

**СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЛИНИЙ
МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ КОСТНОГО МОЗГА
И МЫШЦЫ КОНЕЧНОСТИ РАННЕГО ЭМБРИОНА ЧЕЛОВЕКА**

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

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

¹электронный адрес: poljansk@mail.cytspb.rssi.ru

Проведен сравнительный анализ характеристик линий мезенхимных стволовых клеток (МСК), выделенных из 5—6-недельного эмбриона, из разных тканей: костного мозга (линия FetMSC) и мышцы зачатка конечности (линия M-FetMSC). Основные характеристики линий получены на 6-м пассаже. Среднее время удвоения клеточной популяции составляет 33.0 ± 1.4 и 25.0 ± 0.1 ч для линий FetMSC и M-FetMSC соответственно. Кривые роста свидетельствуют об активной пролиферации клеток обеих линий. Количественный и структурный кариотипический анализ показал, что линия M-FetMSC имеет нормальный кариотип 46, XY, что ранее было показано для линии FetMSC. С целью определения статуса этих линий провели сравнительный анализ поверхностных маркеров с помощью проточной цитофлуориметрии. Анализ выявил в обеих линиях экспрессию поверхностных антигенов, характерных для МСК человека: CD44, CD73, CD90, CD105, HLA-ABC, виментин и отсутствие экспрессии CD34 и HLA-DR. Показана способность клеток обеих линий дифференцироваться в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях. Иммунофлуоресцентный и цитофлуориметрический анализ экспрессии поверхностных маркеров и транскрипционного фактора Oct-4, характерных для ЭСК человека, показал отсутствие в обеих линиях экспрессии TRA-1-60, низкий уровень экспрессии Oct-4, но высокий уровень экспрессии SSEA-4. Иммунофлуоресцентный анализ выявил экспрессию маркеров ранней дифференцировки в производные трех зародышевых листков, характеризующих ЭСК, что, по-видимому, обеспечивает широкие возможности МСК при репарации разных тканевых повреждений в зависимости от соответствующего микроокружения. Несмотря на подтверждение статуса МСК для обеих линий, обнаружен ряд различий между ними, связанных с ростовыми характеристиками и с дифференцировочным потенциалом. Дифференцировочный потенциал в адипогенном направлении у линии M-FetMSC снижен по сравнению с FetMSC. В процессе индуцированной скелетно-мышечной дифференцировки выявляются Z-диски в саркомерах клеток только линии M-FetMSC. Эти результаты позволяют предполагать возможное влияние разного микроокружения, в котором находились клетки в организме до перевода их в культуру.

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

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), выделенные из ранних эмбрионов млекопитающих, являются уникальными плuriпотентными 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. Но для использования ЭСК в прикладных биомедицинских исследованиях существует ряд препятствий (Donovan, Geahart, 2001; Odorico et al., 2001; Drukker et al., 2002; Drukker, Venneristy, 2004; Allegrucci, Young, 2007; Гордеева, Миталипов, 2008; Lee et al., 2010).

Один из путей использования ЭСК человека в регенеративной медицине — получение из них мультипотент-

ных мезенхимных стволовых клеток (МСК). При этом нивелируются основные трудности, мешающие использованию ЭСК в этой области. Известно, что взрослые МСК, полученные из разных тканей, после определенного тестирования могут относительно безопасно использоваться в клеточной терапии (Kita et al., 2010; Zhang et al., 2012; Leyva-Leyva et al., 2013). Но при использовании многих типов МСК возникают проблемы, связанные с невозможностью получения большого количества клеток в связи с невысоким пролиферативным потенциалом и с применением инвазивных методов получения этих клеток от доноров.

В связи с этим МСК, полученные из ЭСК человека, по-видимому, могут явиться удобной 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 неограни-

ченным источником получения генетически однородных клеточных популяций без использования инвазивных процедур. В настоящее время известно, что МСК, выделенные из ЭСК, 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, Hematti, 2008; De Peppo et al., 2010; Lee et al., 2010; Choo, Lim, 2011; Gruenloh et al., 2011; Hematti, 2011; Tan et al., 2011; Varga et al., 2011; Lin et al., 2012; Li et al., 2013).

Показано, что важнейшим механизмом действия МСК на поврежденные ткани являются способность их к миграции в эти участки и оказание трофического действия за счет секреции биоактивных факторов, изменяющих микроокружение поврежденных клеток, и тем самым улучшения тканевой репарации (Phinney, Prockop, 2007; Carvalho et al., 2011; Gruenloh et al., 2011; Guiducci et al., 2011; Huang et al., 2013; Luo et al., 2013; Ando et al., 2014). В настоящее время в литературе широко обсуждаются механизмы тканевой репарации с помощью МСК, связанные с продукцией цитокинов и паракринных факторов. Существует и другой механизм, обеспечивающий дифференцировку МСК в функциональные клетки, которые заменяют поврежденные. Но есть ряд данных, свидетельствующих о низком уровне приживления трансплантированных МСК, несмотря на существенный положительный терапевтический эффект при различных повреждениях легких, почек, костей, хрящей, при диабете, инфаркте и других заболеваниях. Поэтому исследователи придают большое значение трофическому механизму действия МСК, используемых для тканевой репарации (Caplan, Dennis, 2006; Phinney, Prockop, 2007).

Помимо получения линий МСК из разных линий ЭСК представляет существенный интерес получение МСК из ранних эмбрионов 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, Batra, 2006; Roubelakis et al., 2007).

Ранее мы получили и подробно охарактеризовали линию МСК (FetMSC), полученную из костного мозга 5–6-недельного эмбриона. Одновременно были выделены клетки из другой ткани — эмбриональных фибробластов зачатка конечности. Интересно было получить линию МСК и из этой ткани и провести сравнительный анализ характеристик этих линий, включая их дифференцировочный потенциал. Существует много сравниваемых исследований характеристик МСК, полученных из разных источников и соответственно от разных доноров (Roubelakis et al., 2007; Riekstina et al., 2009; Barbet et al., 2011; Lai et al., 2011; Varga et al., 2011; Крылова и др., 2012; De Peppo et al., 2013). В частности, показано, что нейральная дифференцировка активнее идет из МСК, выделенных из амниотической жидкости, чем из МСК взрослого костного мозга. Авторы полагают, что те характеристики, которые проявляют МСК из амниотической жидкости, будут способствовать более успешному и безопасному лечению заболеваний нервной системы (Yan et al., 2013). В другом исследовании показано, что МСК, выделенные из кожи черепа, по основным марке-

рам, характеризующим статус МСК, совпадали, но более эффективно дифференцировались в нейрогенном направлении, что позволило авторам предположить наличие различных сигналов микроокружения у клеток кожи черепа и костного мозга (Shih et al., 2005). Еще в одной работе показаны различия по ростовым характеристикам между МСК, выделенными из здоровой и воспаленной кожи (Ge et al., 2012). Подобные данные привлекают внимание к проблеме влияния микроокружения на характеристики МСК. Нам неизвестны работы по сравнительному анализу основных свойств МСК, выделенных из разных тканей одного и того же генетического индивидуума.

Задачей настоящей работы было получение неиммортализированной линии МСК из мышцы зачатка конечности 5–6-недельного эмбриона и сравнение ее с линией FetMSC, полученной из костного мозга того же эмбриона, по морфологии, пролиферативной активности, кариотипу, поверхностным маркерам и способности к спонтанной и направленной дифференцировке.

Основной вывод работы состоит в том, что генетически однородные популяции фибробластов независимо от их тканевого происхождения (из костного мозга или фибробластов зачатка конечности) образуют линии, имеющие основные характеристики, соответствующие МСК. Однако эти линии имеют ряд различий, в основном по ростовым и дифференцировочным характеристикам.

Материал и методика

Для получения МСК из мышцы зачатка конечности abortивного материала 5–6-недельного эмбриона проведены следующие манипуляции. Кусочки мышечной ткани из зачатков конечностей механически измельчали с помощью ножниц до мельчайших фрагментов. Дезагрегацию проводили 0,2%-ным раствором коллагеназы 1-го типа (Sigma, США) в течение 40 мин при 37 °C и постоянном помешивании. В полученную суспензию добавляли ростовую среду и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин. Осадок ресуспендировали в среде DMEM/F12 (Биолот, Россия), содержащей 15 % эмбриональной сыворотки (Биолот, Россия) и 10 ед./мл смеси пенициллина и стрептомицина. Культивирование проводили в среде, содержащей 10 % сыворотки, без антибиотиков, в условиях 5 % CO₂ при 37 °C и 90 % влажности. Полученные клетки (линия M-FetMSC) высевали на чашки Петри в концентрации $2 \cdot 10^5$ кл./мл. Методика получения МСК из костного мозга того же донора (линия FetMSC) описана ранее (Крылова и др., 2012). Клетки для обеих линий были одновременно выделены из одного и того же эмбриона. Сравнительный анализ основных характеристик вновь полученной линии M-FetMSC и линии FetMSC проводили на 6-м пассаже. Криоконсервацию клеточных линий проводили в кондиционированной среде, содержащей 10 % криопротектора диметилсульфоксида (DMSO; Биолот, Россия).

