

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОЙ СУБЛИНИИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА SC6-FF В АЛЛОГЕННОЙ БЕСФИДЕРНОЙ СИСТЕМЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

© А. М. Кольцова, Т. К. Яковлева, Г. Г. Полянская¹

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;

¹электронный адрес: poljansk@incras.ru

Из линии эмбриональных стволовых клеток человека (ЭСКч) SC6, ранее выделенных и культивированных в условиях фидера, получена новая сублиния SC6-FF в бесфидерной системе. В качестве ключевых компонентов бесфидерной системы использовали внеклеточный матрикс и кондиционированную среду от линии мезенхимных стволовых клеток человека SC5-MS. Таким образом, используемая бесфидерная система по отношению к культивируемым в ней клеткам является аллогенной. Сублиния SC6-FF прошла в условиях бесфидерного культивирования более 100 удвоений клеточной популяции и сохранила нормальный диплоидный кариотип человека 46, XX. Среднее время удвоения клеточной популяции составляет 23.7 ± 0.8 ч, что не отличается от времени удвоения клеток исходной линии SC6. Гистохимический и иммунофлуоресцентный анализы маркеров недифференцированных ЭСКч показали наличие в клетках активности щелочной фосфатазы, а также экспрессию транскрипционного фактора Oct-4 и поверхностных видоспецифических маркеров SSEA-4 и TRA-1-60. Ненаправленная дифференцировка клеток сублинии SC6-FF привела к появлению клеток, отличающихся по своим размерам и морфологии от исходной клеточной популяции. Последующая иммунофлуоресцентная окраска позволила выявить в полученной популяции клетки, несущие маркеры, характерные для производных эктодермы (нестин), мезодермы (альфа-актинин) и энтодермы (альфа-фетопротейн). На основании полученных экспериментальных данных можно сделать вывод о том, что полученная сублиния SC6-FF по всем характеристикам соответствует статусу ЭСКч.

Ключевые слова: бесфидерная система культивирования, эмбриональные стволовые клетки человека, экспрессия маркеров, дифференцировка, кариотип.

Принятые сокращения: ВКМ — внеклеточный матрикс, ЭСКч — эмбриональные стволовые клетки человека.

Плюрипотентные эмбриональные стволовые клетки человека (ЭСКч) представляют собой перспективный материал для использования в фундаментальных исследованиях молекулярной и клеточной биологии, а также для прикладных исследований в области эмбриологии, токсикологии и регенеративной медицины. Широкий спектр возможного использования данных клеточных популяций обусловлен их способностью к неограниченной пролиферации и дифференцировкой во все типы соматических клеток, а также в линию половых клеток. Исследования последних лет доказали возможность их дифференцировки в клетки, соответствующие специализированным клеткам взрослого организма, в частности в инсулинпродуцирующие клетки (Baharvand et al., 2006; Bose et al., 2012; Narayanan et al., 2014), кардиомиоциты (Pal et al., 2013; Devalla et al., 2015; Lei et al., 2015), гепатоциты (Miki et al., 2011; Cameron et al., 2015; Davidson et al., 2015; Szkolnicka et al., 2014) и нейральные предшественники (Sundberg et al., 2011; Zeltner et al., 2014; Zhang et al., 2014). Рядом авторов показана возможность дифференцировки ЭСКч *in vitro* в первичные половые клетки (Cai et al., 2013; Duggal et al., 2013; Wang et al., 2013).

Успешное использование ЭСКч для фундаментальных исследований и прикладных медицинских задач возможно лишь при условии создания стандартных и воспроизводимых систем культивирования, позволяющих получать достаточные количества как самих недифференцированных ЭСК, так и их производных.

Поддержание недифференцированного состояния и пролиферативной активности ЭСКч зависит от взаимодействия множества сигнальных систем, которые в свою очередь регулируются различными факторами, в том числе растворимыми молекулами факторов роста и компонентами внеклеточного матрикса (ВКМ). Таким образом, культивирование ЭСКч требует создания сложной многокомпонентной системы, стабильность которой будут определять свойства культивируемых в ней клеточных популяций. Известно, что линии ЭСК в большей степени, чем другие стволовые клетки, подвержены генетической нестабильности. Условия культивирования являются важным фактором, вносящим существенный вклад в появление генетической нестабильности линий ЭСКч (Полянская, 2014).

Традиционно для культивирования ЭСКч используют в качестве субстрата слой фидерных митотически

инактивированных клеток и ростовую среду, в состав которой входят различные ростовые факторы. Фидерными клетками часто служат эмбриональные фибробласты мыши (Thomson et al., 1998; Park et al., 2003), а также различные клетки человека (Novatta et al., 2003; Richards et al., 2003; Koltsova et al., 2011; Zhang et al., 2011). Фидерные клетки являются продуцентами компонентов ВКМ и растворимых ростовых факторов, которые в свою очередь обеспечивают прикрепление ЭСК к культуральной поверхности и регулируют процессы их пролиферации и поддержания основных свойств. Использование фидерной системы культивирования, однако, имеет ряд недостатков. Во-первых, фидерное культивирование предполагает наличие двух взаимодействующих клеточных систем, свойства каждой из которых зависят от воздействия внешних факторов (условий культивирования), а их изменения будут опосредованно влиять на свойства сокультивирующихся клеточных популяций. Во-вторых, несмотря на то что популяция фидерных клеток подвергается митотической инактивации, всегда есть вероятность контаминации популяции ЭСКч фидерными клетками. Кроме описанных проблем есть и еще одна — возможность контаминации ЭСК патогенами ксеногенного и аллогенного происхождения (Martin et al., 2005; Heiskanen et al., 2006; Stacey et al., 2006; Cobo et al., 2008; Kubikova et al., 2009). Использование в качестве фидера эмбриональных фибробластов мыши, а также сыворотки животного происхождения в составе ростовой среды несет риск контаминации ЭСКч. Этот риск связан не только с такими патогенами животного происхождения, как вирусы (Cobo et al., 2008), но и с отдельными молекулами, которые, встраиваясь в мембрану ЭСКч, могут далее вызывать иммунную реакцию (Martin et al., 2005).

Аллогенные компоненты (фидерные клетки и сыворотка крови человека) в системах культивирования ЭСК человека более приемлемы, чем ксеногенные, однако и они должны быть перед использованием тщательно изучены на предмет наличия различных патогенов.

Альтернативой фидерному культивированию является использование бесфидерных систем культивирования ЭСКч. Наиболее популярным субстратом для культивирования ЭСКч в бесфидерной системе является Матригель — коммерческий продукт, получаемый из клеток саркомы мыши, представляющий собой смесь ряда ростовых факторов и таких компонентов ВКМ, как коллаген IV типа, ламинин, протеогликаны и энтактин (Greenlee et al., 2004). Матригель в сочетании с набором ростовых факторов или кондиционированной средой от фидерных клеток — наиболее часто используемая система бесфидерного культивирования ЭСКч (Xu et al., 2001, 2005; Rosler et al., 2004; Stojkovic et al., 2005; Wang et al., 2005; Choo et al., 2008; Montes et al., 2009; Tsai et al., 2010; Higuchi et al., 2011; Sanchez et al., 2012). Несмотря на свою популярность и доступность, Матригель по отношению к ЭСКч является ксеногенным продуктом, а соответственно не исключает риска контаминации клеток патогенами животного происхождения (Carlson et al., 2011). Кроме того, состав Матригеля от партии к партии может варьировать, что влияет на его способность поддерживать рост недифференцированных клеток и на воспроизводимость результатов исследований.

Альтернативой ксеногенному ВКМ можно считать матрикс, наработанный фидерными клетками человеческого происхождения. Его использование позволяет со-

здать аллогенную систему культивирования ЭСКч. Для получения такого матрикса фидерные клетки сначала культивируют в течение некоторого времени на поверхности культурального пластика, а потом посредством различных методов удаляют (Klimanskaya et al., 2005; Abraham et al., 2010; Meng et al., 2010; Ilic et al., 2012).

