий SC5-MSC, SC3a-MSC, FetMSC и FRSN показал, что эти линии характеризуются высокой частотой клеток с модальным числом хромосом, равным 46 (100.0 ± 1.0 , 97.0 ± 1.7 , 97.0 ± 1.7 и 98.5 ± 1.2 % соответственно). Наблюдается низкая доля полиплоидных клеток в линиях SC5-MSC, SC3a-MSC и FetMSC: 0.9 ± 0.4 , 3.0 ± 0.8 , 3.0 ± 0.8 % соответственно. А в линии FRSN частота полиплоидов увеличена (13.0 ± 1.5 %) по сравнению с остальными линиями ($P < 0.01$). Структурный кариотипический анализ показал, что все линии имеют нормальный ка-

риотип человека: 46, XX (SC5-MSC и SC3a-MSC) и 46, XY (FetMSC и FRSN) (рис. 3). При этом в отдельных клетках отмечены структурные изменения хромосом. Так, в линии SC5-MSC структурные перестройки хромосом были выявлены в 4 из 50 проанализированных клеток (рис. 3, а): делеция хромосомы 17 del(17)(p11.2), дицентрическая хромосома dic(9;13) с сопутствующим парным фрагментом и аномальный характер бандирования хромосом 8 и 16.

В линии SC3a-MSC структурные перестройки хромосом выявлены в 4 из 50 проанализированных клеток (рис. 3, б): делеции хромосом 2 del(2)(p11) и 17 del(17)(p11.2), дицентрическая хромосома dic(5;14) с парным фрагментом, межхромосомный хроматидный обмен с участием хромосом 2, 5 и 9 (данные не показаны); в линии FetMSC только в 1 из 22 проанализированных клеток обнаружена структурная перестройка хромосомы 19 (рис. 3, в), а в линии FRSN структурных перестроек хромосом не обнаружили (рис. 3, г). Выявленные нами структурные хромосомные изменения носят неклональный характер, и их частота не превышает принятого при кариотипировании предельно допустимого уровня хромосомных аномалий (Meisner, Johnson, 2008). Таким образом, по характеру дифференциального G-окрашивания хромосом при уровне разрешения 400 дисков на гаплоидный набор хромосом кариотипы клеточных линий SC5-MSC, SC3a-MSC, FetMSC и FRSN, прошедшие 12—14 пассажей, соответствуют нормальному кариотипу человека.

Следует подчеркнуть, что кариотипический анализ крайне важен для проверки статуса неиммортизированных МСК, так как в отличие от большинства неиммортизированных клеточных линий человека, которые спонтанно не иммортализируются, взрослые МСК при длительном культивировании могут приобрести свойство иммортальности. Так, культивирование взрослых МСК в течение нескольких месяцев привело к спонтанной иммортализации и опухолевой трансформации, выражающейся, в частности, в неслучайных кариотипических изменениях, связанных как с анеуплоидией, так и со структурными перестройками хромосом (Rubio et al., 2005).

Для подтверждения статуса полученных линий, как МСК, был проведен сравнительный анализ поверхностных маркеров с помощью проточной цитофлуориметрии, который показал как сходство, так и ряд различий между линиями (см. таблицу). Из этих результатов следует наличие экспрессии поверхностных антигенов, характерных для МСК человека: CD44, CD73, CD90, CD105 и HLA-ABC. На клетках не выявлена экспрес-

Экспрессия поверхностных маркеров в клетках линий SC5-MSC, SC3a-MSC, FetMSC и FRSN

| Маркер | SC5-MSC | SC3a-MSC | FetMSC | FRSN |
|---------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| CD44 | 99.3 ± 0.5 | 99.6 ± 0.2 | 99.5 ± 0.1 | 98.7 ± 0.3 |
| CD73 | 99.6 ± 0.2 | 99.5 ± 0.3 | 99.6 ± 0.1 | 98.9 ± 0.4 |
| CD90 | 57.3 ± 1.5 | 50.2 ± 12.5 | 87.4 ± 4.6 | 98.4 ± 0.9 |
| CD105 | 97.5 ± 1.4 | 94.7 ± 0.8 | 95.4 ± 2.5 | 93.8 ± 1.3 |
| CD34 | 0.13 ± 0.07 | 0.33 ± 0.10 | 0.20 ± 0.08 | 0.6 ± 0.4 |
| CD117 | 28.0 ± 14.1 | 54.6 ± 19.0 | 16.7 ± 7.0 | 69.0 ± 12.0 |
| HLA-ABC | 37.0 ± 15.0 | 35.7 ± 9.9 | 26.4 ± 0.2 | 71.5 ± 6.4 |
| HLA-DR | 0.27 ± 0.01 | 0.26 ± 0.04 | 0.20 ± 0.04 | 0.19 ± 0.09 |

Примечание. Приведены средние ($\bar{x} \pm s_x$ %) из четырех экспериментов.