Для характеристики пролиферативной активности клеток оценивали индекс пролиферации (ИП) — отношение числа клеток в данный момент к исходному числу посевных клеток — и строили кривые роста клеточных популяций. Для измерения среднего времени удвоения клеточной популяции в каждом варианте анализировали 3 повторности при ежедневном подсчете числа клеток в течение 5 сут (120 ч). Среднее время

одного удвоения клеточной популяции (a_0) определяли по формуле (Седова, 2008)

$$a_0 = t \ln 2 / \ln (M_t / M_0),$$

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

Кариотипический анализ полученной линии проводили на 6-м пассаже культивирования. Для получения препаратов метафазных хромосом за 4 ч до фиксации в культуру вводили колцемид (KaryoMAX, 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 и ледяной уксусной кислоты (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 каждой клеточной линии. Для структурного кариотипического анализа проводили дифференциальное G-окрашивание хромосом в соответствии с ранее описанной методикой (Ozkinay, Mitelman, 1979). Анализировали 100 метафаз. Кариотипы анализировали с помощью микроскопа Axio Imager.M1 (Carl Zeiss, Германия) 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 результатам 4—5 экспериментов для клеток, находящихся на 6-м пассаже. Иммунофенотипирование полученных клеточных линий проводили с помощью панели конъюгатов CD-маркерных моноклональных антител с флуорохромами. В работе использовали моноклональные антитела против CD-34, HLA-ABC и HLA-DR (Caltac, США), CD-44, CD-73 и CD-105 (Beckman Coulter, США), CD-90, десмина и виментина (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 (Gibco, США) и отмывали от него раствором PBS, не содержащим ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} (Биолот, Россия). Полученную суспензию клеток (1 млн/мл) в PBS делили 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 % бычьего сывороточного альбумина (BSA) и 0.05 % азida натрия).

Для анализа с помощью проточной цитофлуориметрии суспензию клеток фиксировали 1%-ным раствором параформальдегида в течение 20 мин при комнатной температуре. После отмычки раствором PBS без ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} клетки инкубировали в течение ночи при 4 °C с первыми антителами против SSEA-4 (Chemicon, США; разведение 1 : 50), заново отмывали и инкубировали со вторыми флуоресцеин-конъюгированными антителами (Millipore, США). При мечении клеток антителами против

транскрипционного фактора Oct-4 перед нанесением первых антител клеточный осадок инкубировали в 0.5%-ном растворе Tritona X-100 (Sigma, США) в течение 10 мин при комнатной температуре. 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 ЭСК, и экспрессии маркеров ранней дифференцировки в производные трех зародышевых листков использовали антитела против SSEA-4, TRA-1-60 (Chemicon, США) и транскрипционного фактора Oct-4 (Santa Cruz, США), а также против α -актинина (тест на мезодерму), α -фетопротеина (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%-ным раствором BSA (Sigma, США) в течение 1 ч, пермеабилизовывали 0.1%-ным раствором Tritona 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. Визуализацию проводили с помощью микроскопа Zeiss LSM 5 Pascal.

Для подтверждения статуса МСК проводили индукцию остеогенной, адипогенной и хондрогенной 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 -MEM (Биолот, Россия), 10 % FBS, 10 мМ β -глицерофосфата натрия (Sigma, США), 10⁻⁸ М дексаметазона (Sigma, США) и 50 мкг/мл аскорбата натрия (ICN, США). Индукцию дифференцировки проводили в течение 2 нед. Среду меняли через каждые 3—4 сут.

В качестве маркера остеогенной дифференцировки и исследовали распределение солей кальция во внеклеточном матриксе культуры клеток. Реакцию von Kossa, позволяющую выявить нерастворимые соли кальция в межклеточном пространстве, проводили следующим образом: клетки фиксировали 2 мин в метаноле при -20 °C, далее окрашивали 2%-ным раствором нитрата серебра (AgNO_3) (Вектон, Россия) в течение 1 ч под лампой мощностью 60 Вт. Окрашенные клетки промывали дистиллированной водой и на 5 мин помещали в 2.5%-ный раствор тиосульфата натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). 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 -MEM, 10 % FBS, 10⁻⁸ М дексаметазона, 50 мкг/мл аскорбата натрия, раствор 1×ITS, включающий в себя инсулин, трансферрин, сelenит натрия (Invitrogen, США), 1× LA-BSA, содержащий 1 мкг/мл линолевой кислоты в 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 Ca^{2+} и Mg^{2+} , фиксировали в метаноле в течение 2 мин при -20 °C. Фиксирован-

ные клетки промывали 50%-ным этианолом и окрашивали красителем красным масляным (Oil Red O) в течение 10 мин. Окрашенные клетки промывали 50%-ным этианолом, затем дистиллированной водой и высушивали на воздухе.

Направленную дифференцировку в хондрогенном направлении проводили в культуре микромасс. Для этого клетки снимали с поверхности флякона смесью трипсина с версеном (Gibco, США), добавляли среду с сывороткой и полученную суспензию центрифугировали при 800 об/мин 5 мин. К осадку добавляли бессывороточную среду и осаждали в конической пробирке. Конечное количество клеток в пробирке составляло 1×10^6 . Затем осторожно отбирали бессывороточную среду и добавляли 0.5 мл хондрогенной индукционной среды. Через 1—2 сут на дне пробирки формировался агрегат-микромасса. В работе использовали индукционную среду, которая включает в себя DMEM с высоким содержанием глюкозы (Gibco, США), 10^{-7} М дексаметазона (Sigma, США), 50 мкг/мл аксокорбата натрия (ICN, США), раствор $1 \times$ ITS, $1 \times$ La-BSA, 10 нг/мл TGF β (Sigma, США), 110 мг/мл пирувата натрия (ISN, США). Культивирование проводили в течение 3 нед со сменой среды каждые 3—4 сут. Затем препараты красили толуидиновым синим (Toluidine Blue O, Биолот, Россия).

Направленную скелетно-мышечную дифференцировку проводили по модифицированному методу (Awaya et al., 2012). Ростовую среду культуры, поддерживающую активную пролиферацию, заменяли индукционной средой, способствующей слиянию миобластов в многоядерные миотубы и формированию миофибрилл. Индукционная среда включала в себя DMEM с высоким содержанием глюкозы (Gibco, США), 5 % лошадиной сыворотки (Биолот, Россия), 1 % NEAA (Sigma, США) и 100 мкМ 2-меркаптоэтанола (Sigma, США). Смену среды проводили каждые 3—4 сут в течение 30 сут.

Для иммунофлуоресцентного анализа дифференцированных в скелетно-мышечном направлении клеток использовали антитела против десмина (Chemicon, США) и против саркомерного α -актинина (Sigma, США), входящие в состав Z-дисков. Препараты миотуб промывали PBS, фиксировали 4%-ным раствором формальдегида 15 мин при комнатной температуре и снова промывали PBS. Далее обрабатывали 1%-ным раствором Тритона X-100 15 мин. Блокировку неспецифического окрашивания проводили 1%-ным раствором BSA (Sigma, США) в

течение 30 мин. Инкубацию с первыми антителами проводили в течение ночи при 4 °C. После промывки следовало окрашивание вторыми антителами, меченными FITC (Millipore, США), в течение 1 ч в темноте при комнатной температуре. Контролем служили препараты, окрашенные только вторыми антителами. Полученные результаты по направленной дифференцировке анализировали с помощью светового (Nikon eclipse TS 100, Япония) и конфокального (Leica TSC SP5, Германия) микроскопов.

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

Результаты и обсуждение

Сравнительный морфологический анализ линий FetMSC и M-FetMSC показал однородность клеточных популяций, представленных мелкими вытянутыми фибробластоподобными клетками (рис. 1). Анализ ростовых характеристик показал, что клетки этих линий на протяжении 6 пассажей активно делятся. Но есть и ряд различий по характеру кривых роста (рис. 2). Рост клеточной популяции новой линии M-FetMSC резко отличается от полученной из этого же эмбриона линии FetMSC. Так, пролиферация клеток M-FetMSC и клеток FetMSC начинается практически одновременно — через 24 ч после посева. Однако у линии FetMSC она продолжается 72 ч, причем наиболее активный рост наблюдается на 3-и сут, а у линии M-FetMSC активный рост начинается сразу и продолжается 96 ч. Среднее время одного удвоения у этих клеточных популяций разное и составляет 33.0 ± 1.4 и 25.0 ± 0.1 ч для клеток FetMSC и M-FetMSC соответственно, причем разница достоверна ($P < 0.01$). Согласно проведенным расчетам, в течение исследования пролиферативной активности и других характеристик линии прошли 12 удвоений клеточных популяций. Следует отметить, что ранее полученные линии МСК из разных источников также различались между собой по ростовым характеристикам (Крылова и др., 2012). Суммируя полученные нами данные в обоих исследованиях, можно предположить, что причиной этих различий могут быть не только генетические различия между донорами, но и микроокружение, в котором находились разные клеточные популяции одного донора.