Субстрат, наработанный фидерными клетками, может быть использован и при создании аутогенной системы культивирования ЭСКч. Для этого в качестве клеток-продуцентов используют клетки, полученные посредством дифференцировки ЭСКч той линии, клетки которой будут в дальнейшем переведены в бесфидерную систему культивирования (Fu et al., 2011).

Изучение отдельных компонентов ВКМ, в частности Матригеля, показало, что не все из них в одинаковой степени способны поддерживать рост недифференцированных ЭСКч (Xu et al., 2001). Авторы показали, что по сравнению с фибронектином и коллагеном IV типа использование ламинина как субстрата бесфидерной системы культивирования более перспективно (Xu et al., 2001). Однако другие авторы показали возможность культивирования ЭСКч и на субстрате из коллагена (Furue et al., 2008; Jones et al., 2010), фибронектина (Xu et al., 2001; Amit et al., 2004; Noaksson et al., 2005; Hayashi et al., 2010), витронектина (Braam et al., 2008; Li et al., 2010) и Е-кадгерина (Nagaoka et al., 2010).

Стоит отметить, что немаловажную роль, определяющую эффективность системы бесфидерного культивирования, играет и подбор состава ростовой среды. Увеличение концентрации основного фактора роста фибробластов (bFGF), а также внесение в состав среды активина А и трансформирующего ростового фактора $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) позволяет отказаться от использования кондиционированной среды от мышинных эмбриональных фибробластов (Amit et al., 2004; Beattie et al., 2005; Xu et al., 2005). Кроме того, существуют и среды определенного химического состава, в которые входят не только культуральная среда и заменитель сыворотки, но и набор ростовых факторов в определенной концентрации. В ряде случаев их использование позволяет эффективно культивировать ЭСКч, но есть и примеры их неудачного использования (Villa-Diaz et al., 2010; Hughes et al., 2011; Nandivada et al., 2011; Valamehr et al., 2011).

Альтернативой субстратам из природных или рекомбинантных белков может быть использование искусственно синтезированных пептидов, содержащих домены компонентов ВКМ, рецепторы к которым есть на поверхности ЭСКч (Klim et al., 2010; Kolhar et al., 2010; Melkorian et al., 2010). Рядом авторов показана возможность длительного культивирования линий ЭСКч на синтетических полимергах (Malhstedt et al., 2010; Villa-Diaz et al., 2010; Nandivada et al., 2011). Кроме того, разрабатываются системы суспензионного культивирования (Steiner et al., 2010; Amit et al., 2011; Baharvand et al., 2012; Otsuji et al., 2014) и культивирования на 3D-носителях (Ge-recht et al., 2007; Li et al., 2010; Jang et al., 2013).

Анализ данных литературы позволяет сделать вывод о том, что эффективность той или иной системы бесфидерного культивирования ЭСКч определяется не отдельными ее компонентами, а их сочетанием. Вероятно, недостатки в составе ВКМ могут быть компенсированы компонентами, входящими в состав ростовой среды, и наоборот. Кроме того, необходимо учитывать и то, что разные линии ЭСКч могут по-разному адаптироваться к предлагаемым условиям бесфидерного культивирования

ввиду их межлинейных различий, обусловленных генетической индивидуальностью.

Использование химически определенных стандартных субстратов и компонентов ростовых сред, способных неограниченно поддерживать рост недифференцированных ЭСКч в бесфидерной системе, несомненно является одной из основных задач всех исследователей, работающих с линиями ЭСКч. Однако пока наряду с отсутствием единой стандартной системы культивирования ЭСКч есть и другая проблема — не все предлагаемые к использованию компоненты бесфидерных систем культивирования доступны широкому кругу исследователей. Некоторые из приведенных выше субстратов (подложек) не представлены на рынке, а представленные зачастую имеют очень высокую стоимость и для ряда экспериментов их использование оказывается нерентабельным.

Ранее нами была разработана система бесфидерного культивирования ЭСКч, ключевыми компонентами которой были ВКМ и кондиционированная среда от мезенхимных клеток линии SC5-MSC, полученной из линии ЭСКч (SC5). Использование этих продуктов позволило создать аутогенную систему культивирования для ЭСКч линии SC5 и аллогенную для линии SC7 и соответственно получить две новые бесфидерные сублинии SC5-FF и SC7-FF, обладающие всеми характеристиками плюрипотентных ЭСКч (Кольцова и др., 2012).

На основании полученных результатов была сформулирована цель настоящей работы — получить бесфидерную сублинию ЭСКч еще из одной линии — SC6, выделенной ранее и культивируемой в условиях фидера. Получение новой бесфидерной сублинии ЭСКч будет способствовать не только разнообразию уже имеющегося банка стволовых клеток человека, но и позволит определить, является ли используемая бесфидерная система культивирования универсальной и можно ли ее рекомендовать для работы с широким спектром линий ЭСКч.

В результате проведенной работы была получена новая бесфидерная сублиния ЭСКч, представленная клеточной популяцией, обладающей всеми свойствами и характеристиками, присущими плюрипотентным стволовым клеткам, и максимально адаптированной к бесфидерной системе культивирования.

Материал и методика

Для получения бесфидерной сублинии SC6-FF использовали ранее полученную из предимплантационной бластоцисты и культивируемую в условиях фидера линию ЭСКч — SC6 (Кольцова и др., 2011). В качестве фидерных клеток использовали линию мезенхимных стволовых клеток, выделенных из костного мозга раннего эмбриона человека, — FetMSC, полученную из ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных». Подробные характеристики этой линии представлены в предыдущей работе (Крылова и др., 2012).

В качестве продуцента ВКМ и кондиционированной среды использовали линию мезенхимных стволовых клеток SC5-MSC, полученную ранее из линии SC5, что позволило создать аллогенную систему бесфидерного культивирования для клеток линии SC6. Подробная методика выделения и культивирования клеток линии SC5-MSC была описана ранее (Крылова и др., 2012).

Кондиционированную среду от клеток линии SC5-MSC получали следующим образом: из культурального флакона

с клеточным монослоем отбирали всю среду, в которой культивировали клетки, промывали клетки раствором PBS, не содержащим ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} , и затем добавляли среду для культивирования ЭСК, не содержащую основного фактора роста фибробластов (bFGF, Chemicon, США) и имеющую следующий состав: 80 % DMEM/F12 (Биолот, Россия), 20 % Knockout Serum Replacement (Gibco, США), 2 mM L-глутамин (Sigma, США), 1 % заменимых аминокислот (Sigma, США) и 0.1 mM 2-меркаптоэтанола (Sigma, США). Клетки инкубировали в этой среде в течение 24 ч в CO_2 -инкубаторе при 37 °C и 90%-ной влажности. Затем среду отбирали, отфильтровывали и либо сразу использовали для приготовления ростовой среды для культивирования ЭСК в бесфидерной системе, либо аликвотировали по стерильным пробиркам и замораживали при -20 °C. В замороженном состоянии кондиционированную среду можно хранить в течение нескольких месяцев и использовать по мере необходимости.

ВКМ от линии SC5-MSC получали следующим способом: клетки рассеивали на чашки Петри в концентрации, образующей плотный монослой, инкубировали их в CO_2 -инкубаторе при 37 °C и 90 % влажности в течение 2 нед, меняя культуральную среду каждые 3—4 сут. Механическое снятие клеточного монослоя проводили при помощи пипетки, отделяя край монослоя от чашки Петри и той же пипеткой аккуратно смывая его с культуральной поверхности. После снятия монослоя клеток поверхность культурального пластика с оставшимися на ней белками внеклеточного матрикса промывали 2 раза раствором PBS без ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} , высушивали и хранили при -20 °C. В предыдущей работе мы определили состав ВКМ, полученного описанным способом, который включал в себя фибронектин, ламинин и коллаген 1 (Кольцова и др., 2012).

Для культивирования ЭСКч в бесфидерной системе использовали ростовую среду, половина которой состояла из 80 % DMEM/F12 (Биолот, Россия), 20 % Knockout Serum Replacement (Gibco, США), 2 mM L-глутамин (Sigma, США), 1 % заменимых аминокислот NEAA (Sigma, США) и 0.1 mM 2-меркаптоэтанола (Sigma, США), а другая половина имела тот же состав, но была кондиционированной от клеток линии SC5-MSC и содержала bFGF в конечной концентрации 32 нг/мл.