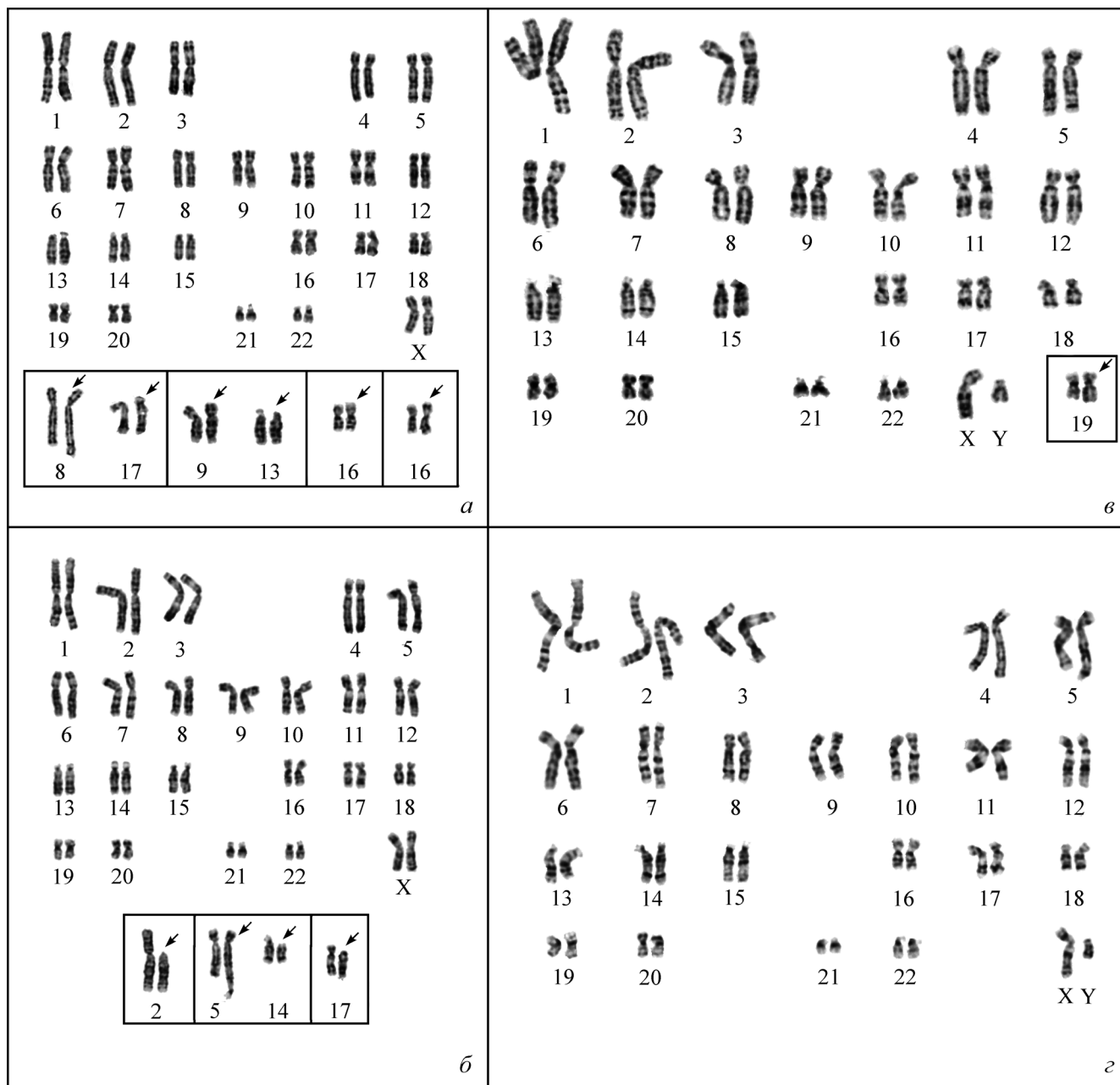


Рис. 3. Кариотипы клеточных линий SC5-MSC (а), SC3a-MSC (б), FetMSC (в) и FRSN (г).

а — кариотип клеточной линии SC5-MSC: 46,XX; в рамке — аномальный характер бандирования хромосомы 8 и делеция хромосомы 17 del(17)(p11.2); дигентрическая хромосома dic(9;13) с сопутствующим парным фрагментом; дополнительный материал на коротком плече хромосомы 16 add(16)(p13.3); аномальный характер бандирования хромосомы 16. б — кариотип клеточной линии SC3a-MSC: 46,XX; в рамке — делеция хромосомы 2 del(2)(p11); дигентрическая хромосома dic(5;14) с парным фрагментом; делеция хромосомы 17 del(17)(p11.2). в — кариотип клеточной линии FetMSC: 46,XY; в рамке — аномальный характер бандирования хромосомы 19. г — кариотип клеточной линии FRSN: 46,XY. Все структурно перестроенные хромосомы указаны стрелками.

сия антигенов CD34 и HLA-DR. Линии SC5-MSC и SC3a-MSC не различаются между собой по экспрессии этих маркеров. Наиболее стабильными оказались маркеры CD44, CD73 и CD105. Уровень экспрессии маркера CD90 в линиях SC5-MSC и SC3a-MSC был значительно ниже, чем в FetMSC и FRSN ($P < 005$). Кроме того, экспрессия CD90 в линии SC3a-MSC была менее стабильной: пределы колебаний между опытами составили для этой линии 26.4—85.6, но никакой временной зависимости отмечено не было. Исключение составляет маркер CD117 (c-kit), экспрессия которого всегда присутствует в линиях SC5-MSC и SC3a-MSC, причем заметно

увеличивается в процессе культивирования от 5-го до 14-го пассажа. Так, в линии SC5-MSC уровень экспрессии CD117 (c-kit) выглядит так: 3.2 (пассаж 5), 28.8 (пассаж 7) и 52.1 % (пассаж 14); в линии SC3a-MSC — 2.64 (пассаж 4), 60.5 (пассаж 7), 60.6 (пассаж 8) и 94.6 % (пассаж 14).

Ранее было показано, что при выделении МСК из подкожно-жировой ткани, подвергнутой длительному низкотемпературному шоку без использования криопротектора, сохраняется жизнеспособной небольшая популяция клеток с устойчивыми характеристиками МСК (Савченкова, Коржикова, 2010). Мы провели подобную про-