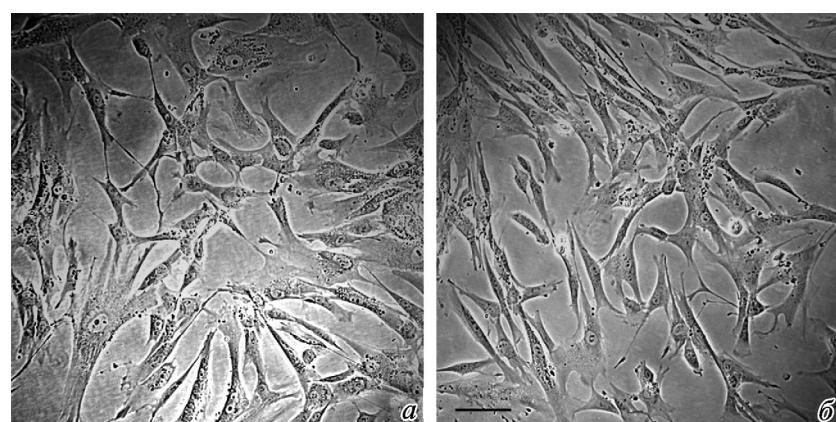


Рис. 1. Морфология клеток линий FetMSC (a) и M-FetMSC (b).

Нативные препараты. Масштабный отрезок — 100 мкм.

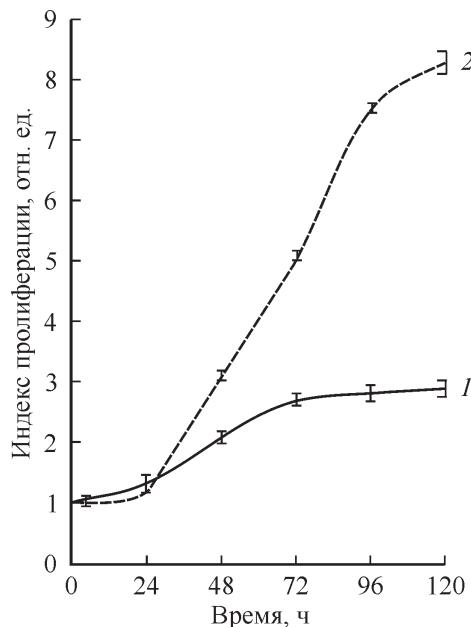


Рис. 2. Кривые роста клеточных линий FetMSC (1) и M-FetMSC (2).

Количественный кариотипический анализ линии M-FetMSC показал, что она характеризуется высокой частотой клеток с модальным числом хромосом, равным $46 (99.1 \pm 0.9\%)$. Доля полиплоидных клеток низкая ($2.2 \pm 0.7\%$).

Структурный кариотипический анализ показал, что линия имеет нормальный кариотип человека — 46, XY (рис. 3). Структурные хромосомные перестройки обнаружены в 4 из 100 метафазных пластинок: аномальный характер дифференциального окрашивания короткого плеча одного из гомологов хромосомы 1, выявленный в двух клетках, и делеции хромосом 5, del(5)(q11.1~11.2) и 12, del(12)(q23) (рис. 3). Разрывы хромосом встречались редко; 2 из 3 обнаруженных хроматидных разрывов локализовались в прицентромерных районах хромосом 10 (10q11) и 22 (22q11.1); третий разрыв выявлен в коротком плече хромосомы 1 (1p22). Кроме перечисленных нарушений в единственной метафазной пластинке наблюдали множественные разрывы хромосомы 4. Клональных перестроек хромосом не обнаружено. Кариотипический анализ линии FetMSC, проведенный ранее, также показал нормальный кариотип человека и отсутствие клональных хромосомных aberrаций (Крылова и др., 2012). Выявленные нами структурные хромосомные изменения, которые носят неклональный характер, не превышают принятого при кариотипировании предельно допустимого уровня хромосомных аномалий (Meissner, Johnson, 2008). Таким образом, по характеру дифференциального G-окрашивания хромосом при уровне разрешения 400 дисков на гаплоидный набор хромосом кариотип клеточной линии M-FetMSC, так же как и кариотип FetMSC, соответствует нормальному кариотипу человека.

Для подтверждения статуса линии M-FetMSC с помощью проточной цитофлуориметрии был проведен сравнительный анализ поверхностных маркеров, характерных для МСК, у клеток этой линии и FetMSC. Анализ показал отсутствие различий между линиями по основным маркерам МСК (см. таблицу). Из

представленных результатов следует наличие экспрессии поверхностных антигенов, характерных для МСК человека, — CD44, CD73, CD90, CD105, HLA-ABC, виментина и десмина. Выявлено отсутствие экспрессии антигенов CD34 и HLA-DR. Таким образом, согласно требованиям Международного общества клеточной терапии, для обеих линий подтвержден статус МСК (Sensebe et al., 2010).

Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии поверхностных маркеров и транскрипционного фактора Oct-4, характерных для ЭСК человека, показал, что у клеток M-FetMSC и FetMSC отсутствует экспрессия TRA-1-60 (рис. 4). Иной результат получен при анализе экспрессии поверхностного маркера SSEA-4. В клетках обеих линий обнаружен сходный и достаточно высокий уровень экспрессии этого маркера (рис. 4; см. таблицу). Следует обратить внимание, что в предыдущем исследовании нами обнаружен незначительный уровень экспрессии этого маркера в клетках FetMSC, который составлял 4 % (Крылова и др., 2012). Нестабильный результат показан по экспрессии Oct-4. В большей части просмотренных полей зрения в обеих линиях отсутствует иммунофлуоресценция антител против Oct-4, а в небольшой части полей зрения наблюдается неравномерное свечение. Кроме того, проточная цитофлуориметрия показала большие колебания количества окрашенных клеток в разных проанализированных субпопуляциях. Экспрессия этого антигена обнаружена в среднем у 10 % клеток обеих линий (данные не представлены). Эти результаты получены на 6-м пассаже. Следует отметить, что иммунофлуоресцентный анализ клеток линии FetMSC 12—14-го пассажей, проведенный

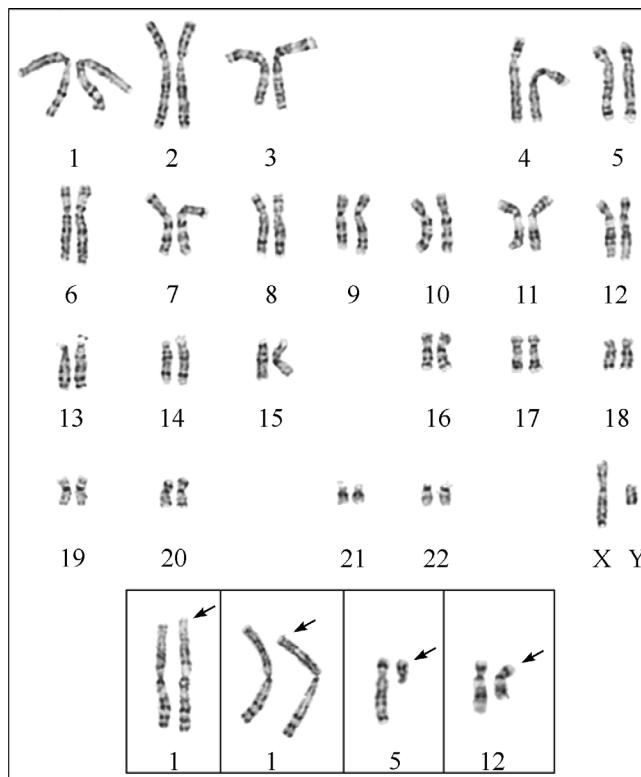


Рис. 3. Кариотип клеточной линии M-FetMSC (46, XY). На врезках — структурные перестройки хромосом 1, 5 и 12, обнаруженные в четырех разных клетках: аномальный характер бандирования короткого плеча одного из гомологов хромосомы 1; делеция хромосомы 5, del(5)(q11.1~11.2); делеция хромосомы 12, del(12)(q23). Все структурно-перестроенные хромосомы указаны стрелками.

ранее, не обнаружил экспрессии Oct-4 (Крылова и др., 2012). Возможно, что различия между линиями по экспрессии маркера SSEA-4 и Oct-4 связаны с анализом разных пассажей. Есть данные о зависимости экспрессии маркеров ЭСК у МСК от длительности культивирования (Grego et al., 2007). Кроме того, величина погрешности при количественной оценке числа клеток в популяции, экспрессирующих SSEA-4, свидетельствует о существенной вариабельности клеточных популяций по этому маркеру (см. таблицу).