Пересев колоний ЭСК осуществляли механическим способом, нарезая их с помощью одноразового скальпеля. Пересевали колонии каждые 5—6 сут. Смену среды проводили ежедневно. Для расчета времени удвоения клеточной популяции измеряли площадь не менее 20 колоний в течение 4—5 сут. Колонии ЭСК фотографировали ежедневно при одинаковом увеличении, а их площадь определяли при помощи компьютерной программы WCIF ImageJ.

Кариотипический анализ проводили на 20-м пассаже. Для получения препаратов метафазных хромосом за 4 ч до фиксации в культуру ЭСК вводили колцеид KaryoMAX (0.1 мкг/мл, Gibco), клетки диссоциировали с помощью смеси трипсина и версена (1 : 3) и проводили гипотоническую обработку смесью 0.075 M раствора KCl и 1%-ного раствора цитрата натрия. Клетки фиксировали смесью метанола и ледяной уксусной кислоты (3 : 1) (Реактив, Россия). Для количественного кариотипического анализа метафазных пластинок хромосомы окрашивали водным раствором Гимза (1 : 50; Sigma, США). Модальное число хромосом и пределы изменчивости клеток по числу хромосом определяли при анализе

100 метафаз; долю полиплоидных клеток определяли при анализе 500 метафаз.

Для структурного кариотипического анализа проводили дифференциальное G-окрашивание хромосом в соответствии с ранее описанной методикой (Ozkinay, Mitelman, 1979). Анализировали 75 метафаз. Кариотип линии анализировали с помощью микроскопа Axio Imager.M1 (Carl Zeiss, ФРГ) с системой автоматического кариотипирования Ikaros 4 Karyotyping System (MetaSystems, ФРГ) и описывали в соответствии с Международной системой цитогенетической номенклатуры хромосом человека ISCN (Shaffer et al., 2009).

Для определения статуса ЭСК проводили гистохимический анализ активности щелочной фосфатазы. Для этого клетки в течение 20 мин фиксировали 4%-ным параформальдегидом, а затем в течение 30 мин обрабатывали BCIP/NBT Liquid Substrate System (Sigma, США) при 37 °С. Анализировали клетки под световым микроскопом (Nicon eclipse TS 100, Япония).

Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии транскрипционного фактора Oct-4 проводили с использованием моноклональных антител (Santa Cruz, США). Для видовой идентификации ЭСК проводили иммунофлуоресцентный анализ экспрессии поверхностных антигенов, свойственных только ЭСК человека, — SSEA-4 и TRA-1-60. Для этого использовали моноклональные антитела SSEA-4 и TRA-1-60 (Millipore, США). В качестве вторых антител использовали иммуноглобулины кролика, конъюгированные с FITC (Millipore, США). Иммунофлуоресцентную окраску проводили по стандартной, ранее описанной методике (Кольцова и др., 2011).

Для подтверждения статуса плюрипотентности ЭСК проводили спонтанную дифференцировку согласно стандартной методике, через стадию формирования эмбрионидных тел (Кольцова и др., 2011). Маркеры дифференцировки в производные трех зародышевых листков выявляли методом иммунофлуоресценции. В качестве первых антител использовали антитела против нестина (разведение 1 : 50; Millipore, США), характеризующего клетки эктодермального происхождения, α -фетопротейна (AFP, разведение 1 : 50; Sigma, США), характеризующего энтодермальные клетки, и α -актинина (разведение 1 : 50; Sigma, США), характеризующего клетки мезодермального происхождения. В качестве вторых антител использовали FITC-конъюгированные иммуноглобулины кролика (Millipore, США).

Анализ иммунофлуоресцентной окраски проводили с использованием конфокального микроскопа Leica TCS SP5.

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

Результаты и обсуждение

Кластеры клеток, переносимые на новый субстрат при пересеве колоний в бесфидерной системе культивирования, как правило, в течение первых 12 ч имеют сферическую форму подобно эмбрионидным тельцам и остаются в суспензионном состоянии. В последующие сутки эти сферы прикрепляются к поверхности чашки Петри, и начинается процесс пролиферации клеток и формирования плоских колоний. Стоит отметить, что на первых пассажах в измененных условиях культивирования происхо-

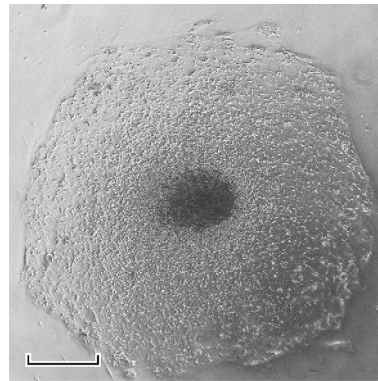


Рис. 1. Колония клеток сублинии ЭСКч SC6-FF.

Масштабный отрезок — 200 мкм.

дит процесс адаптации ЭСКч. Для популяции ЭСКч свойственна некоторая гетерогенность — в ней обязательно присутствуют коммитированные клетки. Смена условий провоцирует усиление дифференцировки, поэтому на первых пассажах наблюдается рост не только недифференцированных ЭСКч (что определяется по характерной для них морфологии самих клеток и формирующихся из них колоний), но и их дифференцированных производных, большая часть которых, как правило, располагается по краю колоний. Активизация дифференцировки на первых пассажах при смене условий культивирования описана в работах большинства авторов, использующих разные системы бесфидерного культивирования (Carpenter et al., 2004; Rosler et al., 2004; Meng et al., 2012). На первых пассажах проводили тщательный отбор колоний клеток нужной морфологии. Такая селекция со временем привела к тому, что дифференцированные клетки обнаруживались все реже и популяцию стали представлять плоские колонии плотно упакованных мелких клеток с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением (рис. 1).

Последовательное измерение растущих колоний (анализировали рост 21 колонии) и соотношение этих данных с временными диапазонами, в которых проводили замеры, позволили определить среднее время одного удвоения клеточной популяции. Оно составило 23.7 ± 0.8 ч. Клеточная сублиния прошла более 100 удвоений клеточной популяции. Одновременно было определено среднее время одного удвоения для популяции клеток исходной линии SC6, растущих на слое фидерных клеток (анализировали рост 23 колоний). Оно составило 23.3 ± 0.5 ч. Статистически анализ не выявил значимых различий ($P > 0.05$). Отсутствие достоверных различий по этому параметру позволяет предположить, что при переводе клеток из одной системы культивирования в другую произошел не отбор небольшой популяции клеток, способной к пролиферации и поддержанию основных свойств в отсутствие фидера, а адаптация большей части клеток к предлагаемым условиям культивирования. Это в свою очередь позволяет предположить, что используемая бесфидерная система культивирования имеет в своем составе все элементы, необходимые для поддержания роста ЭСКч.

Количественный кариотипический анализ линии SC6-FF показал, что линия характеризуется высокой частотой клеток с модальным числом хромосом, равным 46 (95.5 ± 2.0), и долей полиплоидных клеток (7.5 ± 1.2), что выше, чем в исходной линии SC6 (2.8 ± 0.7), $P < 0.01$ (Коль-

пова и др., 2011). Следует подчеркнуть, что в ранее полученных двух сублиниях, культивирующихся в бесфидерной системе, также наблюдается повышение частоты полиплоидных клеток (Кольцова и др., 2011, 2012). Известно, что в клеточных популяциях *in vitro*, лишившихся контроля со стороны интегральных систем организма, основными типами клеточного взаимодействия становятся физические контакты между клетками и между клетками и субстратом, а также химическая связь через метаболиты в культуральной среде. Эти взаимодействия объединяют клетки, составляющие клеточную популяцию, в автономную единую систему. Межклеточные контакты осуществляют как структурные, так и функциональные связи между клетками. Важным типом межклеточных контактов являются щелевые контакты, которые составляют основу «метаболической кооперации» (Cox et al., 1972; Hooper, Sooper, Subak-Sharpe, 1981; Шаровская и др., 2009). С учетом этой информации наблюдаемое увеличение частоты полиплоидов в «бесфидерных» клеточных популяциях по сравнению с «фидерными» популяциями, отражающее увеличение дозы определенных генов, может свидетельствовать о том, что полиплоидия является адаптивным механизмом, обеспечивающим кариотипическую стабильность полученных сублиний.