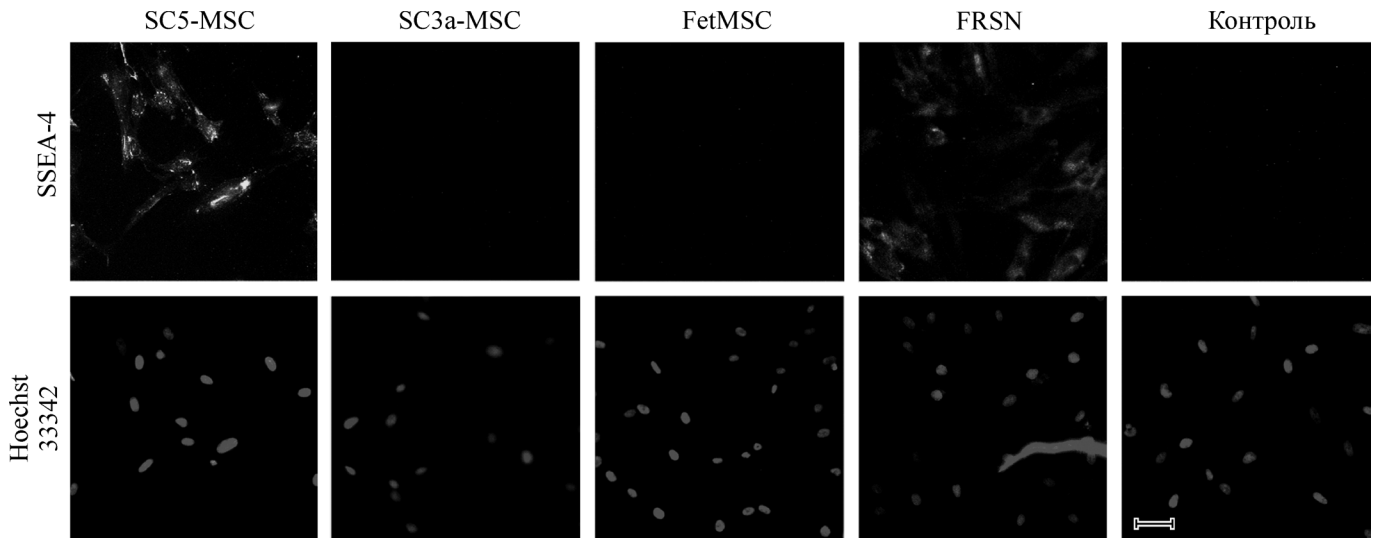


Рис. 4. Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии маркера SSEA-4 недифференцированных ЭСК в линиях SC5-MSC, SC3a-MSC, FetMSC и FRSN.

Флуоресцентное мечение моноклональными антителами против поверхностного клеточного антигена SSEA-4 и докрасивание Hoechst 33342; контроль — клетки, меченные вторыми антителами. Масштабная линейка — 10 мкм.

цедуру с клеточными популяциями МСК, выделенными из ЭСК. После размораживания оставшиеся немногочисленные клетки культивировали до получения монослоя фибробластоподобных клеток, которые в дальнейшем многократно пересевали и анализировали. При такой методике получают практически клональные популяции МСК. Данные по экспрессии поверхностных маркеров, наблюдаемые после такой процедуры, полностью совпали с представленными выше. Существенно отметить, что

экспрессия маркера CD117 (c-kit) также возрастала в процессе культивирования: 16.2 (пассаж 5), 37.7 (пассаж 8), 53.9 (пассаж 12) и 64.9 % (пассаж 14) в линии SC5-MSC и 26.9 (пассаж 5), 60.5 % (пассаж 8) в линии SC3a-MSC. Эти результаты, по-видимому, свидетельствуют о том, что экспрессия CD117 (c-kit) является характерной чертой полученных клеточных линий.

Нам неизвестны другие исследования по анализу экспрессии этого антигена в МСК, полученных из ЭСК.

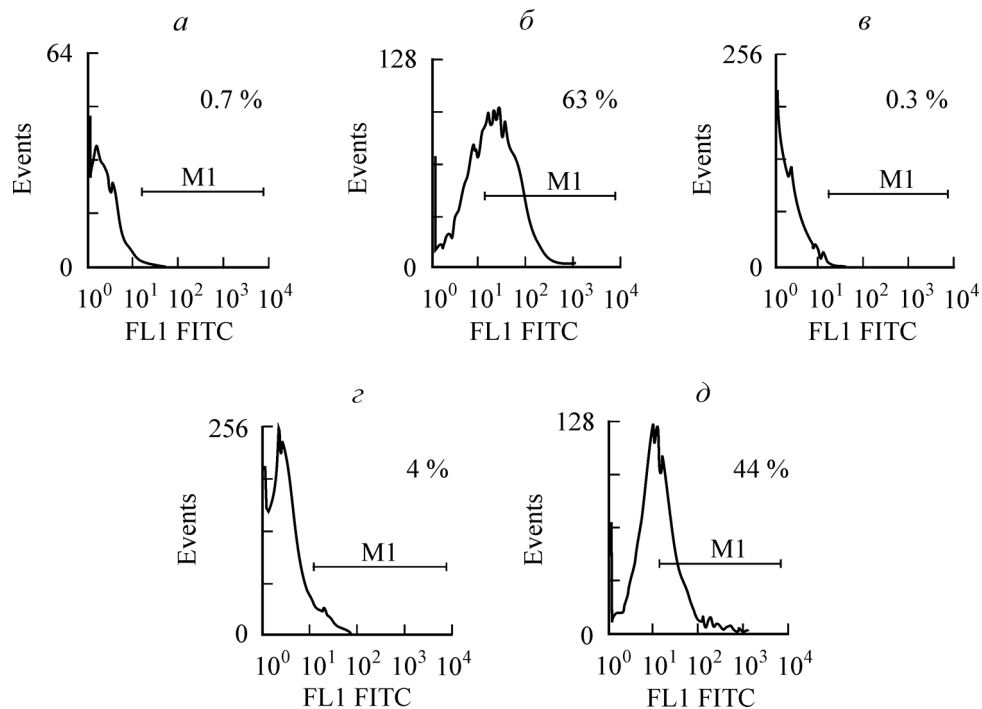


Рис. 5. Цитофлуориметрический анализ экспрессии поверхностного клеточного антигена SSEA-4 в линиях SC5-MSC (б), SC3a-MSC (в), FetMSC (г) и FRSN (д).

По горизонтали — интенсивность флуоресценции; по вертикали — число клеток, M1 — зона подсчета окрашенных клеток; а — изотипический контроль; на каждой гистограмме указана доля клеток (%), меченных антителами против SSEA-4.

