

КОЛЬЦОВА

Анна Михайловна

**ПОЛУЧЕНИЕ ПОСТОЯННЫХ ЛИНИЙ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА И СРАВНЕНИЕ ИХ
ХАРАКТЕРИСТИК ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В РАЗНЫХ СИСТЕМАХ**

03.03.04.– Клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2012

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Научный руководитель:

доктор биологических наук
Полянская Галина Георгиевна
Институт цитологии РАН,
Санкт-Петербург

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор
Михельсон Виктор Михайлович
Институт цитологии РАН,
Санкт-Петербург

доктор биологических наук
Васильев Андрей Валентинович
Институт биологии развития им Н.К. Кольцова,
Москва

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
профессионального образования
«Санкт-Петербургский государственный
университет», Биолого-почвенный факультет,
Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится «...» января 2013 года в «...» часов на заседании
Диссертационного совета Д 002.230.01 на базе Института цитологии РАН по адресу: 194064,
Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4.

Адрес электронной почты Института: cellbio@mail.cytspb.rssi.ru

Сайт: <http://www.cytspb.rssi.ru>

Факс: 8 (812) 297-35-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН

Автореферат разослан « » декабря 2012 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Е.В.Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), выделенные из ранних эмбрионов млекопитающих, включая человека, на стадии не позднее бластоцисты, являются носителями информации развития всего организма в онтогенезе. ЭСК являются уникальными плюрипотентными клеточными популяциями. К основным свойствам ЭСК относятся способность к самообновлению, т.е. к неограниченной пролиферации и одновременно способность к дифференцировке 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.

Впервые постоянные линии ЭСК человека были получены в 1998 году (Thomson et al., 1998). В настоящее время в разных странах мира имеется несколько сотен постоянных линий ЭСК человека. Несмотря на то, что все линии обладают рядом общих свойств, каждая из них уникальна, что определяется как генетической индивидуальностью, так и условиями культивирования. Многими авторами показано существование межлинейных различий, связанных с их иммунным и эпигенетическим профилем, экспрессией отдельных генов и, в частности, генов, ответственных за разные направления дифференцировки, с морфологией колоний и скоростью роста (Drukker et al., 2002; Abeyta et al., 2004; Lagarkova et al., 2006; Allegrucci, Young, 2007; Tavakoli et al., 2009). Поэтому работы по увеличению количества новых линий ЭСК человека с индивидуальной вариабельностью позволят расширить базу для широкомасштабных фундаментальных и биомедицинских исследований.

Для успешного получения и длительной пролиферации ЭСК человека, в отличие от большинства других клеток, широко используют культивирование ЭСК на слое фидерных клеток. Однако любой ксеногенный или аллогенный фидер не исключает риска контаминации для ЭСК (Martin et al., 2005; Cobo et al., 2008; Kubikova et al., 2009). Поэтому преимущество при культивировании линий ЭСК имеют аутогенные фидерные клетки человека (Fu et al., 2010; Lee et al., 2012). Тем не менее, при любом фидерном культивировании имеются 2 динамичные живые системы, каждая из которых зависит от условий культивирования, включающих широкий спектр факторов. Таким образом, условия, созданные для ЭСК *in vitro*, менее стабильны, чем для других клеток, культивируемых на постоянном субстрате. Это может способствовать изменчивости клеточных линий ЭСК при длительном культивировании.

В связи с этим одной из важных задач, связанных с использованием ЭСК человека в фундаментальных и прикладных исследованиях, является освобождение их от сопутствующих фидерных клеток, т.е. разработка бесфидерных систем культивирования, которые состоят из двух основных компонентов: субстрата и ростовой среды. Подбор оптимальных субстратов для бесфидерного культивирования основан, главным образом, на взаимодействии белков внеклеточного матрикса (ВКМ) с интегринами, экспрессируемыми ЭСК в определенных ростовых средах. В настоящее время наиболее часто используют следующие субстраты: Матригель (Xu et al., 2001); отдельные белки ВКМ – ламинин, фибронектин, коллаген, витронектин (Amit et al., 2004; Braam et al., 2008; Miyazaki et al., 2008; Jones et al., 2010); искусственно синтезируемые пептиды (Kolhar et al., 2010); синтетические субстраты (Nandivada et al., 2011); белки ВКМ, синтезированные фидерными клетками (Klimanskaya et al., 2005; Ilic et al., 2012). Для успешного культивирования ЭСК человека на бесфидерных субстратах необходим подбор ростовой среды, оптимальной для данного субстрата.