Данные литературы противоречивы. Так, есть данные об отсутствии экспрессии маркеров TRA-1-81, TRA-1-60, SSEA-4 и Oct-4 в МСК, полученных из ЭСК человека (Barberi et al., 2005; Olivier et al., 2006; Lee et al., 2010; Gruenloh et al., 2011; Varga et al., 2011). Тем не менее в ряде других исследований маркеры TRA-1-81, SSEA-4 и Oct-4 обнаружены в МСК, полученных как из ЭСК человека, так и из других тканей — из крайней плоти, взрослого костного мозга, периодонтальной околозубной ткани, плаценты, пупочного канатика, амниотической жидкости и др. Эти маркеры могут присутствовать как вместе, так и раздельно в популяциях МСК. Причем несмотря на присутствие маркеров недифференцированных ЭСК, МСК не образуют тератом в иммунодефицитных мышах (Yen et al., 2005; Gang et al., 2007; Mihu et al., 2009; Kita et al., 2010; Trubiani et al., 2010; Mamidi et al., 2011; Olivier, Bouhassira, 2011; Wu et al., 2011; Yen et al., 2011; Yan et al., 2013). Гликолипид SSEA-4 локализован на поверхности плuriпотентных клеток человека и эмбриональных тератокарцином, но его клеточная функция неизвестна. Присутствие SSEA-4 и на поверхности мультипотентных МСК ассоциируется со «стволовостью» разных клеточных популяций и позволяет предполагать, по-видимому, перекрывание специализированных метаболических путей между плuriпотентными ЭСК человека и мультипотентными МСК. Показано, что МСК, по-

Экспрессия (%) поверхностных маркеров в клетках линий FetMSC и M-FetMSC

Маркер	FetMSC	M-FetMSC
CD44	99.7 ± 0.1	99.7 ± 0.1
CD73	95.8 ± 3.1	93.6 ± 4.6
CD90	95.3 ± 3.0	98.0 ± 1.5
CD105	95.4 ± 2.4	96.5 ± 2.6
CD34	0.70 ± 0.50	0.11 ± 0.03
HLA-ABC	38.4 ± 12.0	56.3 ± 14.7
HLA-DR	0.52 ± 0.40	0.56 ± 0.01
Десмин	21.1 ± 5.8	14.9 ± 3.6
Виментин	51.6 ± 6.6	69.5 ± 2.5
SSEA-4	77.6 ± 9.6	67.2 ± 8.5

Причина. Даны средние значения доли клеток (несущих маркер) и их ошибка из 4—5 экспериментов.

лученные из костного мозга и экспрессирующие SSEA-4, имеют более высокую пролиферативную активность, чем МСК, не экспрессирующие этот маркер (Gang et al., 2007). Наличие экспрессии маркеров недифференцированных ЭСК, и в частности SSEA-4 и Oct-4, в МСК разного происхождения, возможно, объясняет их расширенный мультипотентный дифференцировочный потенциал (Wu et al., 2011). Наши линии с высокой экспрессией SSEA-4 и низкой экспрессией Oct-4 на ранних пассажах, возможно, также имеют расширенный мультипотентный потенциал, который необходимо исследовать в дальнейшем.

Существенная роль транскрипционного фактора Oct-4 для МСК состоит в активации сходных генов ЭСК и МСК, в активации экспрессии МСК-специфичных ге-

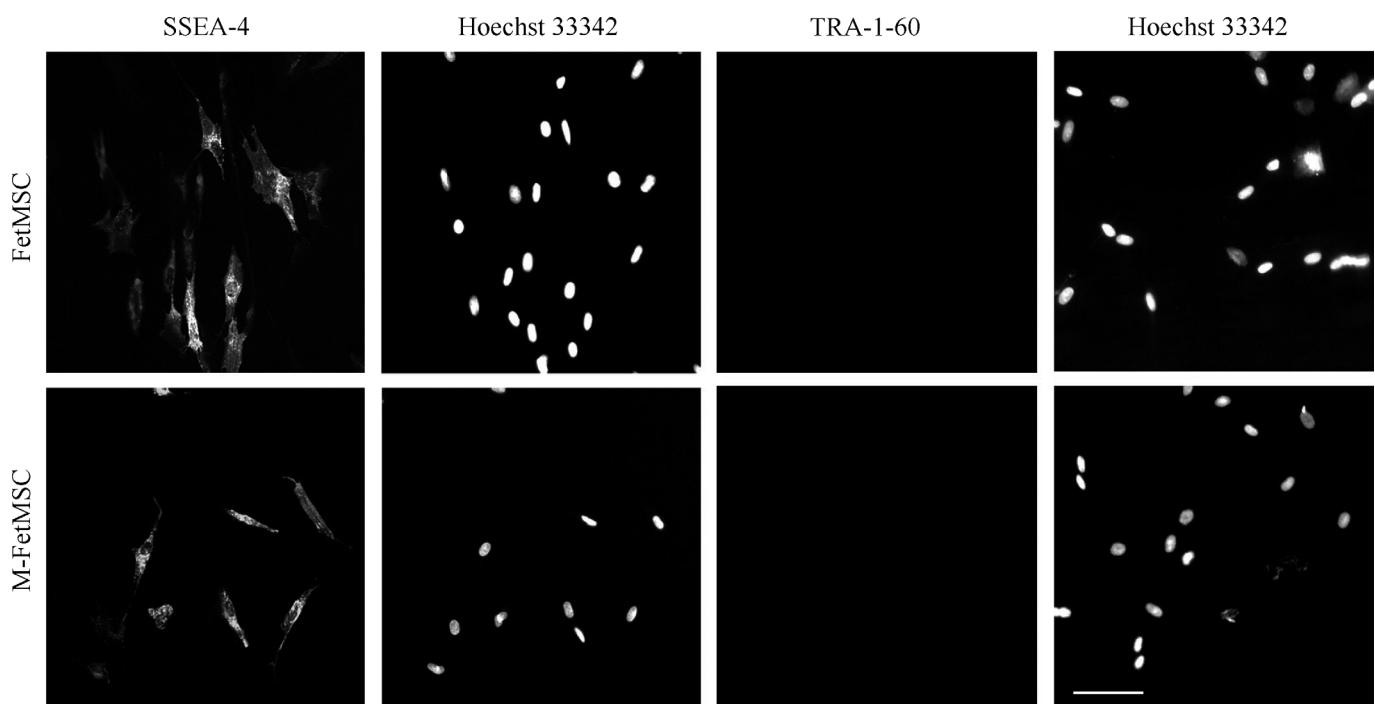


Рис. 4. Экспрессия маркера SSEA-4 и TRA-1-60 недифференцированных ЭСК в клетках линий FetMSC и M-FetMSC. Флуоресцентное мечение моноклональными антителами; докрашивание ядер красителем Hoechst 33342. Масштабный отрезок — 100 мкм.

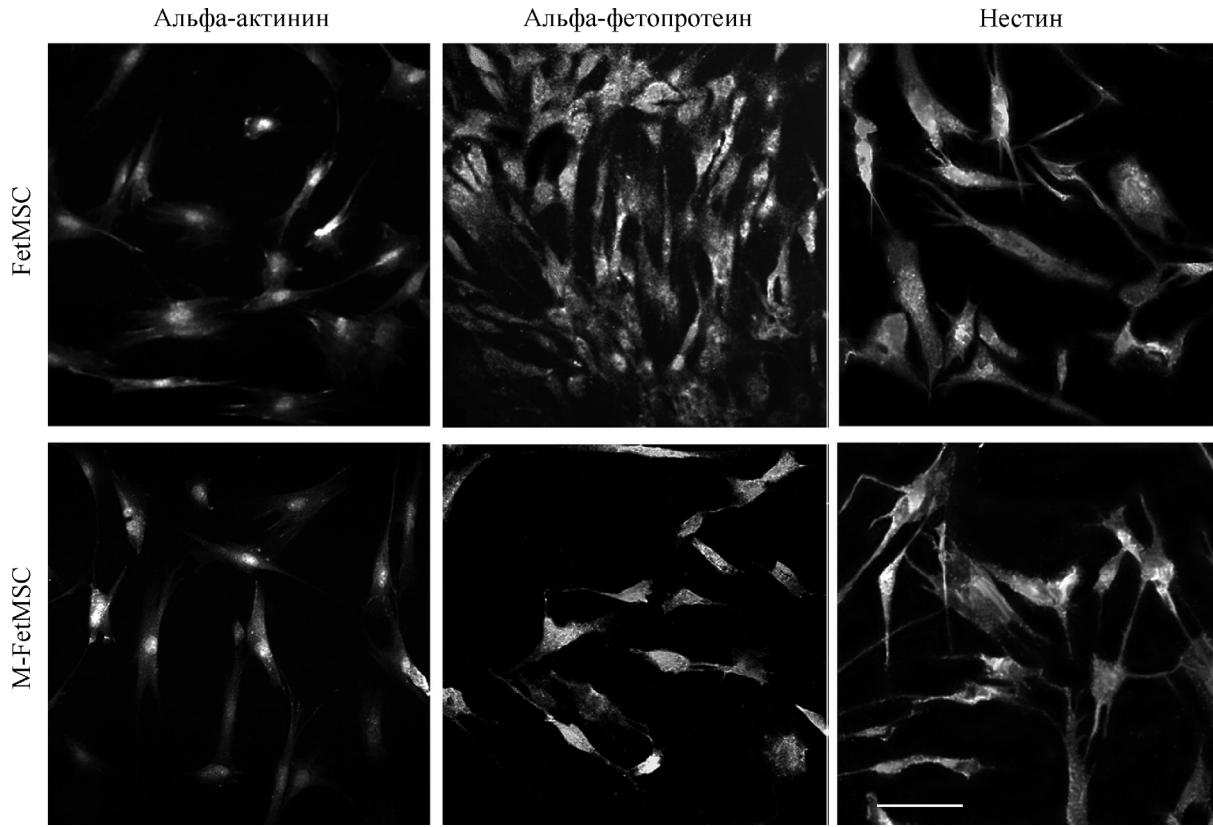


Рис. 5. Экспрессия маркеров ранней дифференцировки ЭСК в клетках линий FetMSC и M-FetMSC.