Структурный кариотипический анализ G-дифференциально окрашенных хромосом при уровне разрешения 400—550 дисков на гаплоидный набор показал, что линия SC6-FF имеет нормальный кариотип человека: 46, XX (рис. 2). При кариотипировании 75 клеток этой линии выявлены разрывы хромосом в четырех клетках (хроматидные разрывы в локусах 1p36.1 и 6p11, хромосомный разрыв в локусе 16p11.2, неидентифицированный парный фрагмент) и структурная перестройка — делеция короткого плеча X-хромосомы del(X)(p11.1). Клональные аномалии хромосом отсутствуют.

Для подтверждения плюрипотентного статуса полученной сублинии проведена гистохимическая окраска колоний на наличие активности щелочной фосфатазы. Темная окраска клеток как результат реакции специфичного субстрата и самой щелочной фосфатазы свидетельствует о наличии ее активности в клетках сублинии SC6-FF (рис. 3). Активность щелочной фосфатазы характерна для плюрипотентных клеток внутренней клеточной массы бластоцисты, из которой получают линии ЭСКч, и она исчезает на последующих стадиях ранней дифференцировки (Henderson et al., 2002). Таким образом, активность щелочной фосфатазы является характерным признаком плюрипотентных ЭСКч и используется в рутинной работе как быстрый и недорогой метод их идентификации (O'Connor et al., 2008). Тем не менее активность щелочной фосфатазы не является уникальным маркером плюрипотентности, так как она также выявляется во многих тканях взрослого организма и ассоциирована с клеточной дифференцировкой (McComb et al., 1979; Fedarco et al., 1990; Owen et al., 1990; Andracchi, Korte, 1991).

Определение плюрипотентного статуса полученной клеточной популяции проводили посредством иммунофлуоресцентной окраски антителами против антигенов Oct-4, SSEA-4 и TRA-1-60. Иммунофлуоресцентная окраска выявила наличие всех трех маркеров, характерных для плюрипотентных недифференцированных ЭСКч (рис. 4, а—г).

Одновременная идентификация перечисленных маркеров является неотъемлемым условием при определении статуса ЭСКч. SSEA-4 и TRA-1-60 представляют со-

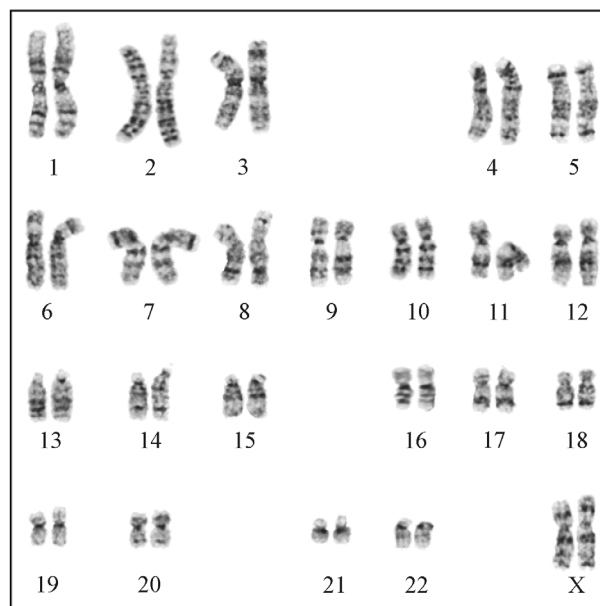


Рис. 2. Кариотип сублинии SC6-FF (46, XX).

бой поверхностные видоспецифичные маркеры ЭСКч. SSEA-4 является гликолипидом, а TRA-1-60 — одним из эпитопов протеогликана подоксалина, который в свою очередь входит в состав семейства сиаломуцинов CD34 и является компонентом специфического взаимодействия с селектином. Оба маркера впервые были обнаружены на поверхности клеток тератокарцином (Shevinsky et al., 1982; Kannaji et al., 1983; Schopperle et al., 2003), а позднее их наличие было показано и на ЭСКч (Thomson et al., 1998; Richards et al., 2003). Тем не менее их функциональная роль в ЭСКч неясна.

Исследования молекулярных механизмов, лежащих в основе регуляции процессов раннего развития и роли транскрипционного фактора Oct-4 в них, проводили многие авторы (Pesce, Scholer, 2001; Rodriguez et al., 2007). Кроме того, при получении индуцированных плюрипотентных стволовых клеток из соматических клеток показано, что индукция экспрессии этого гена играет ключевую роль в приобретении и поддержании клетками плюрипотентного статуса (Radzishenskaya, Silva, 2014). Но

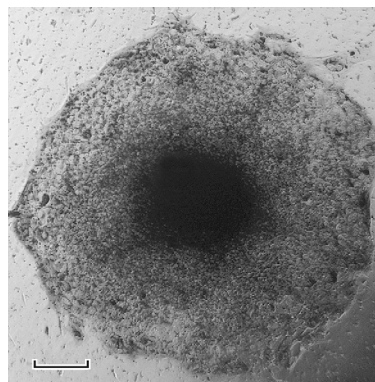


Рис. 3. Гистохимический анализ активности щелочной фосфатазы в недифференцированных клетках сублинии SC6-FF.

Темная окраска клеток свидетельствует о наличии активности щелочной фосфатазы. Масштабный отрезок — 200 мкм.

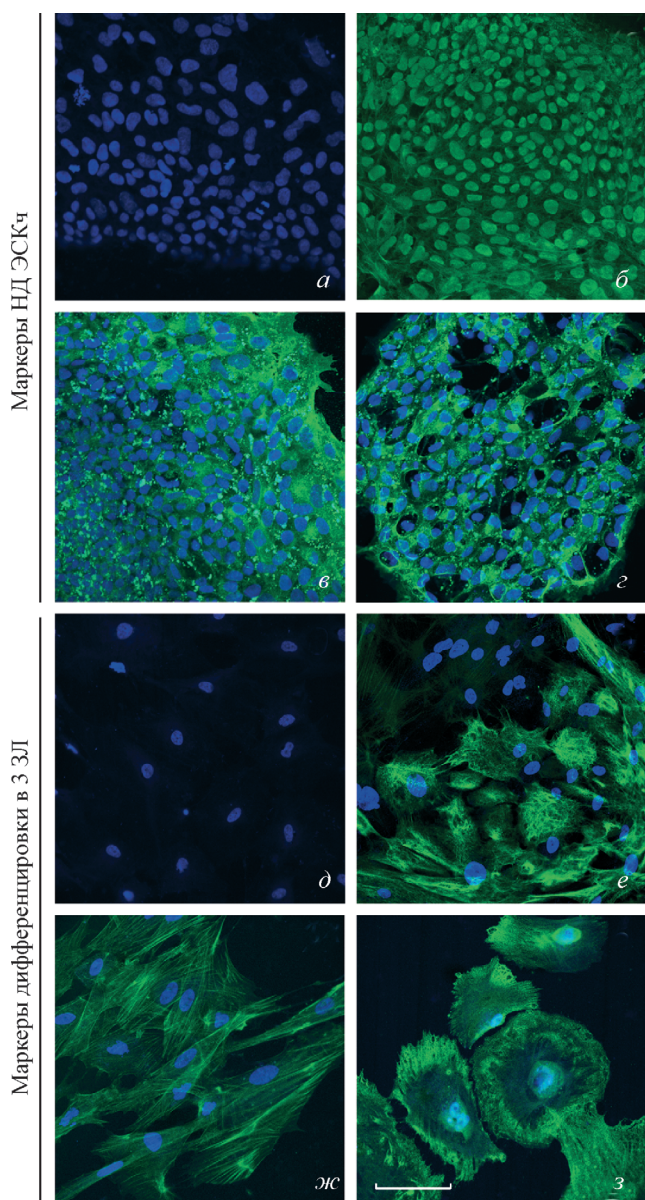


Рис. 4. Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии маркеров недифференцированных ЭСК и маркеров ранней дифференцировки в производные трех зародышевых листков. Флуоресцентное мечение моноклональными антителами.

a, d — контроль (вторые антитела); *б–г* — антитела против Oct-4, SSEA-4 и TRA-1-60 соответственно; *е–з* — антитела против нестина (маркер эктодермы), альфа-актинина (маркер мезодермы) и альфа-фетопротейна (маркер энтодермы) соответственно. Ядра окрашены DAPI. НД — недифференцированные, ЗЛ — зародышевые листки. Масштабный отрезок — 100 мкм.