В настоящее время не получено унифицированной оптимальной бесфидерной системы культивирования, способной поддерживать рост любых линий ЭСК человека, являющейся стабильной по своим характеристикам и исключающей риск ксеногенной или аллогенной контаминации. Каждая система обладает определенными недостатками. В связи с этим работы по оптимизации систем культивирования ЭСК человека до сих пор являются актуальными. Возможно, что исходя из генетической уникальности каждой клеточной линии ЭСК, помимо оптимизации условий культивирования в целом для ЭСК человека, необходим индивидуальный подход, связанный с применением некоторых методических модификаций.

Учитывая перспективность линий ЭСК для фундаментальных и прикладных биологических и биомедицинских исследований, и принимая во внимание данные литературы о разнообразии линий ЭСК человека, связанные с их генетической индивидуальностью и условиями культивирования, представлялось существенным получить и охарактеризовать ряд новых постоянных линий ЭСК человека в разных системах культивирования.

Цели и задачи исследования

Цель настоящей работы – получение постоянных линий эмбриональных стволовых клеток человека и сравнение их характеристик при культивировании в разных системах.

Задачи работы: 1. Выделение внутренней клеточной массы из предимплантационных бластоцист.

2. Длительное культивирование внутренней клеточной массы в фидерной системе с целью получения постоянных линий ЭСК человека.
3. Характеристика полученных линий ЭСК человека.
4. Разработка бесфидерной системы культивирования ЭСК человека:
 - а) дифференцировка линии ЭСК в мезенхимном направлении с целью получения аутогенного субстрата для дальнейшего культивирования ЭСК;
 - б) подбор состава среды для бесфидерного культивирования;
 - в) разработка метода получения субстрата для бесфидерного культивирования ЭСК и характеристика полученного субстрата.
5. Длительное культивирование ранее полученных линий ЭСК в бесфидерной системе с целью получения постоянных сублиний.
6. Характеристика новых сублиний ЭСК человека.
7. Сравнительный анализ свойств полученных линий ЭСК, культивируемых в разных системах.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Три новые линии ЭСК – SC5, SC6 и SC7, полученные в фидерной системе культивирования, полностью соответствуют статусу плюрипотентных стволовых клеток человека.
2. Поддержание стабильной системы культивирования является необходимым условием в работе с линиями ЭСК человека. Нарушение условий культивирования может привести к изменениям основных свойств ЭСК, вплоть до их потери.
3. Полученная из линии SC5 неиммортилизованная линия фибробластоподобных клеток – SC5-MSC по своему фенотипу и способности к дифференцировке соответствует мезенхимным стволовым клеткам. Эта линия была использована в качестве продуцента компонентов ВКМ и ростовых факторов, необходимых для культивирования ЭСК.
4. Длительное культивирование линий SC5 и SC7 в разработанной новой бесфидерной системе, созданной на основе клеток линии SC5-MSC, позволило получить сублинии SC5-FF и SC7-FF, полностью соответствующие статусу плюрипотентных стволовых клеток человека.
5. Возможность создания не только аутогенной системы культивирования (SC5-FF) ЭСК человека, но и аллогенной (SC7-FF), свидетельствует об универсальности разработанной новой системы бесфидерного культивирования.
6. Сравнительный анализ основных характеристик линий ЭСК, культивируемых в фидерной системе, и их сублиний, полученных в бесфидерной системе, показал их сходство. Это свидетельствует о том, что разработанная бесфидерная система культивирования, которая гораздо

стабильнее любой фидерной системы, может быть рекомендована для фундаментальных, биомедицинских и фармакологических исследований.

Научная новизна работы

Получены три новые линии плюрипотентных ЭСК человека, каждая из которых обладает стабильным нормальным кариотипом, способна к неограниченной пролиферации *in vitro*, дифференцировке в производные трех зародышевых листков и в линию половых клеток. Несмотря на то, что все линии обладают свойствами, общими для ЭСК человека, каждая из них является генетически уникальной, что позволяет расширить базу для дальнейших широкомасштабных фундаментальных и прикладных биомедицинских исследований.