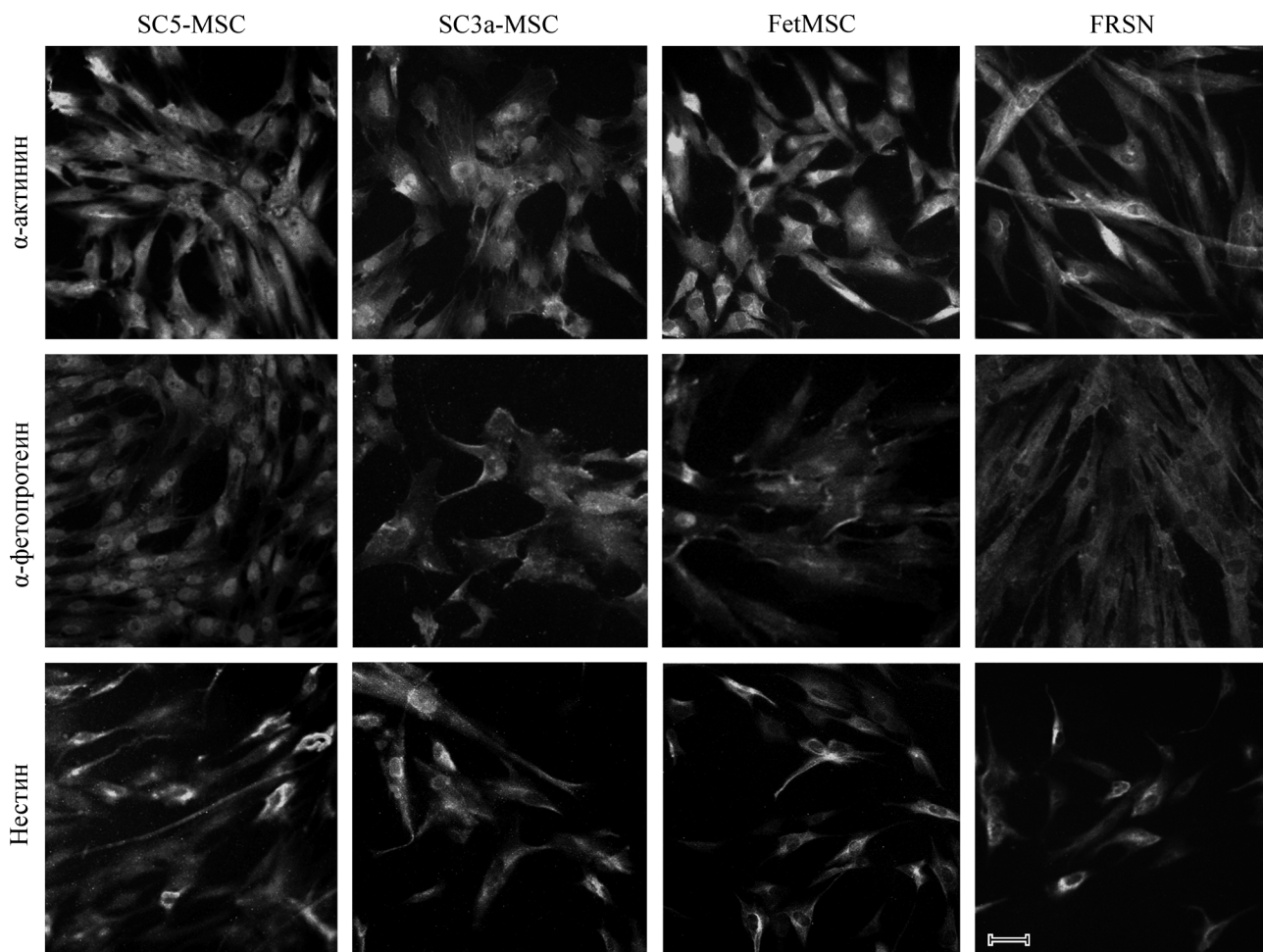


Рис. 6. Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии маркеров ранней дифференцировки ЭСК (α -актинина — маркера мезодермы, α -фетопротеина — маркера энтодермы и нестина — маркера эктодермы) в клетках линий SC5-MSC, SC3a-MSC, FetMSC и FRSN.

Масштабная линейка — 10 мкм.

Можно было бы предположить, что наличие в этих клетках экспрессии CD117 (c-kit), являющегося рецептором к фактору стволовых клеток и ранним маркером гематопоэтических стволовых клеток, связано с источником получения МСК, т. е. с ЭСК. Известно, что в ЭСК наблюдается экспрессия CD117 (c-kit) (Carpenter et al., 2004; Rosler et al., 2004; Кожухарова и др., 2009). Наши неопубликованные данные также подтверждают этот факт. Но наличие экспрессии этого маркера в двух других линиях FetMSC и FRSN свидетельствует, по-видимому, о том, что данное явление не связано с источником получения МСК. Однако в последних двух линиях в отличие от МСК, полученных из ЭСК, не наблюдается временной зависимости экспрессии CD117 (c-kit). Тем не менее есть ряд данных, указывающих на отсутствие экспрессии этого маркера у взрослых МСК, полученных из разных источников (Tsai et al., 2004; Савченкова, Коржикова, 2010; Yen et al.). Возможно, причина нестабильности этого поверхностного маркера связана с физиологическим состоянием клеток или с условиями культивирования (Mohseny, Hogendoorn, 2011). Можно предположить, что истинный статус МСК отражают именно устойчивые маркеры с высоким уровнем экспрессии. Уровень же экспрессии остальных маркеров, возможно, более зависим от физиологического состояния клеточной популяции.

Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии поверхностных маркеров и транскрипционного фактора Oct-4, характерных для ЭСК человека, показал, что во всех 4 линиях отсутствует экспрессия TRA-1-60 и Oct-4. Данные не показаны, но они соответствуют контролю, представляющему собой клетки, меченные вторыми антителами (рис. 4, д). Иной результат получен при анализе экспрессии поверхностного маркера SSEA-4. В линиях SC5-MSC и FRSN экспрессия этого маркера есть, а в линиях SC3a-MSC и FetMSC она отсутствует (рис. 4, а—с). Эти наблюдения подтверждаются анализом экспрессии SSEA-4 с помощью проточной цитофлуориметрии во всех линиях (рис. 5), причем длительность культивирования SC5-MSC (12 и 30 пассажей) не влияет на наличие экспрессии этого антигена.

Данные литературы противоречивы. Так, есть данные об отсутствии экспрессии маркеров TRA-1-81 и SSEA-4 в МСК, полученных из ЭСК человека (Lee et al., 2010; Gruenloh et al., 2011). Тем не менее в ряде других исследований маркер SSEA-4 обнаружен в МСК, полученных из крайней плоти, костного мозга ЭСК человека. Причем несмотря на присутствие маркера недифференцированных ЭСК, МСК не образуют тератом в иммунодефицитных мышцах (Gang et al., 2007; Olivier, Bouhassira, 2010; Mamidi et al., 2011; Yen et al., 2011). Гликолипид SSEA-4 локализован на поверхности плюрипотентных клеток человека и