кроме этого транскрипционного фактора, по-видимому, необходимо еще наличие дополнительных факторов — Sox-2, Klf-4 и c-Myc (Takahashi, Yamanaka, 2007) или Sox-2, Nanog и LIN28 (Yu et al., 2007). Стоит отметить, что в литературе все чаще появляются данные об экспрессии генов этих факторов в клетках, не являющихся плюрипотентными, например в мезенхимных стволовых клетках (МСК) (Rieske et al., 2005; Gang et al., 2007; He et al., 2013; Lou et al., 2014).

Экспрессия SSEA-4 также показана многими авторами для MSC. Есть данные о том, что ингибирование

SSEA-3 и SSEA-4 не влияет на плюрипотентные свойства ЭСКч (Brimble et al., 2007). С другой стороны, есть данные о том, что MSC, полученные из костного мозга и экспрессирующие SSEA-4, имеют более высокую пролиферативную активность, чем MSC, не экспрессирующие этого маркера (Gang et al., 2007). Пока данные по этому вопросу не систематизированы. Не всегда имеет место одновременная экспрессия в MSC всех антигенов, характерных для ЭСКч. Не отмечено четкой зависимости экспрессии этих маркеров от стадии онтогенеза, на которой находится источник получения линий MSC, которая показана в наших предыдущих работах, а также в проанализированных нами многочисленных литературных источниках (Кольцова и др., 2015). В настоящее время функциональная роль маркеров ЭСК для MSC неясна. Тем не менее на основании сравнительного анализа данных по экспрессии маркеров ЭСК и сопоставления их с рядом характерных свойств MSC разного происхождения выдвинуто предположение о том, что плюрипотентные маркеры могут способствовать повышенной пролиферативной активности и расширению мультипотентного потенциала MSC (Gang et al., 2007; Roubelakis et al., 2007; Riekstina et al., 2009; Wu et al., 2011).

Плюрипотентность определяется способностью к дифференцировке как во все типы соматических клеток, так и в линию половых клеток. Основным доказательством плюрипотентности является получение дифференцированных производных. Для ее подтверждения *in vitro* проводят индукцию ненаправленной дифференцировки с последующим выявлением маркеров, характерных для клеток-производных трех зародышевых листков. Ненаправленная дифференцировка клеток сублинии SC6-FF привела к появлению клеток, отличающихся по своим размерам и морфологии от клеток исходной популяции. Последующая иммунофлуоресцентная окраска позволила выявить в полученной популяции клетки, несущие маркеры, характерные для производных эктодермы (нестин), мезодермы (α -актинин) и энтодермы (α -фетопротейн) (рис. 4, *д–з*). Нестин представляет собой белок промежуточных филаментов и известен как маркер нейральных прогениторных клеток. При дифференцировке ЭСКч его экспрессия обнаруживается уже на 2–6-е сут после формирования эмбрионидных тел, преимущественно в клетках поверхностного эктодермального слоя (Wiese et al., 2004). Экспрессия эмбрионально-специфичного белка — α -фетопротейна — на самом раннем этапе эмбрионального развития имеет определенную динамику и характерна для клеток раннего кроветворения, имеющих первоначально энтодермальное происхождение (Gitlin, Voesman, 1966; Абелев, 1994). Использование кардиального α -актинина как маркера ранней мезодермальной дифференцировки ЭСКч является традиционным (Gepstein, 2002; Mummery et al., 2003) и определяется тем, что он является не только маркером поперечнополосатой мышечной ткани, но и маркером ранних стадий миогенеза, что было показано на эмбрионах мыши (Sasson et al., 1988).

Таким образом, на основании приведенных экспериментальных данных можно сделать вывод о том, что полученная сублиния ЭСКч — SC6-FF — по всем характеристикам соответствует плюрипотентным ЭСК. Бесфидерная система, ключевыми компонентами которой являются ВКМ и кондиционированная среда от клеток линии SC5-MSC, которую использовали в данной работе для получения сублинии ЭСКч SC6-FF, была успешно использована с этой целью и ранее, для получения сублиний

SC5-FF и SC7-FF. Это позволяет сделать вывод о ее универсальности и рекомендовать ее к использованию при бесфидерном культивировании и других линий ЭСКч.

Авторы выражают благодарность проф. Н. Н. Мамаеву и Т. Л. Гиндиной (С.-Петербургский медицинский университет им. И. П. Павлова) за возможность использования системы автоматического кариотипирования Ikaros 4 Karyotyping System (MetaSystems, ФРГ).