Методом ненаправленной индуцированной дифференцировки из линии SC5 была получена новая неиммортилизованная линия мезенхимных стволовых клеток SC5-MSC. Полученная линия может быть использована для фундаментальных исследований в области клеточной и молекулярной биологии, для прикладных исследований в регенеративной медицине, фармакологии и токсикологии, а также в качестве фидера для ЭСК человека, клеток-продуцентов ростовых факторов и компонентов ВКМ, способных поддерживать рост недифференцированных ЭСК человека.

На основе полученной линии SC5-MSC была создана новая бесфидерная система культивирования ЭСК. Разработана методика получения субстрата, оптимального для дальнейшего культивирования на нем ЭСК, а также подобран состав ростовой среды. Частичное использование кондиционированной среды от клеток линии SC5-MSC позволило максимально снизить количество дополнительных ростовых факторов, вносимых извне, необходимых для поддержания ЭСК в отсутствие фидерных клеток.

В разработанной бесфидерной системе были получены 2 новые сублинии SC5-FF и SC7-FF, обладающие всеми свойствами эмбриональных стволовых клеток человека и характеризующиеся нормальным кариотипом человека. Сравнение свойств сублиний, полученных в бесфидерной системе культивирования, со свойствами клеточных линий, из которых они были получены, не показало принципиальных различий, что подтверждает способность разработанной новой системы длительно поддерживать ЭСК в культуре без изменения их статуса.

Теоретическое и практическое значение работы

Полученные новые линии ЭСК человека представляют собой уникальный клеточный материал. Каждая линия генетически индивидуальна и обладает всеми свойствами плюрипотентных ЭСК человека. Полученные линии могут

быть основой для широкомасштабных фундаментальных исследований в разных областях молекулярной и клеточной биологии, а также для решения прикладных задач регенеративной медицины и фармакологии. Так, полученные линии SC5 и SC7 были использованы нами в работе по исследованию характера экспрессии раково-тестикулярных антигенов. Определение характера экспрессии раково-тестикулярных антигенов в ЭСК, в их дифференцированных дериватах и в раковых клеточных линиях может быть полезным для изоляции аномально экспрессирующих эти антигены клеток, способствующей повышению уровня безопасности при использовании ЭСК в клеточной терапии.

Получение различных типов клеток человека с помощью дифференцировки ЭСК не сопровождается инвазивными процедурами, часто являющимися необходимым условием получения клеточных линий. Так, методом ненаправленной индуцированной дифференцировки из линии SC5 была получена линия фибробластоподобных клеток (SC5-MSC), обладающая фенотипом и способностью к мультипотентной дифференцировке, характерными для мезенхимных стволовых клеток (МСК). Линия SC5-MSC является источником большого количества генетически однородного клеточного материала, необходимого для проведения разнообразных исследований. Полученные характеристики свидетельствуют о широких возможностях этой линии для использования в регенеративной медицине. Эта линия будет введена в фонды Коллекции культур клеток позвоночных ИНЦ РАН с целью выдачи клеточных образцов по заявкам разных учреждений РФ и стран СНГ.

Использование бесфидерной системы позволило создать более стандартизированные и стабильные условия для культивирования ЭСК. Разработанные принципы бесфидерного культивирования могут быть использованы другими исследователями, работающими с линиями ЭСК.

Полученные в работе экспериментальные результаты используются в курсе лекций «Клеточная биотехнология» для магистров первого курса СПбГТУ.

Апробация работы

По теме диссертации опубликовано 17 печатных работ, в том числе 6 статей и 11 тезисов. Материалы диссертации были представлены на 10-й Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей «Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2007 г.), Школе-конференции для молодых ученых «Методы культивирования клеток» (Санкт-Петербург, 2008 г.), Всероссийском симпозиуме по биологии клетки в культуре «Культивируемые клетки как основа клеточных технологий» (Санкт-Петербург, 2009 г.), Всероссийской научной школе-конференции для молодежи

«Аутологичные стволовые клетки: экспериментальные и клинические исследования» (Москва, 2009 г.), Всероссийской научной школе-конференции «Стволовые клетки и регенеративная медицина» (Москва, 2010 г.), Всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (Санкт-Петербург, 2010 г.), конференции «Биология стволовых клеток: фундаментальные аспекты» (Москва, 2011 г.), IV Всероссийском с международным участием конгрессе студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз – Россия 2011» (Воронеж, 2011 г.), 3-й конференции молодых ученых ИИЦ РАН (Санкт-Петербург, 2012 г.), 2-й всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (Санкт-Петербург, 2012) и на научных семинарах отдела клеточных культур Института цитологии РАН. Диссертационная работа апробирована на научном семинаре Отдела клеточных культур Института цитологии РАН 27 июня 2012.