Альфа-актинин, альфа-фетопротеин и нестин — маркеры мезодермы, эндодермы и эктодермы соответственно. Флуоресцентное мечение моноклональными антителами. Масштабный отрезок — 100 мкм.

нов, а также в регуляции клеточного цикла МСК. Это позволило авторам предположить наличие сходных регуляторных механизмов для Oct-4 в ЭСК и МСК и вовлечение Oct-4 в обеспечение пластичности МСК (Greco et al., 2007). Существенный интерес представляют результаты, полученные при сравнении МСК, выделенных из амниотической жидкости (AF-MSC) при 15—18-недельной беременности с МСК взрослого костного мозга (BM-MSC). Показан более высокий уровень экспрессии маркеров недифференцированных ЭСК (SSEA-4 и Oct-4) в AF-MSC по сравнению с BM-MSC. Авторы считают, что высокая экспрессия плuriпотентных маркеров в AF-MSC указывает на более примитивный фенотип с усиленным «стволовым» потенциалом. Кроме того, в работе идентифицировано большое количество белков, присутствующих в AF-MSC, ответственных за ростовые свойства клеток, и отсутствующих в BM-MSC (Roubelakis et al., 2007). Наши результаты в некоторой степени совпадают с этими данными и подтверждают, что МСК, полученные из эмбриональных тканей, по-видимому, более перспективны для клеточной терапии, чем взрослые МСК. Но тем не менее следует отметить, что в полученной нами ранее линии МСК из крайней плоти ребенка также обнаружена экспрессия маркера SSEA-4 на 12—14-м пассажах культивирования. Возможно, что существование плuriпотентных маркеров в МСК связано с перемещением ЭСК в процессе эмбрионального развития в некоторые ткани, которые в результате имеют ЭСК-ассоциированные маркеры (Riekstina et al., 2009). Надо подчеркнуть, что в целом статус МСК зависит от комбинации разных факторов, и неизвестно, какое влияние на функциональные свойства МСК

оказывает различная экспрессия отдельных маркеров (Hematti, 2011).

Иммунофлуоресцентный анализ показал, что клетки полученной линии M-FetMSC экспрессируют маркеры ранней дифференцировки в производные трех зародышевых листков (рис. 5). Эти результаты совпадают с ранее полученными данными о наличии экспрессии маркеров ранней дифференцировки в линиях МСК из разных источников — ЭСК, крайней плоти, а также из эмбрионального костного мозга того же донора, что и линия M-FetMSC (Крылова и др., 2012). В литературе имеется ряд данных, свидетельствующих о существовании этого явления. В частности, с помощью ПЦР-анализа показана экспрессия нестина (эктодерма), TGF- β и GATA4 (мезодерма), PDX1 (эндодерма) в разных по происхождению линиях МСК (Riekstina et al., 2009). Авторы предполагают, что дифференцировочная пластичность МСК связана с экспрессией маркеров ранней дифференцировки. Показана дифференцировка МСК разного происхождения в производные не только мезодермы, но и в производные эктодермы и эндодермы (Huang et al., 2010; Antonucci et al., 2011; 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, одновременно присутствуют ранние маркеры как мезодермальной, так и эктодермальной диффе-

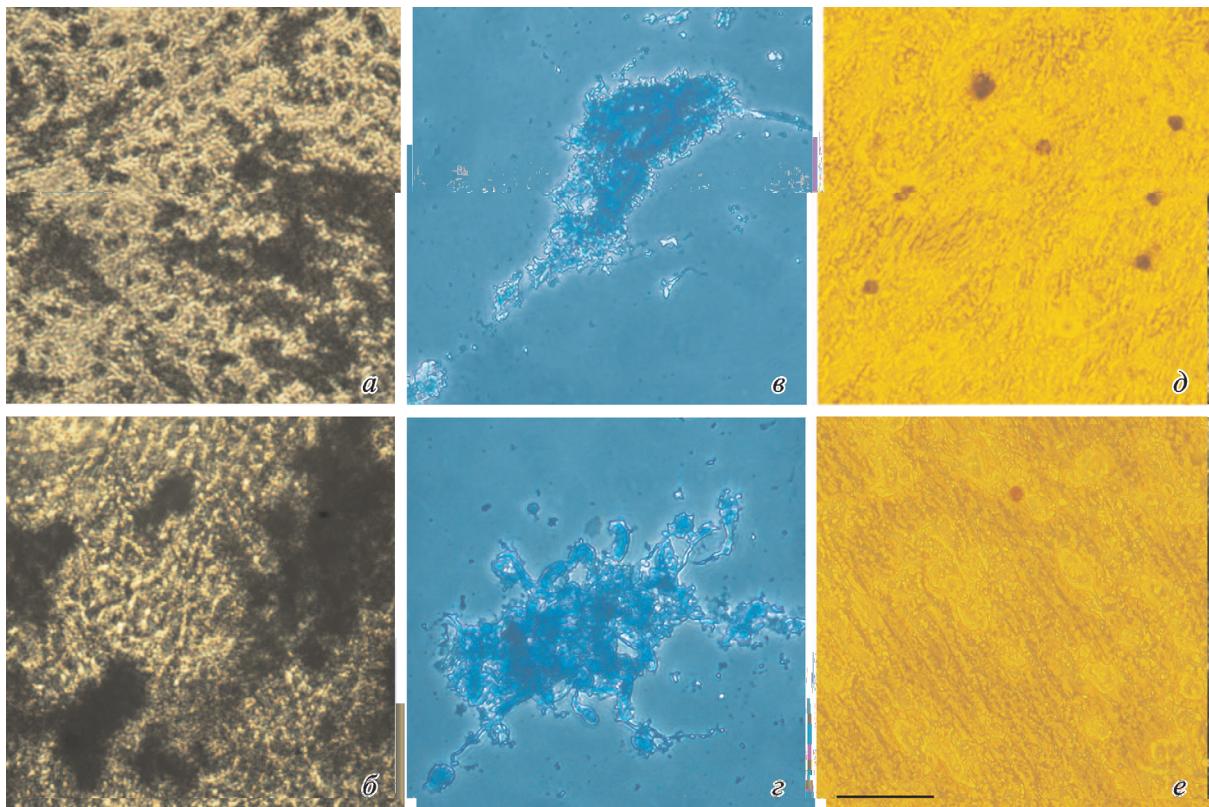


Рис. 6. Дифференцировка клеток линий FetMSC и M-FetMSC в остеогенном (*a*, *b*, реакция von Kossa), хондрогенном (*c*, *e*, окрашивание толуидиновым синим) и адипогенном (*d*, *e*, окрашивание масляным красным) направлениях.

a, *b*, *d* — линия FetMSC; *c*, *e* — линия M-FetMSC. Масштабный отрезок — 50 мкм.

ренцировки (Mamidi et al., 2011). Косвенным подтверждением возможности одновременного существования ранних маркеров дифференцировки в клетках разных линий МСК является совпадение числа клеток, меченных антителами против антигенов, характеризующих производные трех зародышевых листков, с числом ядер, окрашенных Hoechst 33342 (Крылова и др., 2012).

Тем не менее существует точка зрения, согласно которой экспрессия маркера ранней дифференцировки βIII-тубулина до начала направленной дифференцировки не имеет отношения к последующему дифференцировочному потенциальному, а возможно, связана с эмбриональным происхождением МСК (Sensebe et al., 2010). Последнее предположение поддерживает ранее высказанное мнение о том, что существование маркеров ЭСК в МСК, возможно, связано с перемещением плюрипотентных ЭСК в процессе эмбрионального развития в некоторые ткани, которые в результате имеют ЭСК-ассоциированные маркеры (Riekstina et al., 2009). Пока данная проблема находится в стадии накопления экспериментального материала и гипотез, так как механизмы взаимосвязи маркеров ранней дифференцировки (характеризующих ЭСК и присутствующих в МСК) с дифференцировочной пластичностью МСК неизвестны.