Список литературы

- Абелев Г. И. 1994. Альфа-фетопротеин: биология, биохимия, молекулярная генетика. Иммунология. 3 : 4—9. (Abellev G. I. 1994. Alfa-fetoprotein: biology, biochemistry, molecular biology. Immunology. 3 : 4—9.)
- Кольцова А. М., Воронкина И. В., Гордеева О. Ф., Зенин В. В., Лифанцева Н. В., Мусорина А. С., Смагина Л. В., Яковлева Т. К., Полянская Г. Г. 2012. Разработка новой бесфидерной системы и характеристика полученных в ней сублиний эмбриональных стволовых клеток человека при аутогенном и аллогенном культивировании. Цитология. 54 (8) : 637—651. (Koltsova A. M., Voronkina I. V., Gordeeva O. F., Zenin V. V., Lifantseva N. V., Musorina A. S., Smagina L. V., Yakovleva T. K., Poljanskaya G. G. 2012. Developing of a new feeder-free system and characterization of human embryonic stem cell sublines, derived in this system, under autogenic and allogenic culturing. Tsitologiya. 54 (8) : 637—651.)
- 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) : 1—15. (Kol'tsova A. M., Gordeeva O. F., Krylova T. A., Lifantseva N. V., Musorina A. S., Yakovleva T. K., Poljanskaya G. G. 2011. Comparative characteristics of new human embryonic stem cell lines SC5, SC6, SC7, and SC3a. Ontogenez. 42 (4) : 249—263.)
- 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.)
- Полянская Г. Г. 2014. Проблема нестабильности генома культивируемых стволовых клеток человека. Цитология. 56 (10) : 697—707. (Poljanskaya G. G. 2014. The problem of genomic instability of cultivated human stem cells. Tsitologiya. 56 (10) : 697—707.)
- Шаровская Ю. Ю., Лагарькова М. А., Киселев С. Л., Чайлахян Л. М. 2009. Исследование диффузионной связи через щелевые контакты в эмбриональных стволовых клетках человека в процессе спонтанной дифференцировки. Докл. РАН. 427 (3) : 407—410. (Sharovskaya Y. Y., Lagarkova M. A., Kiselev S. L., Chailakhyan L. M. 2009. Gap junctional intercellular communication in human embryonic stem cells during spontaneous differentiation. Dokl. Biol. Sci. 427 (3) : 407—410.)
- Abraham S., Riggs M. J., Nelson K., Lee V., Rao R. R. 2010. Characterization of human fibroblast-derived extracellular matrix components for human pluripotent stem cell propagation. Acta Biomater. 6 : 4622—4633.
- Amit M., Laevsky I., Miropolsky Y., Shariki K., Peri M., Itskovitz-Eldor J. 2011. Dynamic suspension culture for scalable expansion of undifferentiated human pluripotent stem cells. Nat. Protoc. 6 : 572—579.
- Amit M., Shariki C., Margulets V., Itskovitz-Eldor J. 2004. Feeder and serum free culture of human embryonic stem cells. Biol. Reprod. 70 : 837—845.
- Andracchi S., Korte G. E. 1991. Expression of plasma membrane alkaline phosphatase in normal and regenerating choriocapillaris in the rabbit. Acta. Anat. (Basel). 141 : 289—293.
- Baharvand H., Jafary H., Massumi M., Ashtiani S. K. 2006. Generation of insulin-secreting cells from human embryonic stem cells. Develop. Growth Differ. 48 : 323—332.
- Baharvand H., Larjani M. R., Yousefi M. 2012. Protocol for expansion of undifferentiated human embryonic and pluripotent stem cells in suspension. Methods Mol. Biol. 873 : 217—226.
- Beattie G. M., Lopez A. D., Bucay N., Hinton A., Firpo M. T., King C. C., Hayek A. 2005. Activin A maintains pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. Stem Cells. 23 : 489—495.
- Bose B., Shenoy S. P., Konda S., Wangikar P. 2012. Human embryonic stem cell differentiation into insulin secreting β -cells for diabetes. Cell Biol. Int. 36 : 1013—1020.
- Braam S. R., Zeinstra L., Litjens S., Ward-van Oostwaard D., van den Brink S., van Laake L., Lebrin F., Kats P., Hochstenbach R., Passier R., Sonnenberg A., Mummery C. L. 2008. Recombinant vitronectin is a functionally defined substrate that supports human embryonic stem cell self-renewal via alphavbeta5 integrin. Stem Cells. 26 : 2257—2265.
- Brimble S. N., Sherrer E. S., Uhl E. W., Wang E., Kelly S. 2007. The cell surface glycosphingolipids SSEA-3 and SSEA-4 are not essential for human ESC pluripotency. Stem Cells. 25 : 54—62.
- Cai H., Xia X., Wang L., Liu Y., He Z., Guo Q., Xu C. 2013. In vitro and in vivo differentiation of induced pluripotent stem cells into male germ cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 433 : 286—291.
- Cameron K., Lucendo-Villarin B., Szkolnicka D., Hay D. C. 2015. Serum-free directed differentiation of human embryonic stem cells to hepatocytes. Methods Mol. Biol. 1250 : 105—111.
- Carlson Scholz J. A., Garg R., Compton S. R., Allore H. G., Zeiss C. J., Uchio E. M. 2011. Polyomielitis in MuLV-infected ICR-SCID mice after injection of basement membrane matrix contaminated with lactate dehydrogenase-elevating virus. Comp. Med. 61 : 404—411.
- 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.
- 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. Methods Cell Biol. 86 : 15—28.
- Cobo F., Navarro J. M., Herrera M. I., Vervo L., Porcel D., Hernández C., Jurado M., García-Castro J., Menendez P. 2008. Electron microscopy reveals the presence of viruses in mouse embryonic fibroblasts but neither in human embryonic fibroblasts nor in human mesenchymal cells used for hESC maintenance: toward an implementation of microbiological quality assurance program in stem cell banks. Cloning Stem Cells. 10 : 65—74.
- Cox R. P., Krauss M. R., Balis M. E., Dancis J. 1972. Communication between normal and enzyme-deficient cells in tissue culture. Exp. Cell Res. 74 : 251—268.
- Davidson M. D., Ware B. R., Khetani S. R. 2015. Stem cell-derived liver cells for drug testing and disease modeling. Discov. Med. 19 : 349—358.
- Devalla H. D., Schwach V., Ford J. W., Milnes J. T., El-Haou S., Jackson C., Gkatzis K., Elliott D. A., Chuva de Sousa Lopes S. M., Mummery C. L., Verkerk A. O., Passier R. 2015. Atrial-like cardiomyocytes from human pluripotent stem cells are a robust preclinical model for assessing atrial-selective pharmacology. EMBO Mol. Med. 7 : 394—410.
- Duggal G., Heindryckx B., Warrier S., O'Leary T., Van der Jeught M., Lierman S., Vossaert L., Deroo T., Deforce D., Chuva de Sousa Lopes S. M., De Sutter P. 2013. Influence of activin A supplementation during human embryonic stem cell derivation on germ cell differentiation potential. Stem Cells Develop. 22 : 3141—3155.
- Fedarko N. S., Bianco P., Vetter U., Robey P. G. 1990. Human bone cell enzyme expression and cellular heterogeneity: correlation