Личный вклад автора

Все экспериментальные процедуры, описанные в работе, были проведены автором лично. Структурный кариотипический анализ проводили совместно с Т.К. Яковлевой. Анализ проб на проточном цитофлуориметре осуществлял В.В.Зенин. Анализ экспрессии генов методом ПЦР и дифференцировку ЭСК *in vivo* проводили совместно с О.Ф. Гордеевой и Н.В. Лифанцевой. Анализ белков ВКМ методом электрофореза осуществляли совместно с И.В. Воронкиной и Л.В. Смагиной. Во всех совместных работах вклад автора был определяющим. Обсуждение и написание статей проводили совместно с соавторами и научным руководителем диссертации.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего ссылки. Диссертация изложена на 144 страницах. Иллюстративный материал содержит 1 схему, 28 рисунков и 4 таблицы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Выделение внутренней клеточной массы из предимплантационных бластоцист. Бластоцисты (5–6-е сутки развития) были предоставлены Международным центром репродуктивной медицины (Россия) с согласия доноров.

Внутреннюю клеточную массу бластоцисты изолировали механически и переносили на слой митотически инактивированных фидерных клеток, представленный линией МСК из костного мозга 5–6-недельного эмбриона человека – FetMSC.

2. Культивирование и митотическая инактивация фидерных клеток.

Клетки FetMSC культивировали в условиях 5% CO₂, 37⁰С и 90% влажности. Ростовая среда состояла из 90% DMEM/F12 (Биолот, Россия) и 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS, HyClone, США). Для блокирования пролиферации монослой фибробластов обрабатывали митомицином-С (Sigma, США) в концентрации 10 мкг/мл в течение 2.5 ч.

3. Культивирование ЭСК человека в условиях фидерного слоя.

Ростовая среда для получения и культивирования линий ЭСК состояла из 80% Knockout Dulbecco's modified Eagles medium (Gibco, США), 20% Knockout Serum Replacement (Gibco, США), 2 мкМ L-глутамина, 1% заменимых аминокислот NEAA, 0.1 мкМ 2-меркаптоэтанола (Sigma), 8 нг/мл основного фактора роста фибробластов (bFGF) (Chemicon, США). ЭСК человека культивировали в условиях 5% CO₂, 37⁰С и 90% влажности. Для криоконсервации использовали среду, состоящую из 90% ростовой среды для ЭСК и 10% диметилсульфоксида (DMSO, Sigma, США). Колонии пересевали механически через 5–6 сут.

4. Определение времени удвоения популяции ЭСК человека. Среднее время одного удвоения клеточной популяции определяли путем измерения площади не менее 10 колоний в течение 4–5 сут при помощи компьютерной программы WCIF ImageJ.

5. Кариотипирование. За 4 ч до фиксации в культуру ЭСК вводили коллемеид KaryoMAX (0.1 мкг/мл, Gibco). Клетки диссоциировали с помощью смеси трипсина и версена (1:3), проводили гипотоническую обработку смесью 0.075 М раствора KCl и 1%-го раствора цитрата натрия, фиксировали смесью метанола с ледяной уксусной кислотой (3:1, Реактив, Россия). Для количественного кариотипического анализа метафазных пластинок хромосомы окрашивали водным раствором Гимза (1:50, Sigma, США). Для структурного кариотипического анализа проводили дифференциальное G-окрашивание хромосом в соответствии с ранее описанной методикой (Ozkinay and Mitelman, 1979). Кариотипы линий анализировали с помощью микроскопа Axio Imager.M1 (Carl Zeiss, ФРГ) с системой автоматического кариотипирования Ikaros 4 Karyotyping System (MetaSystems, Germany) и описывали в соответствии с Международной системой для цитогенетической номенклатуры хромосом человека ISCN (Shaffer et al., 2009).