Индукция остеогенной, хондрогенной и адипогенной дифференцировок в линии FetMSC выявила способность клеток формировать костную, хондрогенную и жировую ткани, что соответствует статусу МСК (рис. 6). В отличие от клеток FetMSC клетки M-FetMSC менее активно формируют жировую ткань. Культивирование клеток в остеогенной среде способствовало форми-

рованию минеральных комплексов, что показано с помощью реакции von Kossa, позволяющей выявить нерастворимые соли кальция в межклеточном пространстве. Культивирование клеток в хондрогенной среде привело к образованию структур, которые выявляются с помощью полихромного окрашивания толуидиновым синим, которое позволяет идентифицировать ядра и компоненты хрящевой ткани, в частности протеогликаны. Культивирование клеток в адипогенной среде способствовало образованию значительного количества кластеров адипоцитов, показанного с помощью окрашивания красителем Oil Red O в клетках FetMSC, но не M-FetMSC.

Проведение нескольких повторных экспериментов по адипогенной дифференцировке убедительно показало, что клетки M-FetMSC в отличие от клеток FetMSC показывают очень низкий уровень адипогенной дифференцировки. Результаты по мультипотентной мезодермальной дифференцировки в трех направлениях в линии FetMSC совпадают с данными других исследований по дифференцировочному потенциальному МСК, полученными из разных источников (Rubio et al., 2005; Lorenz et al., 2008; Савченкова, Коржикова, 2010; Huang et al., 2010; Lai et al., 2011). Существенно сниженный дифференцировочный потенциал в адипогенном направлении линии M-FetMSC может быть связан с другим микроокружением, из которого были выделены эти клетки.

Сравнительный анализ МСК из разных источников и от разных доноров свидетельствует о некоторых различиях по ростовым характеристикам и дифференцировочно-му потенциальному (Shih et al., 2005; Varga et al., 2011). Привлекает внимание работа по исследованию влияния усло-

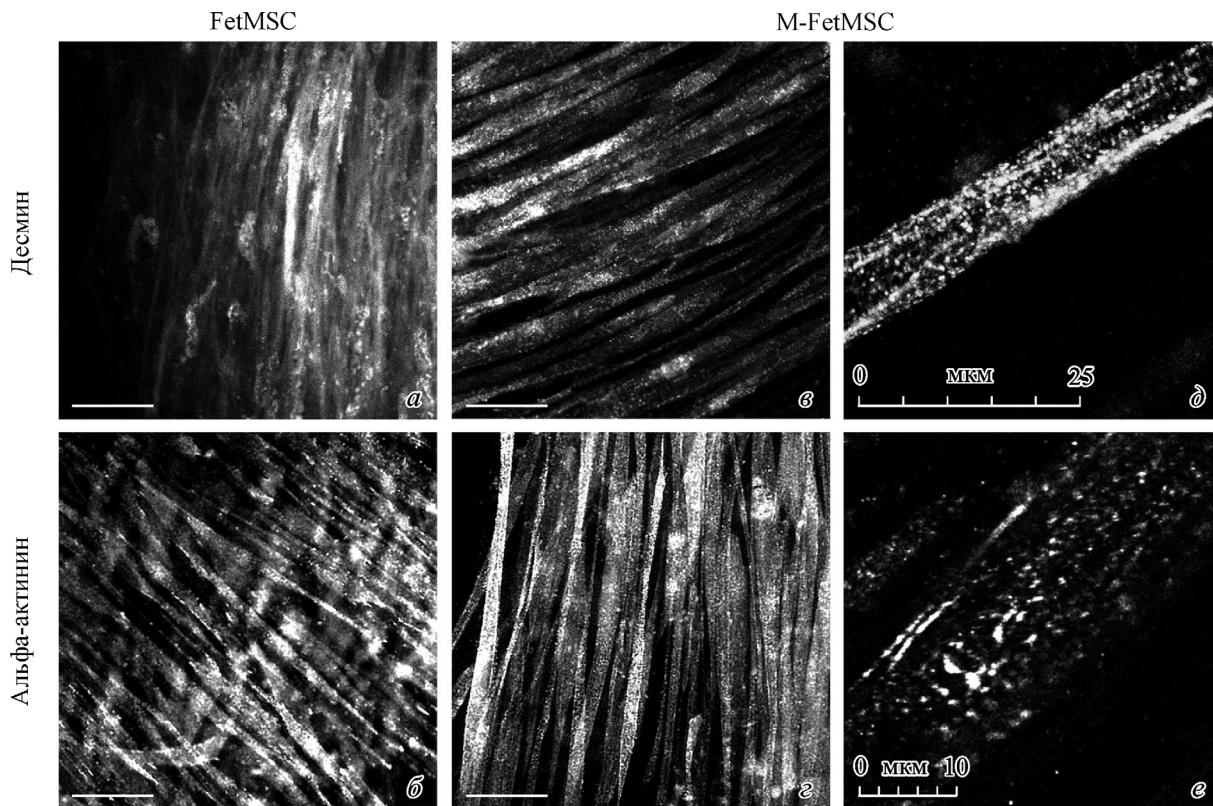


Рис. 7. Экспрессия маркеров скелетно-мышечной дифференцировки в клетках линий FetMSC и M-FetMSC.

Флуоресцентное мечение моноклональными антителами против десмина и α -актинина; *a*—*c* — миотубы (ранняя дифференцировка). *Масштабный отрезок* — 100 мкм; *d*, *e* — Z-диски (поздняя дифференцировка), видны только в линии M-FetMSC.

вий культивирования, в частности разных сред, на свойства МСК, полученных из взрослого костного мозга разных доноров. Прежде всего авторы отметили зависимые от донора различия по ростовым и дифференцировочным характеристикам. Но основную роль в различиях по этим характеристикам и экспрессии поверхностных маркеров играет выбор ростовой среды для культивирования клеток (Hagmann et al., 2013). К похожим выводам пришли и другие авторы (Phinney et al., 1999), которые показали, что основные различия по указанным выше характеристикам в популяциях МСК из костного мозга в большей степени связаны с условиями культивирования, чем с разными донорами. Кроме того, показана неоднородность популяций МСК, полученных из амниотической мембраны человека. Выделенные субпопуляции различались как по экспрессии поверхностных маркеров, так и по дифференцировочному потенциальному (Leyva-Leyva et al., 2013). В работе Тепляшина с соавторами (2005) проведен сравнительный анализ двух клеточных популяций с фенотипом, подобным МСК, выделенных из разных участков подкожно-жировой ткани одного донора. Различия между этими популяциями были связаны с разной экспрессией поверхностного маркера CD34, которая была существенно повышена в МСК из жировой ткани век. Этот маркер принят считать маркером гематопоэтических стволовых клеток (ГСК). Тем не менее иногда он встречается и в МСК разного происхождения (Тепляшин и др., 2005; Kopher et al., 2010), но при этом не изменяет основных характеристик МСК, включая дифференцировочный потенциал. Пока неясны механизмы взаимодействия маркера CD34 с маркерами МСК.

Таким образом, из анализа данных литературы следует, что популяции МСК независимо от происхождения представляют собой неоднородные популяции. Определенное микроокружение может быть стимулом к селекции разных субпопуляций МСК, имеющих существенные эпигенетические различия. Учитывая, что в нашей работе обе линии культивировали в одной и той же ростовой среде и в идентичных условиях, наблюдаемые различия между линиями по дифференцировочному потенциальному вполне могут быть связаны с различным микроокружением (костный мозг и мышца раннего эмбриона).

Заключительная часть работы посвящена сравнительному анализу параметров направленной скелетно-мышечной дифференцировки клеток линий FetMSC и M-FetMSC с разной локализацией клеток-предшественников полученных линий (эмбриональная мышца и костный мозг). Мышечные клетки, полученные в культуре *in vitro*, могут использоваться для трансплантаций *in vivo* с целью клеточной репарации при заболеваниях мышечной системы.

Иммунофлуоресцентный анализ выявил наличие экспрессии маркеров дифференцировки десмина и α -актинина в обеих наших линиях. Рис. 7 показывает слияние миобластов и образование многоядерных миотуб. На более поздней стадии дифференцировки, приближающейся к терминальной, обнаружаются различия между линиями. Так, в линии M-FetMSC с помощью антител против десмина и α -актинина можно видеть Z-диски саркомера (рис. 7), а в клетках FetMSC выявить Z-диски не удалось. В процессе миогенной дифференцировки происходит перераспределение десмина и α -актинина из цитоплазмы

недифференцированных клеток в Z-диски саркомеров (Gard, Lalarides, 1980). Таким образом, характер миогенной дифференцировки у этих линий разный. Более активно дифференцировка проходит именно в мезенхимных клетках, выделенных из зародыша мышцы. Возможно, в данном случае имеет место влияние микроокружения, в котором находились клетки в организме до перевода их в культуру. Надо подчеркнуть, что для индукции миогенной дифференцировки существует несколько методов. Наблюдаемые различия по характеру дифференцировки имели место при конкретном описанном выше методе индукции. Нельзя исключить, что характер миогенной дифференцировки может зависеть от метода, используемого для ее получения.