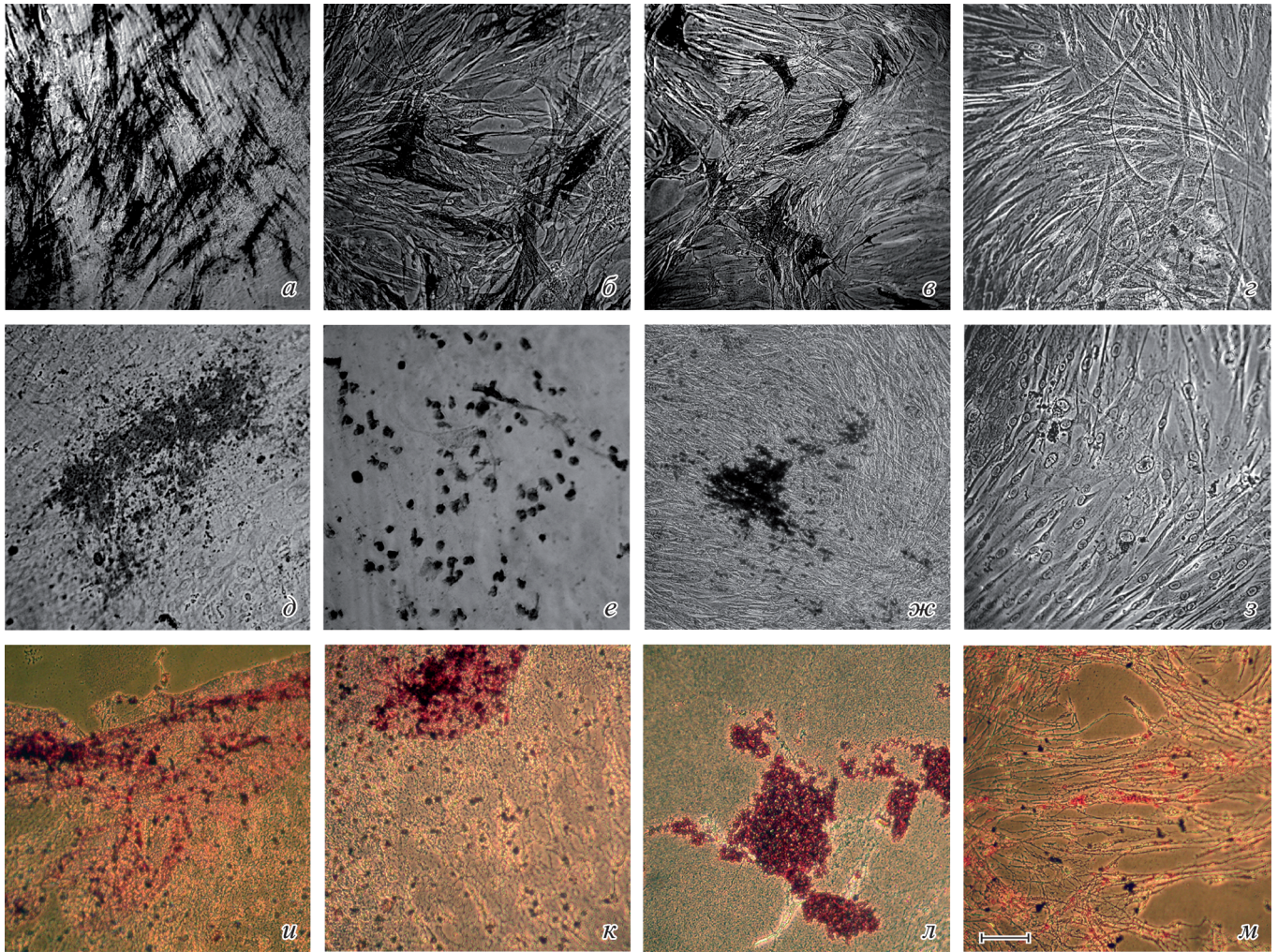


Рис. 7. Дифференцировка клеток в направлении остео- и адипогенеза.

a—d — выявление активности щелочной фосфатазы при культивировании в остеогенной среде клеток линий SC5-MSC, SC3a-MSC, FetMSC и FRSN соответственно; *e—h* — формирование минеральных комплексов по реакции von Kossa в межклеточном пространстве линий SC5-MSC, SC3a-MSC, FetMSC и FRSN соответственно; *i—m* — окрашивание клеток Oil Red O при культивировании в адипогенной среде клеток линий SC5-MSC, SC3a-MSC, FetMSC и FRSN соответственно. Масштабная линейка — 200 мкм.

эмбриональных тератокарцином, но его клеточная функция неизвестна. Присутствие SSEA-4 на поверхности мультипотентных МСК ассоциируется со «стволовостью» разных клеточных популяций и предполагает, по-видимому, перекрытие специализированных метаболических путей между плюрипотентными ЭСК человека и мультипотентными МСК (Gang et al., 2007). Тем не менее противоречивость данных о наличии экспрессии маркера SSEA-4 независимо от источника получения МСК может свидетельствовать о разном физиологическом состоянии клеток или о разных условиях культивирования, к которым, как известно, чувствительны поверхностные маркеры (Mohseny, Hogendoorn, 2011). Статус МСК зависит от комбинации разных факторов, и неизвестно, какое влияние на функциональные свойства МСК оказывает различная экспрессия отдельных маркеров (Nemati, 2011).

Иммунофлуоресцентный анализ показал, что клетки всех полученных линий экспрессируют маркеры ранней дифференцировки в производные трех зародышевых листков (рис. 6). Нам неизвестны другие исследования по анализу экспрессии этих маркеров в МСК, полученных из

ЭСК. Но есть данные о дифференцировке МСК, полученных из других источников, в производные не только мезодермы, но и в производные эктодермы и энтодермы (Antonucci et al., 2010; Huang et al., 2010; Mamidi et al., 2011). Изучение взрослых МСК, полученных из костного мозга человека, показало биохимическую гетерогенность популяций, экспрессирующих разные биологически активные вещества, которые способны изменять микроокружение поврежденной ткани и таким образом улучшать тканевую репарацию (Caplan, Dennis, 2006; Phinney, 2007; Tan et al., 2011). Согласно другим исследованиям, в МСК, полученных из крайней плоти человека, имеет место одновременное присутствие в клетках ранних маркеров как мезодермальной, так и эктодермальной дифференцировки (Mamidi et al., 2011).

Наши данные косвенно подтверждают возможность одновременного существования ранних маркеров дифференцировки в клетках полученных линий, так как иммунофлуоресцентный анализ показал совпадение числа клеток, меченых антителами против антигенов, характеризующих производные трех зародышевых листков, с числом ядер, окрашенных Hoechst 33342. Возможно, что при миг-

рации в область разных тканевых повреждений в МСК включаются соответствующие этим условиям системы экспрессии биологически активных веществ, обеспечивающие репарацию. В настоящее время в литературе широко обсуждаются механизмы тканевой репарации с помощью МСК, связанные с продукцией цитокинов и паракринных факторов, улучшающих микроокружение поврежденных тканей. Существует также и другой механизм, обеспечивающий дифференцировку МСК в функциональные клетки, которые заменяют поврежденные.