6. Дифференцировка ЭСК in vitro. ЭСК переносили в культуральные чашки с низкой адгезией (Медполимер, Россия) в среду для ЭСК без добавления bFGF. Образовавшиеся в суспензионной культуре эмбрионные тельца (ЭТ) культивировали в среде в течение 10 сут. ЭТ диссоциировали до единичных клеток, высевали на стекла, покрытые желатином, и культивировали в течение 2-х нед в среде DMEM/F12 с 10% FBS.

7. Гистохимический анализ активности щелочной фосфатазы. Клетки в течение 20 мин фиксировали 4%-ным параформальдегидом (ПФ), а затем 30 мин обрабатывали BCIP/NBT Liquid Substrate System (Sigma) при температуре 37⁰С. Анализ проводили под световым микроскопом (Nicon eclipse TS 100, Япония).

8. Иммунофлуоресцентный анализ маркеров недифференцированных и дифференцированных ЭСК человека. Для идентификации маркеров плюрипотентных ЭСК использовали моноклональные антитела (АТ) против транскрипционных факторов Oct-4 (Santa Cruz, США) и Nanog (BD Pharmingen, США), поверхностных антигенов SSEA-4 (Mc813-70), TRA-1-81 и TRA-1-60 (Chemicon International, США). Для выявления Р-гликопротеина, АТФ-связывающего ABCG2 транспортера были использованы моноклональные АТ ВХР-21 (Alexis Biochemical, США). В качестве вторых АТ были использованы иммуноглобулины кролика и козы, конъюгированные с флуоресцеином, FITC (Millipore, США) и Alexa 488 (Molecular Probes, США).

Для выявления дифференцированных клеток-производных трех зародышевых листков использовали первые АТ против β III-тубулина (Sigma, США) и нестина (Chemicon, США), α -фетопротеина (AFP, Sigma, США) и α -актинина (Sigma, США), в концентрации, рекомендованной производителем.

Клетки фиксировали 4%-ным ПФ в течение 20 мин при $t_{\text{комн}}$, блокировали неспецифическое связывание антител 1%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина (Sigma, США) в течение 1 ч, обрабатывали 0.1%-ным раствором TritonX100 (для транскрипционных факторов) при $t_{\text{комн}}$ в течение 15 мин. Далее препараты инкубировали в растворе первых АТ (в концентрации, рекомендованной производителем) в течение ночи при температуре +4⁰С, промывали раствором PBS без Ca²⁺ и Mg²⁺ (Биолот, Россия) и инкубировали с раствором вторых АТ (в концентрации, рекомендованной производителем) в течение 1ч при $t_{\text{комн}}$. Затем отмывали и докрашивали ядерным красителем Hoechst 33342 (2мкг/мл, Sigma, США) в течение 10 мин при $t_{\text{комн}}$. В качестве отрицательного контроля использовали аналогичные препараты, обработанные только вторыми АТ. Анализ проводили под микроскопом Zeiss LSM 5 Pascal.

9. Дифференцировка ЭСК in vivo. Кластеры колоний ЭСК человека (1-2 x10⁶) инъецировали иммунодефицитным мышам (Nu/Nu) подкожно. Через 12 нед мышей усыпляли и извлекали развившиеся тератомы. Опухолевую ткань обрабатывали фиксатором Буэна, заключали в парафин, готовили гистологические срезы. Гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином (Sigma, США). Все протоколы по работе с животными одобрены Комитетом по биоэтике ИБХ РАН.

10. Анализ экспрессии генов методом ПЦР. Тотальную РНК из ЭСК человека, эмбрионидных телец и фидерных клеток выделяли с использованием TRIzol® Reagent (Invitrogen) по протоколу, рекомендованному производителем. Образцы тотальной РНК обрабатывали ДНКазой (Ambion, США). Для синтеза кДНК использовали 0.5 мкг тотальной РНК на пробу, ревертазу RevertAid M-MuLV и случайные олигонуклеотидные последовательности (random hexamer oligonucleotide primers) (Fermentas, Канада/Литва). Пробы для ПЦР готовили в соответствии с протоколом производителя Taq ДНК-полимеразы (Silex, Россия). Температура отжига праймеров была адаптирована к оптимальным условиям ПЦР для каждой используемой пары праймеров. ПЦР-анализ экспрессии изучаемых генов проводили на амплификаторе Eppendorf (Германия).