- of alkaline phosphatase enzyme activity with cell cycle. *J. Cell. Physiol.* 144 : 115—121.
- Fu X., Toh W. S., Liu H., Lu K., Li M., Cao T. 2011. Establishment of clinically compliant human embryonic stem cells in an autologous feeder-free system. *Tissue Eng. Part C Methods.* 17 : 927—937.
- Furue M. K., Na J., Jackson J. P., Okamoto T., Jones M., Baker D., Hata R., Moore H. D., Sato J. D., Andrews P. W. 2008. Heparin promotes the growth of human embryonic stem cells in a defined serum-free medium. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 105 : 13 409—13 414.
- Gang Eun J., Bosnakovski D., Figueiredo C. A., Visser Jan W., Perlingeiro Rita C. 2007. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood.* 109 : 1743—1751.
- Gepstein L. 2002. Derivation and potential applications of human embryonic stem cells. *Circ. Res.* 15 : 866—876.
- Gerecht S., Burdick J. A., Ferreira L. S., Townsend S. A., Langer R., Vunjak-Novakovic G. 2007. Hyaluronic acid hydrogel for controlled self-renewal and differentiation of human embryonic stem cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 104 : 11 298—11 303.
- Gitlin D., Boesman M. 1966. Serum alpha-fetoprotein, albumin, and gamma-G-globulin in the human conceptus. *J. Clin. Invest.* 45 : 1826—1838.
- Greenlee A. R., Kronenwetter-Koepel T. A., Kaiser S. J., Ellis T. M., Liu K. 2004. Combined effects of Matrigel and growth factors on maintaining undifferentiated murine embryonic stem cells for embryotoxicity testing. *Toxicol In Vitro.* 18 : 543—553.
- Hayashi Y., Chan T., Warashina M., Fukuda M., Ariizumi T., Okabayashi K., Takayama N., Otsu M., Eto K., Furue M. K., Michiue T., Ohnuma K., Nakauchi H., Asashima M. 2010. Reduction of N-glycolylneuraminic acid in human induced pluripotent stem cells generated or cultured under feeder- and serum-free defined conditions. *PLoS ONE.* 5 : e14099.
- He H., Nagamura-Inoue T., Tsunoda H., Yuzawa M., Yamamoto Y., Yorozu P., Agata H., Tojo A. 2014. Stage-specific embryonic antigen 4 in Wharton's Jelly-Derived mesenchymal stem cells is not a marker for proliferation and multipotency. *Tissue Eng.* 20 : 1314—1324.
- Heiskanen A., Satomaa T., Tiitinen S., Laitinen A., Mannekin S., Impola U., Mikkola M., Olsson C., Miller-Podraza H., Blomqvist M., Olonen A., Salo H., Lehenkari P., Tuuri T., Otonkoski T., Natunen J., Saarinen J., Laine J. 2006. N-glycolylneuraminic acid xenoantigen contamination of human embryonic and mesenchymal stem cells is substantially reversible. *Stem Cells.* 25 : 197—202.
- Henderson J. K., Draper J. S., Baillie H. S., Fishel S., Thomson J. A., Moore H., Andrews P. W. 2002. Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells.* 20 : 329—337.
- Higuchi A., Ling Q. D., Ko Y. A., Chang Y., Umezawa A. 2011. Biomaterials for the feeder-free culture of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Chem. Rev.* 111 : 3021—3035.
- Hooper M. L., Subak-Sharpe J. H. 1981. Metabolic cooperation between cells. *Int. Rev. Cytol.* 69 : 45—104.
- 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.
- Hughes C. S., Radan L., Betts D., Postovit L. M., Lajoie G. A. 2011. Proteomic analysis of extracellular matrices used in stem cell culture. *Proteomics.* 11 : 3983—3991.
- Ilic D., Stephenson E., Wood V., Jacquet L., Stevenson D., Petrova A., Kadeva N., Codognotto S., Patel H., Semple M., Cornwell G., Ogilvie C., Braude P. 2012. Derivation and feeder-free propagation of human embryonic stem cells under xeno-free conditions. *Cytotherapy.* 14 : 122—128.
- Jang M., Lee S. T., Kim J. W., Yang J. H., Yoon J. K., Park J. C., Ryoo H. M., van der Vlies A. J., Ahn J. Y., Hubbell J. A., Song Y. S., Lee G., Lim J. M. 2013. A feeder-free, defined three-dimensional polyethylene glycol-based extracellular matrix niche for culture of human embryonic stem cells. *Biomaterials.* 34 : 3571—3580.
- Jez M., Ambady S., Kashpur O., Grella A., Malcuit C., Vilner L., Rozman P., Dominko T. 2014. Expression and differentiation between OCT4A and its pseudogenes in human ESCs and differentiated adult somatic cells. *PLoS ONE.* 9 : e89546.
- Jones M. B., Chu C. H., Pendleton J. C., Betenbaugh M. J., Shiloach J., Baljinnyam B., Rubin J. S., Shambloott M. J. 2010. Proliferation and pluripotency of human embryonic stem cells maintained on type I collagen. *Stem Cells Develop.* 19 : 1923—1935.
- Kannagi R., Cochran N. A., Ishigami F., Hakomori S., Andrews P. W., Knowles B. B., Solter D. 1983. Stage-specific embryonic antigens (SSEA-3 and -4) are epitopes of a unique globo-series ganglioside isolated from human teratocarcinoma cells. *EMBO J.* 2 : 2355—2361.
- Klim J. R., Li L., Wrighton P. J., Piekarczyk M. S., Kiesling L. L. 2010. A defined glycosaminoglycan-binding substratum for human pluripotent stem cells. *Nat. Methods.* 7 : 989—994.
- Klimanskaya I., Chung Y., Meisner L., Johnson J., West M. D., Lanza R. 2005. Human embryonic stem cells derived without feeder cells. *Lancet.* 365 : 1636—1641.
- Kolhar P., Kotamraju V. R., Hikita S. T., Clegg D. O., Ruoslahti E. 2010. Synthetic surfaces for human embryonic stem cell culture. *J. Biotechnol.* 146 : 143—146.
- 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.
- Lei I. L., Bu L., Wang Z. 2015. Derivation of cardiac progenitor cells from embryonic stem cells. *J. Vis. Exp.* 95 : 52047. doi: 10.3791/52047.
- Li J., Bardy J., Yap L. Y., Chen A., Nurcombe V., Cool S. M., Oh S. K., Birch W. R. 2010. Impact of vitronectin concentration and surface properties on the stable propagation of human embryonic stem cells. *Biointerphases.* 5 : 132—142.
- Lou Y., Wang P., Yehb Sh., Chuangb P., Lib Sh., Wub Ch., Khoof K., Hsiaoob M., Hsub T., Wongb Ch. 2014. Stage-specific embryonic antigen-4 as a potential therapeutic target in glioblastoma multiforme and other cancers. *PNAS.* 111 : 2482—2487.
- Mahlstedt M. M., Anderson D., Sharp J. S., McGilvray R., Muñoz M. D., Buttery L. D., Alexander M. R., Rose F. R., Denning C. 2010. Maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells cultured on a synthetic substrate in conditioned medium. *Biotechnol. Bioeng.* 105 : 130—140.
- 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.
- McComb R. B., Bowers G. N., Posen S. 1979. Alkaline phosphatase. New York; London: Plenum Press. 986 p.
- Melkoulman Z., Weber J. L., Weber D. M., Fadeev A. G., Zhou Y., Dolley-Sonneville P., Yang J., Qiu L., Priest C. A., Shogbon C., Martin A. W., Nelson J., West P., Beltzer J. P., Pal S., Brandenberger R. 2010. Synthetic peptide-acrylate surfaces for long-term self-renewal and cardiomyocyte differentiation of human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 28 : 606—610.
- Meng G., Liu S., Rancourt D. E. 2012. Synergistic effect of medium, matrix, and exogenous factors on the adhesion and growth of human pluripotent stem cells under defined, xeno-free conditions. *Stem Cells Develop.* 21 : 2036—2048.
- Meng Y., Eshghi S., Li Y. J., Schmidt R., Schaffer D. V., Healy K. E. 2010. Characterization of integrin engagement during defined human embryonic stem cell culture. *FASEB J.* 24 : 1056—1065.
- Miki T., Ring A., Gerlach J. 2011. Hepatic differentiation of human embryonic stem cells is promoted by three-dimensional dynamic perfusion culture conditions. *Tissue Eng. Part C Methods.* 17 : 557—568.
- Montes R., Liger G., Sanchez L., Catalina P., de la Cueva T., Nieto A., Melen G. J., Rubio R., Garcia-Castro J., Bueno C., Menendez P. 2009. Feeder-free maintenance of hESCs in mesenchy-

mal stem cell-conditioned media: distinct requirements for TGF-beta and IGF-II. *Cell Res.* 19 : 698—709.

Mummery C., Ward-van Oostwaard D., Doevendans P., Spijker R., van den Brink S., Hassink R., van der Heyden M., Opthof T., Pera M., de la Riviere A. B., Passier R., Tertoolen L. 2003. Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation.* 107 : 2733—2740.

Nagaoka M., Si-Tayeb K., Akaike T., Duncan S.A. 2010. Culture of human pluripotent stem cells using completely defined conditions on a recombinant E-cadherin substratum. *BMC Develop. Biol.* 10 : 60.

Nandivada H., Villa-Diaz L. G., O'Shea K. S., Smith G. D., Krebsbach P. H., Lahann J. 2011. Fabrication of synthetic polymer coatings and their use in feeder-free culture of human embryonic stem cells. *Nat. Protoc.* 6 : 1037—1043.

Narayanan K., Lim V. Y., Shen J., Tan Z. W., Rajendran D., Luo S. C., Gao S., Wan A. C., Ying J. Y. 2014. Extracellular matrix-mediated differentiation of human embryonic stem cells: differentiation to insulin-secreting beta cells. *Tissue Eng. Part A.* 20 : 424—433.

Noaksson K., Zoric N., Zeng X., Rao M. S., Hyllner J., Semb H., Kubista M., Sartipy P. 2005. Monitoring differentiation of human embryonic stem cells using real-time PCR. *Stem Cells.* 23 : 1460—1467.

O'Connor M. D., Kardel M. D., Iosfina I., Youssef D., Lu M., Li M. M., Vercauteren S., Nagy A., Eaves C. J. 2008. Alkaline phosphatase-positive colony formation is a sensitive, specific, and quantitative indicator of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 26 : 1109—1116.

Otsuji T. G., Bin J., Yoshimura A., Tomura M., Tateyama D., Minami I., Yoshikawa Y., Aiba K., Heuser J. E., Nishino T., Hasegawa K., Nakatsuji N. 2014. A 3D sphere culture system containing functional polymers for large-scale human pluripotent stem cell production. *Stem Cell Reports.* 2 : 734—745.

Owen T. A., Aronow M., Shalhoub V., Barone L. M., Wilming L., Tassinari M. S., Kennedy M. B., Pockwinse S., Lian J. B., Stein G. S. 1990. Progressive development of the rat osteoblast phenotype *in vitro*: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J. Cell. Physiol.* 143 : 420—430.

Ozkinay C., Mitelman F. 1979. A simple trypsin-Giemsa technique producing simultaneous G- and C-banding in human chromosomes. *Hereditas.* 90 : 1—4.

Pal R., Mamidi M. K., Das A. K., Bhonde R. 2013. Comparative analysis of cardiomyocyte differentiation from human embryonic stem cells under 3-D and 2-D culture conditions. *J. Biosci. Biotech.* 115 : 200—206.

Park J. H., Kim S. J., Oh E. J., Moon S. Y., Roh S. I., Kim C. G., Yoon H. S. 2003. Establishment and maintenance of human embryonic stem cells on STO, a permanently growing cell line. *Biol. Reprod.* 69 : 2007—2014.

Pesce M., Schöler H. R. 2001. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells.* 19 : 271—278.

Radzishheuskaya A., Silva J. C. R. 2014. Do all roads lead to Oct4? The emerging concepts of induced pluripotency. *Trends Cell Biol.* 24 : 275—284.

Richards M., Tan S., Fong C. Y., Biswas A., Chan W. K., Bongso A. 2003. Comparative evaluation of various human feeders for prolonged undifferentiated growth of human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 21 : 546—556.