Но есть ряд данных, свидетельствующих о том, что при трансплантации МСК обнаруживается низкий уровень приживления трансплантированных клеток, но при этом имеет место существенный положительный терапевтический эффект при различных повреждениях легких, почек, костей, хрящей, при диабете, инфаркте и т. д. Поэтому исследователи придают большое значение трофическому механизму действия МСК, используемых для тканевой репарации (Caplan, Dennis, 2006; Phinney, Prockop, 2007).

При индукции дифференцировки *in vitro* все 4 линии показали способность формировать жировую и костную ткань, что соответствует статусу МСК. Культивирование клеток в остеогенной среде способствовало повышению активности щелочной фосфатазы (рис. 7, а—г) и формированию минеральных комплексов, что показано с помощью реакции von Kossa, позволяющей выявить нерастворимые соли кальция в межклеточном пространстве (рис. 6, д—з). Культивирование клеток в адипогенной среде привело к образованию кластеров адипоцитов, что показано с помощью окрашивания красителем Oil Red O (рис. 6, и—м). Полученные результаты совпадают с данными других исследований по дифференцировочным потенциам МСК, полученными из разных источников (Rubio et al., 2005; Olivier et al., 2006; Lorenz et al., 2008; Савченкова, Коржикова, 2010; Huang et al., 2010; Lai et al., 2011).

Таким образом, получены 4 неиммортиализованные клеточные линии, которые могут выполнять функцию фидера для ЭСК человека. Они обладают набором свойств, характерных для МСК, и рядом межлинейных различий, влияние которых на функциональный статус МСК пока остается неизученным.

Авторы выражают благодарность проф. Н. Н. Мамаеву и Т. Л. Гиндиной (С.-Петербургский медицинский университет им. И. П. Павлова) за возможность использования Ikaros4 Karyotyping System for transmitted light (MetaSystems, Германия).

Работа выполнена при финансовой поддержке Научной программы С.-Петербургского научного центра РАН и Государственного контракта Минобрнауки РФ № 16.M04.11.0002.

Список литературы

Гордеева О. Ф., Муталинов Ш. М. 2008. Плюрипотентные стволовые клетки: поддержание генетической и эпигенетической стабильности и перспективы клеточных технологий. Онтогенез. 39 (6) : 405—419.

Кожухарова И. В., Фридлянская И. И., Ковалева З. В., Пуговкина Н. А., Алексеенко Л. Л., Зенин В. В., Иванцов К. М., Леонтьева О. К., Гринчук Т. М., Никольский Н. Н. 2009. Новые линии эмбриональных стволовых клеток человека С612 и С910. Цитология. 51 (7) : 551—558.

Кольцова А. М., Гордеева О. Ф., Крылова Т. А., Лифанцева Н. В., Мусорина А. С., Яковлева Т. К., Полянская Г. Г. 2011. Сравнительные характеристики новых линий эмбриональных стволовых клеток человека SC5, SC6, SC7 и SC3a. Онтогенез. 42 (4) : 249—263.

Крылова Т. А., Кольцова А. М., Зенин В. В., Гордеева О. Ф., Мусорина А. С., Горячая Т. С., Шлыкова С. А., Каменецкая Ю. К., Пинаев Г. П., Полянская Г. Г. 2009. Характеристики и специфические особенности новых линий эмбриональных стволовых клеток человека. Цитология. 51 (7) : 565—576.

Савченкова И. П., Коржикова С. В. 2010. Подкожно-жировая ткань человека, подвергнутая низкотемпературному шоку, как источник жизнеспособной клеточной популяции с характеристиками мультипотентных мезенхимных стромальных клеток. Цитология. 52 (8) : 621—628.

Седова Г. П. 2008. Количественные аспекты злокачественного роста. Математическая морфология. Электронный математический и медико-биологический журнал. 7 (2) 2008. URL : <http://www.smolensk.ru/user/sgma/mmorph/n-18-html/cont.htm>

Сухих Г. Т., Малайцев В. В., Богданова И. М. 2008. Перспективы использования фетальных стволовых/прогениторных клеток человека в клеточной терапии. Клеточные технологии в биологии и медицине. 1 : 5—13.

Хейфлик Л. 1997. Смертность и бессмертие на клеточном уровне. Биохимия. 62 (11) : 1380—1393.

Aguilar-Gallardo C., Poo M., Gomez E., Galan A., Sanchez E., Marques-Mari A., Ruiz V., Medrano J., Riboldi M., Valbuena D., Simon C. 2010. Derivation, characterization, differentiation, and registration of seven human embryonic stem cell lines (VAL-3, -4, -5, -6M, -7, -8, and -9) on human feeder. In Vitro Cell Develop. Biol. Anim. 46 : 317—326.

Antonucci I., Stuppia L., Kaneko Y., Yu S., Tajiri N., Bae E. C., Chheda S. H., Weinbren N. L., Borlongan C. V. 2010. Amniotic fluid as rich source of mesenchymal stromal cells for transplantation therapy. Cell Transplant. 20 : 789—795.

Barberi T., Willis L. M., Socci N. D., Studer L. 2005. Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells. PLoS Med. 2 : e161.

Caplan A. I., Dennis J. E. 2006. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. J. Cell. Biochem. 98 : 1076—1084.

Carpenter M. K., Rosler E. S., Fisk G. J., 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 Dyn. 229 : 243—258.

Chavez S. L., Meneses J. J., Nguyen N. M., Kim S. K., Pera R. A. 2008. Characterization of six new human embryonic stem cell lines (HSF7, -8, -9, -10, -12, and -13) derived under minimal-animal component conditions. Stem Cells Develop. 17 : 535—546.

Chen H. F., Chuang C. Y., Shieh Y. K., Chang H. W., Ho H. N., Kuo H. C. 2009. Novel autogenic feeders derived from human embryonic stem cells (hESCs) support an undifferentiated status of hESCs in xeno-free culture conditions. Hum. Reprod. 24 : 1114—1125.

Cheng L., Hammond H., Ye Z., Zhan X., David G. 2003. Human adult marrow cells support prolonged expansion of human embryonic stem cells in culture. Stem Cells. 21 : 131—142.

Choo A., Lim S. K. 2011. Derivation of mesenchymal stem cells from human embryonic stem cells. Methods Mol. Biol. 690 : 175—182.