11. Получение и характеристика линии мезенхимных стволовых клеток SC5-MSC. Из ЭСК получали ЭТ по ранее описанной методике. ЭТ переносили на гидрофильную (адгезионную) поверхность в среду α -MEM (Биолот, Россия) с добавлением 10% FBS (Hyclone, США). Через несколько суток вокруг прикрепившихся ЭТ выявляли однородные зоны фибробластоподобных клеток, диссоциировали их до единичных клеток и переносили на новые гидрофильные чашки Петри. В результате длительного культивирования получили линию фибробластоподобных клеток.

Кариотипический анализ полученной линии проводили на 12-м пассаже культивирования по ранее описанной методике.

Иммунофенотипирование проводили с помощью панели конъюгатов CD-маркерных моноклональных АТ с флуорохромами. В работе использовали моноклональные АТ против CD-34, CD-117 (c-kit), HLA-ABC и HLA-DR (Caltac, США), CD-44, CD-73, CD-105 (Beckman Coulter, США), CD-90 (Chemicon, США). В качестве негативного контроля использовали очищенные мышинные IgG1/Fitc и IgG1/PE АТ (DAKO, Дания). Для анализа с помощью проточной цитофлуориметрии экспрессии SSEA-4 и TRA-1-60 суспензию клеток фиксировали 1%-ным ПФ в течение 20 мин при $t_{\text{комн}}$, инкубировали с первыми АТ в течение ночи при $+4^{\circ}\text{C}$, отмывали и инкубировали со вторыми флуоресцеин-конъюгированными АТ (1:500, Millipore, США) в течение 1ч при 37°C . Все пробы анализировали на цитометре Beckman Coulter.

Индукцию остеогенной, адипогенной и хондрогенной дифференцировки и их оценку проводили согласно методике, описанной в статье М. Рейес с соавторами (Reyes et al., 2001). Результаты оценивали под световым микроскопом (Nicon eclipse TS 100, Япония).

12. Получение кондиционированной среды от клеток линии SC5-MSC. Клеточный монослой промывали раствором PBS без Ca^{+2} и Mg^{+2} и вносили ростовую среду для культивирования ЭСК без bFGF, состоящую из

80% DMEM/F12 (Биолот, Россия), 20% Knockout Serum Replacement (Gibco, США), 2 мкМ L-глутамин, 1% заменимых аминокислот NEAA, 0.1 мкМ 2-меркаптоэтанола (Sigma, США). Через 24 ч инкубации клеток при 37⁰С и 90% влажности, кондиционированную среду отбирали, фильтровали через стерильный фильтр (0.22 мкм, Orange Scientific, Бельгия). Хранили при -20⁰С.

13. Получение внеклеточного матрикса от клеток линии SC5-MSC.

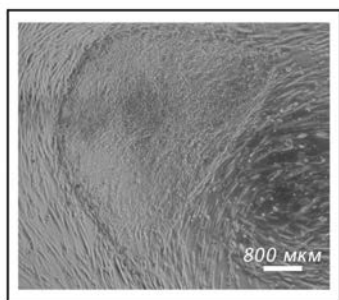
Клетки рассевали на чашки Петри в концентрации, обеспечивающей плотный монослой, и инкубировали при 5% CO₂, 37⁰С и 90% влажности в течение 2-х нед, меняя ростовую среду каждые 3–4 дня. При помощи пипетки отделяли край монослоя от чашки Петри и той же пипеткой аккуратно смывали его с поверхности культурального пластика. Поверхность культурального пластика с оставшимися на ней белками ВКМ промывали 2 раза раствором PBS без Ca⁺² и Mg⁺², высушивали и хранили при -20⁰С.

14. Культивирование ЭСК в бесфидерной системе. Колонии ЭСК культивировали на ВКМ от фидерных клеток в ростовой среде (состав описан в п. 12), половина которой была кондиционирована клетками SC5-MSC, а концентрация bFGF увеличена до 32 нг/мл. Колонии ЭСК пересевали механическим способом каждые 5–6 сут. Смену среды проводили ежедневно.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1.1. Получение и характеристика линий ЭСК в условиях фидерного культивирования. Клетки внутренней клеточной массы 3 бластоцист из 15, после выделения и переноса на слой фидерных клеток, прикрепились и начали активно пролиферировать, формируя плоские, типичные для ЭСК, колонии



(рис. 1). В результате длительного культивирования были получены и охарактеризованы 3 новые линии ЭСК человека – SC5, SC6 и SC7 (Крылова, Кольцова и др., 2009а; Кольцова и др., 2011).