Riekstina U., Cakstina I., Parfejevs V., Hoogduijn M., Jankovskis G., Muiznieks I., Muceniece 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.

Rieske P., Krynska B., Azizi S. A. 2005. Human fibroblast-derived cell lines have characteristics of embryonic stem cells and cells of neuro-ectodermal origin. *Differentiation.* 73 : 474—483.

Rodriguez R. T., Velkey J. M., Lutzko C., Seerke R., Kohn D. B., O'Shea K. S., Firpo M. T. 2007. Manipulation of

OCT4 levels in human embryonic stem cells results in induction of differential cell types. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 232 : 1368—1380.

Rosler E. S., 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.

Roubelakis M. G., Pappa K. I., Bitsika V., Zagoura D., Vlahou A., Papadaki H. A., Antsaklis A., Anagnostou 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.

Sánchez L., Gutierrez-Aranda I., Ligerio G., Martín M., Aylón V., Real P. J., Ramos-Mejía V., Bueno C., Menendez P. 2012. Maintenance of human embryonic stem cells in media conditioned by human mesenchymal stem cells obviates the requirement of exogenous basic fibroblast growth factor supplementation. *Tissue Eng. Part C Methods.* 18 : 387—396.

Sassoon D. A., Garner I., Buckingham M. 1988. Transcripts of alpha-cardiac and alpha-skeletal actins are early markers for myogenesis in the mouse embryo. *Development.* 104 : 155—164.

Schopperle W. M., Kershaw D. B., DeWolf W. C. 2003. Human embryonal carcinoma tumor antigen, Gp200/GCTM-2, is podocalyxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300 : 285—290.

Shaffer I. G., Slovak M. L., Campbell L. J. (eds). 2009. An international system for human cytogenetic nomenclature. Basel: S. Karger. 138 p.

Shevinsky L. H., Knowles B. B., Damjanov I., Solter D. 1982. Monoclonal antibody to murine embryos defines a stage-specific embryonic antigen expressed on mouse embryos and human teratocarcinoma cells. *Cell.* 30 : 697—705.

Stacey G. N., Cobo F., Nieto A., Talavera P., Healy L., Concha A. 2006. The development of «feeder» cells for the preparation of clinical grade hES cell lines: challenges and solutions. *J. Biotechnol.* 125 : 583—588.

Steiner D., Khaner H., Cohen M., Even-Ram S., Gil Y., Itsykson P., Turetsky T., Idelson M., Aizenman E., Ram R., Berman-Zaken Y., Reubinoff B. 2010. Derivation, propagation and controlled differentiation of human embryonic stem cells in suspension. *Nat. Biotechnol.* 28 : 361—366.

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.

Sundberg M., Andersson P. H., Akesson E., Odeberg J., Holmberg L., Inzunza J., Falci S., Öhman J., Suuronen R., Skottman H., Lehtimäki K., Hovatta O., Narkilahti S., Sundström E. 2011. Markers of pluripotency and differentiation in human neural precursor cells derived from embryonic stem cells and CNS tissue. *Cell Transplant.* 20 : 177—191.

Szkolnicka D., Farnworth S. L., Lucendo-Villarín B., Hay D. C. 2014. Deriving functional hepatocytes from pluripotent stem cells. *Curr. Protoc. Stem Cell Biol.* 30 : 1G.5.1—1G.5.12.

Takahashi K., Yamanaka S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 131 : 861—872.

Thomson J. A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S. S., Waknitz M. A., Swiergiel J. J., Marshall V. S., Jones J. M. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 282 : 1145—1147.

Tsai Z. Y., Singh S., Yu S. L., Chou C. H., Li S. S. 2010. A feeder-free culture using autogenic conditioned medium for undifferentiated growth of human embryonic stem cells: comparative expression profiles of mRNAs, microRNAs and proteins among different feeders and conditioned media. *BMC Cell Biol.* 11 : 76.

Valamehr B., Tsutsui H., Ho C. M., Wu H. 2011. Developing defined culture systems for human pluripotent stem cells. *Regen. Med.* 6 : 623—634.

Villa-Diaz L. G., Nandivada H., Ding J., Nogueira-de-Souza N. C., Krebsbach P. H., O'Shea K. S., Lahann J., Smith G. D. 2010. Synthetic polymer coatings for long-term growth of human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 28 : 581—583.

Wang G., Zhang H., Zhao Y., Li J., Cai J., Wang P., Meng S., Feng J., Miao C., Ding M., Li D., Deng H. 2005. Noggin and bFGF cooperate to maintain the pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330 : 934—942.

Wang Q., Liu X., Tang N., Archambeault D. R., Li J., Song H., Tang C., He B., Matzuk M. M., Wang Y. 2013. GASZ promotes germ cell derivation from embryonic stem cells. *Stem Cell Res.* 11 : 845—860.

Wiese C., Rolletschek A., Kania G., Blyszczuk P., Tarasov K. V., Tarasova Y., Wersto R. P., Boheler K. R., Wobus A. M. 2004. Nestin expression — a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol. Life Sci.* 61 : 2510—2522.

Xu C., Inokuma M. S., Denham J., Golds K., Kundu P., Gold J. D., Carpenter M. K. 2001. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 19 : 971—974.

Xu C., Rosler E., Jiang J., Lebkowski J. S., Gold J. D., O'Sullivan C., Delavan-Boorsma K., Mok M., Bronstein A., Carpenter M. K. 2005. Basic fibroblast growth factor supports undifferen-

tiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium. *Stem Cells.* 23 : 315—323.

Yu J., Vodyanik M. A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J. L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G. A., Ruotti V., Stewart R., Slukvin I. I., Thomson J. A. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science.* 318 : 1917—1920.

Zeltner N., Lafaille F. G., Fattahi F., Studer L. 2014. Feeder-free derivation of neural crest progenitor cells from human pluripotent stem cells. *J. Vis. Exp.* 87. doi : 10.3791/51609.

Zhang K., Cai Z., Li Y., Shu J., Pan L., Wan F., Li H., Huang X., He C., Liu Y., Cui X., Xu Y., Gao Y., Wu L., Cao S., Li L. 2011. Utilization of human amniotic mesenchymal cells as feeder layers to sustain propagation of human embryonic stem cells in the undifferentiated state. *Cell Reprogram.* 13 : 281—288.

Zhang P., Xia N., Reijo Pera R. A. 2014. Directed dopaminergic neuron differentiation from human pluripotent stem cells. *J. Vis. Exp.* 15 : 51737. doi: 10.3791/51737.

Поступила 22 III 2016

DERIVATION AND CHARACTERISTICS OF THE NEW SUBLINE OF HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS SC6-FF IN ALLOGENIC FEEDER-FREE CULTURE SYSTEM

A. M. Koltsova, T. K. Yakovleva, G. G. Poljanskaya¹

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;

¹ e-mail: poljansk@incras.ru

A new human embryonic stem cell subline SC6-FF has been derived from SC6 cells in allogenic feeder-free culture system. Extracellular matrix proteins and conditioned medium from mesenchymal stem cell line SC6-MSK were the key components of the feeder-free culture system that therefore was allogenic for SC6-FF cells. SC6-FF subline has underwent more than 100 cell population doublings and retained normal diploid human karyotype: 46, XX. The average doubling time of the cell population was 23.7 ± 0.8 h that does not differ from that for the parent SC6 line. The presence of undifferentiated hESCs markers, alkaline phosphatase activity, Oct-4, SSEA-4 and TRA-1-60, has been verified by histochemical and immunofluorescence analysis. Non-directional differentiation of SC6-FF subline has led to development of cells that differ in size and morphology from the cells in the parent population. These cells demonstrate the ability of differentiation in the derivatives of three germ layers by expressing the characteristic markers of the ectoderm (alpha-fetoprotein), mesoderm (a-actinin) and endoderm (a-fetoprotein) cells. We can conclude that the obtained characteristics of the new feeder-free SC6-FF sub-line correspond to the status of the human embryonic stem cells.

Key words: a feeder-free culture system, human embryonic stem cells, marker expression, differentiation, karyotype.