Choo A., Ngo A. S., Ding V., Oh S., Kiang L. S. 2008. Autogenic feeders for the culture of undifferentiated human embryonic stem cells in feeder and feeder-free conditions. 86 : 15—28.

Cowan C. A., Klimanskaya I., McMahon J., Atienza J., Witmyer J., Zucker J. P., Wang S., Morton C. C., McMahon A. P., Powers D., Melton D. A. 2004. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. New Engl. J. Med. 350 : 1353—1356.

De Peppo G. M., Svensson S., Lennerås M., Synnergren J., Stenberg J., Strehl R., Hyllner J., Thomsen P., Karlsson C. 2010. Human embryonic mesodermal progenitors highly resemble human mesenchymal stem cells and display high potential for tissue engineering applications. Tissue Eng. Part A. 16 : 2161—2182.

- Donovan P. J., Gearhart J. 2001. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature*. 414 : 92—97.
- Drukker M., Benvenisty N. 2004. The immunogenicity of human embryonic stem-derived cells. *Trends in Biotechnol.* 22 : 135—141.
- Drukker M., Katz G., Urbach A., Schuldiner M., Markel G., Itskovitz-Elder 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.
- Ellerstrom C., Strehl R., Moya K., Andersson K., Bergh C., Lundin K., Hyllner J., Semb H. 2006. Derivation of a xeno-free human ES cell line. *Stem Cells*. 24 : 2170—2176.
- Englund M. C., Caisander G., Noaksson K., Emanuelsson K., Lundin K., Bergh C., Hansson C., Semb H., Strehl R., Hyllner J. 2010. The establishment of 20 different human embryonic stem cell lines and subclones; a report on derivation, culture, characterization and banking. *In Vitro Cell Develop. Biol. Anim.* 46 : 217—230.
- Fu X., Toh W. S., Liu H., Lu K., Li M., Hande M. P., Cao T. 2010. Autologous feeder cells from embryoid body outgrowth support the long-term growth of human embryonic stem cells more effectively than those from direct differentiation. *Tissue. Eng. Part C. Methods*. 16 : 719—733.
- Gang E. J., Bosnakovski D., Figueiredo C. A., Visser J. W., Perlingeiro R. C. 2007. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. 109 : 1743—1751.
- Gruenloh W., Kambal A., Sondergaard C., McGee J., Nacey C., Kalomoiris S., Pepper K., Olson S., Fierro F., Nolte J. A. 2011. Characterization and in vivo testing of mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cells. *Tissue Eng. Part A*. 17 : 1517—1525.
- Hematti P. 2011. Human embryonic stem cell-derived mesenchymal progenitors: an overview. *Methods Mol. Biol.* 690 : 163—174.
- Hovatta O., Mikkola M., Gertow K., Stromberg A., Inzunza J., Hreinsson J., Rozell B., Blennow E., Andang M., Ahrlund-Richter L. 2003. A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells. *Hum. Reprod.* 18 : 1404—1409.
- Huang H. I., Chen S. K., Ling Q. D., Chien C. C., Liu H. T., Chan S. H. 2010. Multilineage differentiation potential of fibroblast-like stromal cells derived from human skin. 16 : 1491—1501.
- Inzunza J., Gertow K., Stromberg M. A., Matilainen E., Blennow E., Skottman H., Wolbank S., Ahrlund-Richter A., Hovatta O. 2005. Derivation of human embryonic stem cell lines in serum replacement medium using postnatal human fibroblasts as feeder cells. *Stem Cells*. 23 : 544—549.
- Kubikova I., Konecna H., Sedo O., Zdrahal Z., Rehulka P., Hribkova H., Rehulkova H., Hampl A., Chmelik J., Dvorak P. 2009. Proteomic profiling of human embryonic stem cell-derived microvesicles reveals a risk of transfer of proteins of bovine and mouse origin. *Cytotherapy*. 11 : 330—340.
- Lai R. C., Choo A., Lim S. K. 2011. Derivation and characterization of human ESC-derived mesenchymal stem cells. *Methods Mol. Biol.* 698 : 141—150.
- Lee E. J., Lee H. N., Kang H. J., Kim K. H., Hur J., Cho H. J., Lee J., Chung H. M., Cho J., Cho M. Y., Oh S. K., Moon S. Y., Park Y. B., Kim H. S. 2010. Novel embryoid body-based method to derive mesenchymal stem cells from human embryonic stem cells. *Tissue Eng. Part A*. 16 : 705—715.
- Lian Q., Lye E., Suan Yeo K., Khia Way Tan E., Salto-Tellez M., Liu T. M., Palanisamy N., El Oakley R. M., Lee E. H., Lim B., Lim S. K. 2007. Derivation of clinically compliant MSCs from CD105+, CD24- differentiated human ESCs. *Stem Cells*. 25 : 425—436.
- Lorenz K., Sicker M., Schmelzer E., Rupf T., Salvetter J., Schulz-Siegmund M., Bader A. 2008. Multilineage differentiation potential of human dermal skin-derived fibroblasts. *Exp. Dermatol.* 17 : 925—932.
- Mamidi M. K., Pal R., Mori N. A., Arumugam G., Thirichelvam S. T., Noor P. J., Abdullah H. M., Gupta P. K., Das A. K., Zakaria Z., Bhonde R. 2011. Co-culture of mesenchymal-like stromal cells derived from human foreskin permits long term propagation and differentiation of human embryonic stem cells. *J. Cell. Biochem.* 112 : 1353—1363.
- Martin M. J., Muotri A., Gage F., Varki A. 2005. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat. Med.* 11 : 228—232.
- Meisner L. F., Johnson J. A. 2008. Protocols for cytogenetics studies of human embryonic stem cells. *Methods*. 45 : 133—141.
- Mimeault M., Batra S. K. 2006. Concise review: Recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. *Stem Cells*. 24 : 2319—2345.
- Mohseny A. B., Hogendoorn P. C. 2011. Concise review: mesenchymal tumors: when stem cells go mad. *Stem Cells*. 29 : 397—403.
- Odorico J. S., Kaufman D. S., Thomson J. A. 2001. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells*. 19 : 193—204.
- Oh S. K., Kim H. S., Ahn H. J., Seol H. W., Kim Y. Y., Park Y. B., Yoon C. J., Kim D.-W., Kim S. H., Moon S. Y. 2005. Derivation and characterization of new human embryonic stem cell lines: SNUhES1, SNUhES2, and SNUhES3. *Stem Cells* 23 : 211—219.
- Olivier E. N., Bouhassira E. E. 2011. Differentiation of human embryonic stem cells into mesenchymal stem cells by the «raclure» method. *Methods Mol. Biol.* 690 : 183—193.
- Olivier E. N., Rybicki A. C., Bouhassira E. E. 2006. Differentiation of human embryonic stem cells into bipotent mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 24 : 1914—1922.
- Ozkinay C., Mitelman F. 1979. A simple trypsin-Giemsa technique producing simultaneous G- and C-banding in human chromosomes. *Hereditas*. 90 : 1—4.
- Phinney D. G. 2007. Biochemical heterogeneity of mesenchymal stem cell populations: clues to their therapeutic efficacy. *Cell Cycle*. 6 : 2884—2889.
- Phinney D. G., Prockop D. J. 2007. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views. *Stem Cells*. 25 : 2896—2902.
- Priddle H., Allegrucci C., Burridge P., Munoz M., Smith N. M., Devlin L., Sjoblom C., Chaberbain S., Watson S., Young L. E., Denning C. 2010. Derivation and characterisation of the human embryonic stem cell lines, NOTT1 and NOTT2. *In Vitro Cell Develop. Biol. Anim.* 46 : 367—375.
- Reyes M., Lund T., Lenvik T., Aguiar D., Koodie L., Verfaillie C. M. 2001. Purification and *ex vivo* expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*. 98 : 2615—2625.
- Rosler E., Fisk G. J., Ares X., Irving J., Miura T., Rao M. S., Carpenter M. K. 2004. Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Develop. Dyn.* 229 : 259—274.
- Rubio D., Garcia-Casto J., Martin M. C., de la Fuente R., Cigudosa J. C., Lloyd A. C., Bernad A. 2005. Spontaneous human adult stem cell transformation. 65 : 3035—3039.
- Shaffer L. G., Slovak M. L., Campbell L. J. (eds). 2009. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN). Basel: S. Karger.
- Skottman H. 2010. Derivation and characterization of three new human embryonic stem cell lines in Finland. *In Vitro Cell Develop. Biol. Anim.* 46 : 206—209.
- Skottman H., Dilber M. S., Hovatta O. 2006. The derivation of clinical-grade human embryonic stem cell lines. *FEBS Lett.* 580 : 2875—2878.
- Stojkovic P., Lako M., Stewart R., Przyborski S., Armstrong L., Evans J., Murdoch A., Strachan T., Stojkovic M. 2005. An autogenic feeder cell system that efficiently supports growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 23 : 306—314.
- Ström S., Holm F., Bergström R., Strömberg A. M., Hovatta O. 2010. Derivation of 30 human embryonic stem cell lines—improving the quality. *In Vitro Cell Develop. Biol. Anim.* 46 : 337—344.
- Tan Z., Su Z. Y., Wu R. R., Gu B., Liu Y. K., Zhao X. L., Zhang M. 2011. Immunomodulative effects of mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cells *in vivo* and *in vitro*. *J. Zhejiang Univ. Sci. B. Jan.* 12 : 18—27.