Рис. 1. Морфология колоний ЭСК человека, растущих на слое фидерных клеток FetMSC.

Линии прошли более 150 удвоений клеточной популяции. Среднее время одного удвоения клеточной популяции составило: 28.2±0.6 ч, 21.0±0.6 и 24.0±2.4 ч для линий SC5, SC6 и SC7, соответственно. Для линии SC5 время удвоения было достоверно больше, чем для SC6 ($P < 0.01$).

1.2. Каротиотипический анализ линий SC5, SC6 и SC7. Каротиотипический анализ клеточных линий SC5, SC6 и SC7 был проведен на 25-м пассаже

культивирования, что соответствует более чем 150 удвоениям клеточной популяции. При количественном кариотипическом анализе исследовали 260 метафаз в SC5, 215 – в SC6 и 120 – в SC7; долю полиплоидных клеток определяли при анализе 500 метафаз. Показано, что линии SC5, SC6 и SC7 характеризуются высокой частотой клеток с модальным числом хромосом, равным 46 (98.0 ± 0.9 ; 98.6 ± 0.8 ; и 99.2 ± 0.8 %), и низкой долей полиплоидных клеток (0.2 ± 0.2 , 2.8 ± 0.7 , 3.0 ± 0.8), соответственно.

При структурном кариотипическом анализе хромосом исследовали 30, 55 и 50 метафаз в линиях SC5, SC6 и SC7, соответственно (рис. 2).

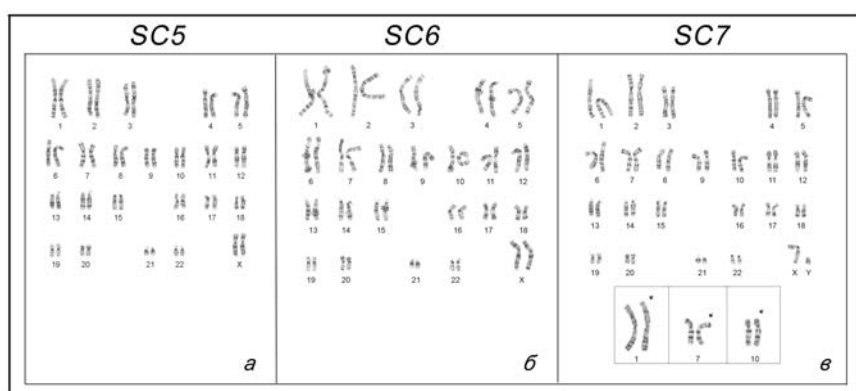


Рис. 2. Кариотипы линий ЭСК человека SC5, SC6 и SC7. а – нормальный 46XX кариотип линии SC5; б - нормальный 46XX кариотип линии SC6; в - нормальный 46XY кариотип линии SC7, в рамке случайные структурные хромосомные перестройки.

Структурные изменения хромосом, были выявлены в 3 из 50 проанализированных клеток только в линии SC7: парацентрическая инверсия хромосомы 10 $inv(10)(q11.2q24)$ в одной клетке и аномальный характер G-бандирования коротких плеч хромосом 1 и 7 в двух других метафазах. Измененный рисунок дифференциального G-окрашивания короткого плеча хромосомы 1, по-видимому, является результатом парацентрической инверсии [$inv(1)(?p21\sim 22p36.1)$], сопровождаемой дупликациями хромосомного материала. Результаты свидетельствуют, что частота нормальных метафаз в линии SC7 составляет 94.0%, а обнаруженные структурные хромосомные изменения носят неклональный характер, что подтвердилось при повторном анализе на 40-м пассаже культивирования – данные структурные изменения не были обнаружены. Таким образом, судя по характеру дифференциального G-окрашивания хромосом при уровне разрешения 400–550 дисков на гаплоидный набор хромосом, кариотипы клеточных линий ЭСК не имели отличий от нормального кариотипа человека 46, XX – SC5 и SC6 и 46, XY – SC7.

1.3. Анализ маркеров недифференцированных ЭСК человека в линиях SC5, SC6 и SC7. Гистохимический анализ активности щелочной фосфатазы (рис. 3) и иммунофлуоресцентный анализ экспрессии транскрипционных факторов Oct-4, Nanog и поверхностных антигенов SSEA-4, TRA-1-60 (рис. 4) подтвердил их наличие, что свидетельствует о том, что все линии экспрессируют маркеры, характерные для недифференцированных ЭСК человека (Draper et al., 2002; Ginis et al., 2004).