В литературе есть ряд работ, демонстрирующих успешную миогенную дифференцировку из МСК, выделенных из разных источников. Так, МСК, полученные из ЭСК, могут направленно дифференцироваться в миогенном направлении, образуя многоядерные миотубы, способные к сокращению (Barberi et al., 2007; Awaya et al., 2012; Hwang et al., 2013). Показана индукция миогенной дифференцировки из МСК костного мозга взрослого донора с помощью 5-азасидтидина (Supokawej et al., 2013). Сравнительный анализ МСК, полученных из разных источников (жировой ткани, костного мозга и синовиальной мембранны), демонстрирует разную способность клеток к миогенной дифференцировке (De la Garza-Rodea et al., 2012). По данным этих авторов, наиболее эффективными являются МСК, выделенные из жировой ткани. Эти клетки обладают *in vitro* повышенной пролиферативной активностью, а *in vivo* способствуют более эффективной миогенной регенерации.

Таким образом, сравнительный анализ характеристик МСК, выделенных из разных эмбриональных тканей одного донора, свидетельствует о наличии ряда межлинейных различий, касающихся как ростовых характеристик, так и дифференционного потенциала.

Список литературы

- Гордеева О. Ф., Миталипова Ш. М. 2008. Плюрипотентные стволовые клетки: поддержание генетической и эпигенетической стабильности и перспективы клеточных технологий. Онтогенез. 39 (6) : 405—419. (Gordeeva O. F., Mitalipov Sh.M. 2008. Pluripotent stem cells: maintenance of genetic and epigenetic stability and prospects of cell technologies. Ontogenez. 39 (6) : 405—419.)
- Крылова Т. А., Кольцова А. М., Зенин В. В., Мусорина А. С., Яковлева Т. К., Полянская Г. Г. 2012. Сравнительные характеристики новых линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из эмбриональных стволовых клеток, костного мозга и крайней плоти человека. Цитология. 54 (1) : 5—16. (Krylova T. A., Koltsova A. M., Zenin V. V., Musorina A. S., Yakovleva T. K., Poljanskaya G. G. 2012. Comparative characteristics of new mesenchymal stem cell lines derived from human embryonic stem cells, bone marrow and foreskin. Tsitologiya. 54 (1) : 5—16.)
- Седова Г. П. 2008. Количественные аспекты злокачественного роста. Математическая морфология. Электронный математический и медико-биологический журнал. 7 : 2. URL: [Http://www.smolensk.ru/user/sgma/mmorph/n-18-html/cont.htm](http://www.smolensk.ru/user/sgma/mmorph/n-18-html/cont.htm). (Sedova G. P. 2008. Quantitative aspects of malignant body height. Mathematical morphology. Electronic Mathematical and Medicobiologic Journal. 7 : 2. URL: [Http://www.smolensk.ru/user/sgma/mmorph/n-18-html/cont.htm](http://www.smolensk.ru/user/sgma/mmorph/n-18-html/cont.htm).)
- Савченкова И. П., Коржикова С. В. 2010. Подкожно-жировая ткань человека, подвергнутая низкотемпературному шоку, как источник жизнеспособной клеточной популяции с характерами мультипотентных мезенхимных стromальных клеток. Цитология. 52 (8) : 621—628. (Savchenkova I. P., Korjikova S. V. 2010. Human subcutaneous adipose tissue subjected to cold shock as a source of viable cellular population with characteristics of multipotent mesenchymal stromal cells. Tsitologiya. 52 (8) : 621—628.)
- Тепляшин А. С., Чупикова Н. И., Коржикова С. В., Шарифуллина С. З., Ростовская М. С., Топчиашвили З. А., Савченкова И. П. 2005. Сравнительный анализ двух клеточных популяций с фенотипом, подобным мезенхимным стволовым клеткам, выделенных из разных участков подкожно-жировой клетчатки. Цитология. 47 (7) : 637—643. (Teplyashin A. S., Tchupikova N. I., Korzhikova S. V., Sharifullina S. Z., Rostovskaya M. S., Topchiashvili Z. A., Savchenkova I. P. 2005. Comparative analysis of cell populations with a phenotype similar to that of mesenchymal stem cells derived from subcutaneous fat. Tsitologiya. 47 (7) : 637—643.)
- Allegrucci C., Young L. E. 2007. Differences between human embryonic stem cell lines. Hum. Reprod. Update. 13 : 103—120.
- Ando Y., Matsubara K., Ishikawa J., Fujio M., Shohara R., Hibi H., Ueda M., Yamamoto A. 2014. Stem cell-conditioned medium accelerates distraction osteogenesis through multiple regenerative mechanisms. Bone. 61 : 82—90.
- Antonucci I., Stuppia L., Kaneko Y., Yu S., Tajiri N., Bae E. C., Chheda S. H., Weinbren N. L., Borlongan C. V. 2011. Amniotic fluid as rich source of mesenchymal stromal cells for transplantation therapy. Cell Transplant. 20 : 789—795.
- Awaya T., Kato T., Mizuno Y., Chang H., Niwa A., Umeda K., Nakahata T., Heike T. 2012. Selective development of myogenic mesenchymal cells from human embryonic and induced pluripotent stem cells. PLoS ONE. 7 (12) : e51638.
- Barberi T., Bradbury M., Dincer Z., Panagiotakos G., Soccia N. D., Studer L. 2007. Derivation of engraftable skeletal myoblasts from human embryonic stem cells. Nat. Med. 13 : 642—648.
- Barberi T., Willis L. M., Soccia N. D., Studer L. 2005. Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells. PLoS Med. 2 : e161.
- Barbet R., Peiffer I., Hatzfeld A., Charbord P., Hatzfeld J. A. 2011. Comparison of Gene expression in human embryonic stem cells, hESC-derived mesenchymal stem cells and human mesenchymal stem cells. Stem Cells Int. 2011 : 368192.
- Caplan A. I., Dennis J. E. 2006. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. J. Cell. Biochem. 98 : 1076—1084.
- Carvalho M. M., Teixeira F. G., Reis R. L., Sousa N., Salgado A. J. 2011. Mesenchymal stem cells in the umbilical cord: phenotypic characterization, secretome and applications in central nervous system regenerative medicine. Curr. Stem Cell Res. Ther. 6 : 221—228.
- Choo A., Lim S. K. 2011. Derivation of mesenchymal stem cells from human embryonic stem cells. Methods Mol. Biol. 690 : 175—182.
- De la Garza-Rodea A. S., van der Velde-van Dijke I., Boersma H., Gonçalves M. A., van Bekkum D. W., de Vries A. A., Knaän-Shanzer S. 2012. Myogenic properties of human mesenchymal stem cells derived from three different sources. Cell Transplant. 21 : 153—173.
- De Peppo G. M., Sladkova M., Sjovall P., Palmquist A., Oudina K., Hyllner J., Thomsen P., Petite H., Karlsson C. 2013. Human embryonic stem cell-derived mesodermal progenitors display substantially increased tissue formation compared to human mesenchymal stem cells under dynamic culture conditions in a packed bed/column bioreactor. Tissue Eng. (A). 19 : 175—187.
- De Peppo G. M., Svensson S., Lenneras 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. (A). 16 : 2161—2182.
- Donovan P. J., Gearhart J. 2001. The end of the beginning for pluripotent stem cells. Nature. 414 : 92—97.
- Drukier M., Benvenisty N. 2004. The immunogenicity of human embryonic stem-derived cells. Trends in Biotechnol. 22 : 135—141.