Toma J. G., McKenzie I. A., Bagli D., Miller F. D. 2005. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells*. 23 (6) : 727—737.

Trivedi P., Hematti P. 2008. Derivation and immunological characterization of mesenchymal stromal cells from human embryonic stem cells. *Exp. Hematol.* 36 : 350—359.

Tsai M. S., Lee J. L., Chang Y. J., Hwang S. M. 2004. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum. Reprod.* 19 : 1450—1456.

Unger C., Felldin U., Nordenskjöd A., Dilber M. S., Hovatta O. 2008. Derivation of human skin fibroblast lines for feeder cells of

human embryonic stem cells. *Curr. Protoc. Stem Cell Biol.* Chapter 1: Unit 1C.7.

Yen B. L., Huang H. I., Chien C. C., Jui H. Y., Ko B. S., Yao M., Shun C. T., Yen M. L., Lee M. C., Chen Y. C. 2005. Isolation of multipotent cells from human term placenta. *Stem Cells*. 23 : 3—9.

Yen M. L., Hou C. H., Peng K. Y., Tseng P. C., Jiang S. S., Shun C. T., Chen Y. C., Kuo M. L. 2011. Efficient Derivation & Concise Gene Expression Profiling of Human Embryonic Stem Cell-Derived Mesenchymal Progenitors (EMPs). *Cell Transplant.*

Поступила 8 VIII 2011

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF NEW MESENCHYMAL STEM CELL LINES DERIVED FROM HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS, BONE MARROW AND FORESKIN

T. A. Krylova, A. M. Koltsova, V. V. Zenin, A. S. Musorina,
T. K. Yakovleva, G. G. Poljanskaya¹

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
¹e-mail: poljansk@mail

New nonimmortalized fibroblast-like cell lines SC5-MSC and SC3a-MSC, FetMSC, FRSN were obtained from human embryonic stem cells (ESC), bone marrow of a 5—6-days embryo and foreskin of a 3-years-old boy, respectively. All the lines are successfully used as the feeder at human ESC cultivation. It is determined that the average cell population doublings time varies from 25.5 h for ISC5-MSC to 38.8 h for SC3a-MSC. Active proliferation of all the lines is also shown by the corresponding growth curves. Numerical and structural karyotypic analysis showed that these lines had normal karyotype: 46,XX (SC5-MSC and SC3a-MSC) and 46,XY (FetMSC and FRSN). To determine the status of the lines, their cell surface markers were analyzed by flow cytometry. This analysis revealed the presence of surface antigens CD44, CD73, CD90, CD105 and HLA-ABC, characteristic of human MSC, and the absence of CD34 and HLA-DR. Different lines were found to express CD117(c-kit) to a different level. Immunofluorescence and flow cytometry analysis did not detect TRA-1-60 and Oct-4, characteristic of human embryonic stem cells, and revealed interlinear variations in the level of SSEA, which did not depend on the cell origin. It is not clear yet whether these interlinear variations affect functional MSC status. In all the lines, immunofluorescence analysis showed the presence of the markers of early differentiation in the derivatives of three germ layers which may allow MSC to be useful, in corresponding micro-environments, for reparation of tissue injures. Adipogenic and osteogenic differentiation of all cell lines has been shown.

Key words: human mesenchymal stem cell lines, Immunofluorescence analysis, surface cell markers, karyotype.