- Drukker M., Katz G., Urbach A., 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.
- Gang E. J., Bosnakovski D., Figueiredo C. A., Visser J. W., Perlingeiro R. C. 2007. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. Blood. 109 : 1743—1751.
- Gard D. L., Lazarides E. 1980. The synthesis and distribution of desmin and vimentin during myogenesis *in vitro*. Cell. 19 : 263—275.
- Ge S., Mrozik K. M., Menicanin D., Gronthos S., Bartold P. M. 2012. Isolation and characterization of mesenchymal stem cell-like cells from healthy and inflamed gingival tissue: potential use for clinical therapy. Regen. Med. 7 : 819—832.
- Greco S. J., Liu K., Rameshwar P. 2007. Functional similarities among genes regulated by OCT4 in human mesenchymal and embryonic stem cells. Stem Cells. 25 : 3143—3154.
- Gruenloh W., Kambal A., Sondergaard C., McGee J., Nacey C., Kalomoiris S., Pepper K., Olson S., Fierro F., Nolta J. A. 2011. Characterization and *in vivo* testing of mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cells. Tissue Eng. (A). 17 : 1517—1525.
- Guiducci S., Manetti M., Romano E., Mazzanti B., Ceccarelli C., Dal Pozzo S., Milia A. F., Bellando-Randone S., Fiori G., Conforti M. L., Saccardi R., Ibbi-Manneschi L., Matucci-Cerinic M. 2011. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells from early diffuse systemic sclerosis exhibit a paracrine machinery and stimulate angiogenesis *in vitro*. Ann. Rheum. Dis. 70 : 2011—2021.
- Hagmann S., Moradi B., Frank S., Dreher T., Kämmerer P. W., Richter W., Gotterbarm T. 2013. Different culture media affect growth characteristics, surface marker distribution and chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. BMC Musculoskelet Disord. 14 : 223—233.
- Hematti P. 2011. Human embryonic stem cell-derived mesenchymal progenitors: an overview. Methods Mol. Biol. 690 : 163—174.
- 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. Tissue Eng. (A). 16 : 1491—1501.
- Huang Y. C., Leung V. Y., Lu W. W., Luk K. D. 2013. The effects of microenvironment in mesenchymal stem cell-based regeneration of intervertebral disc. Spine J. 13 : 352—362.
- Hwang Y., Suk S., Lin S., Tierney M., Du B., Seo T., Mitchell A., Sacco A., Varghese S. 2013. Directed *in vitro* myogenesis of human embryonic stem cells and their *in vivo* engraftment. PLoS ONE. 8(8) : e72023.
- Kita K., Gauglitz G. G., Phan T. T., Herndon D. N., Jeschke M. G. 2010. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the sub-amniotic human umbilical cord lining membrane. Stem Cells Develop. 19 : 491—502.
- Kopher R. A., Penchev V. R., Islam M. S., Hill K. L., Khosla S., Kaufman D. S. 2010. Human embryonic stem cell-derived CD34+ cells function as MSC progenitor cells. Bone. 47 : 718—728.
- 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. (A). 16 : 705—715.
- Leyva-Leyva M., Barrera L., López-Camarillo C., Arriaga-Pizano L., Orozco-Hoyuela G., Carrillo-Casas E. M., Calderón-Perez J., López-Díaz A., Hernandez-Aguilar F., González-Ramírez R., Kawa S., Chimal-Monroy J., Fuentes-Mera L. 2013. Characterization of mesenchymal stem cell subpopulations from human amniotic membrane with dissimilar osteoblastic potential. Stem Cells Develop. 22 : 1275—1287.
- Li O., Tormin A., Sundberg B., Hyllner J., Le Blanc K., Scheiding S. 2013. Human embryonic stem cell-derived mesenchymal stroma cells (hES-MSCs) engraft *in vivo* and support hematopoiesis without suppressing immune function: implications for off-the shelf ES-MSC therapies. PLoS ONE. 8(1) : e55319.
- 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.
- Lin W., Oh S. K., Choo A. B., George A. J. 2012. Activated T cells modulate immunosuppression by embryonic- and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells through a feedback mechanism. Cytotherapy. 14 : 274—284.
- Lorenz K., Sicker M., Schmelzer E., Rupp T., Salveter J., Schulz-Siegmund M., Bader A. 2008. Multilineage differentiation potential of human dermal skin-derived fibroblasts. Exp. Dermatol. 17 : 925—932.
- Luo J., Zhao X., Tan Z., Su Z., Meng F., Zhang M. 2013. Mesenchymal-like progenitors derived from human embryonic stem cells promote recovery from acute kidney injury via paracrine actions. Cytotherapy. 15 : 649—662.
- Mamidi M. K., Pal R., Mori N. A., Arumugam G., Thrichelvam S. T., Noor P. J., Abdullah H. M., Gupta P. K., Das A. K., Zakkaria Z., Bhone 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.
- Meisner L. F., Johnson J. A. 2008. Protocols for cytogenetics studies of human embryonic stem cells. Methods. 45 : 133—141.
- Mihu C. M., Rus Ciucă D., Soritau O., Susman S., Mihu D. 2009. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the amniotic membrane. Rom. J. Morphol. Embryol. 50 : 73—77.
- 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.
- Odorico J. S., Kaufman D. S., Thomson J. A. 2001. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. Stem Cells. 19 : 193—204.
- 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., Kopen G., Righter W., Webster S., Tremain N., Prockop D. J. 1999. Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. J. Cell. Biochem. 75 : 424—436.
- 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.
- 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.
- Riekstina U., Cakstina I., Parfejevs V., Hoogduijn M., Jankovskis G., Muiznieks I., Mucenieks R., Ancans J. 2009. Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. Stem Cell Rev. 5 : 378—386.
- Roubelakis M. G., Pappa K. I., Bitsika V., Zagoura D., Vlahou A., Papadaki H. A., Antsaklis A., Anagnou N. P. 2007. Molecular and proteomic characterization of human mesenchymal stem

- cells derived from amniotic fluid: comparison to bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Develop.* 16 : 931—952.
- Sensebe L., Krampera M., Schrezenmeier H., Bourin P., Giordano R. 2010. Mesenchymal stem cells for clinical application. *Vox Sang.* 98 : 93—107.
- Shih D. T., Lee D. C., Chen S. C., Tsai R. Y., Huang C. T., Tsai C. C., Shen E. Y., Chiu W. T. 2005. Isolation and characterization of neurogenic mesenchymal stem cells in human scalp tissue. *Stem Cells.* 23 : 1012—1020.
- Supokawej A., Kheolamai P., Nartprayut K., U-Pratya Y., Manochantr S., Chayosumrit M., Issaragrisil S. 2013. Cardiogenic and myogenic gene expression in mesenchymal stem cells after 5-aza-cytidine treatment. *Turk J. Haematol.* 30 : 115—121.
- Tan Z., Su Z. Y., Wu R. R., Gu B., Liu Y. K., Zhao X. L., Zhang M. 2011. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cells *in vivo* and *in vitro*. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 12 : 18—27.
- Trivedi P., Hematti P. 2008. Derivation and immunological characterization of mesenchymal stromal cells from human embryonic stem cells. *Exp. Hematol.* 36 : 350—359.
- Trubiani O., Zalzal S. F., Paganelli R., Marchisio M., Giancoccia R., Pizzicannella J., Buhring H. J., Piattelli M., Caputi S., Nanci A. 2010. Expression profile of the embryonic markers nanog, OCT-4, SSEA-1, SSEA-4, and frizzled-9 receptor in human peri-
- dental ligament mesenchymal stem cells. *J. Cell. Physiol.* 225 : 123—131.
- Varga N., Veréb Z., Rajnavölgyi E., Német K., Uher F., Sarkadi B., Apáti A. 2011. Mesenchymal stem cell like (MSCL) cells generated from human embryonic stem cells support pluripotent cell growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 414 : 474—480.
- Yan Z. J., Hu Y. Q., Zhang H. T., Zhang P., Xiao Z. Y., Sun X. L., Cai Y. Q., Hu C. C., Xu R. X. 2013. Comparison of the neural differentiation potential of human mesenchymal stem cells from amniotic fluid and adult bone marrow. *Cell Mol. Neurobiol.* 33 : 465—475.
- 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 and concise gene expression profiling of human embryonic stem cell-derived mesenchymal progenitors (EMPs). *Cell Transplant.* 20 : 1529—1545.
- Zhang H., Zhang B., Tao Y., Cheng M., Hu J., Xu M., Chen H. 2012. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from whole human umbilical cord applying a single enzyme approach. *Cell Biochem. Funct.* 30 : 643—649.

Поступила 26 III 2014

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF MESENCHYMAL STEM CELL LINES DERIVED FROM BONE MARROW AND MUSCLE OF LIMB OF EARLY HUMAN EMBRYO

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

Institute of Cytology, RAS, St. Petersburg;

¹ e-mail: poljansk@mail.cytspb.rssi.ru

In this work, we have carried out a comparative analysis of the characteristics of mesenchymal stem cell lines isolated from different tissues of 5—6-weeks human embryo: bone marrow (line FetMSC) and muscle of limb (line M-FetMSC). The basic characteristics of these lines were obtained at the 6th passage. Average population doubling time was 33.0 ± 1.4 h (FetMSC) and 25.0 ± 0.1 h (M-FetMSC). Growth curves also indicated active proliferation of cells of both lines. Numerical and structural karyotypic analysis showed that both lines have a normal karyotype: 46, XY. In order to determine the status of the lines, cell surface markers were analyzed by flow cytometry. The analysis revealed the presence of surface antigens specific for human MSCs, CD44, CD73, CD90, CD105, HLA-ABC, vimentin, and the lack of CD34 and HLA-DR, in both lines. The ability to differentiate into osteogenic, chondrogenic and adipogenic directions has been also shown for both lines. Immunofluorescence and flow cytometry analysis has detected no expression of the surface antigen TRA-1-60 in both lines, but has revealed high expression of the surface antigen SSEA-4 and low expression of transcription factor Oct-4 characteristic of human embryonic stem cells. In these lines, immunofluorescence analysis has shown the presence of the markers of early differentiation in the derivatives of three germ layers characteristic of human embryonic stem cells, which provides significant opportunities for MSC to be useful, in corresponding microenvironments, for repair of tissue injuries. Despite confirming MSC status for FetMSC and M-FetMSC lines, a number of interlinear differences related to growth characteristics and differentiation potential were revealed. Adipogenic differentiation potential of M-FetMSC line was reduced compared with FetMSC line. Immunofluorescence analysis showed that, in the process of skeletal-muscle differentiation, Z-disks were revealed only in sarcomeres of M-FetMSC line. These findings suggest the possible influence of different microenvironments in which the cells are in the body before their transfer *in vitro*.

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