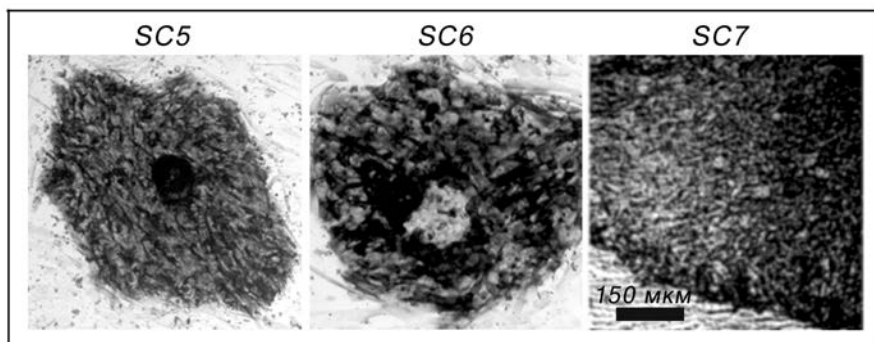


Рис. 3. Гистохимический анализ активности щелочной фосфатазы в недифференцированных клетках линий SC5, SC6 и SC7.

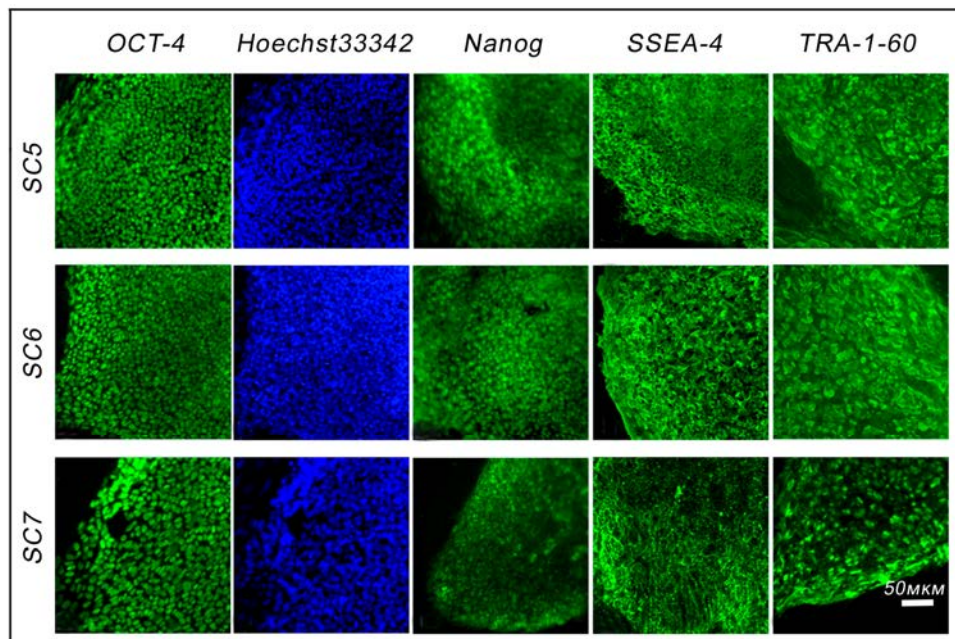


Рис. 4. Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии маркеров недифференцированных ЭСК человека (Oct-4 и докрасивание Hoechst 33342, Nanog, SSEA-4, TRA-1-60) в клетках линий SC5, SC6 и SC7.

1.4. Дифференцировка ЭСК линий SC5, SC6 и SC7 in vitro. Все три линии ЭСК человека способны дифференцироваться in vitro в клетки экто-, энто- и мезодермального происхождения. Иммунофлуоресцентный анализ подтвердил присутствие белков, специфических для клеток-производных трех зародышевых листков (рис. 5).

1.5. Дифференцировка ЭСК линий SC5, SC6 и SC7 in vivo. При трансплантации ЭСК иммунодефицитным мышам во всех линиях формировались зрелые тератомы. Гистологический анализ тератом выявил присутствие разных типов дифференцированных соматических клеток, являющихся производными эктодермы, мезодермы и энтодермы: клетки ороговевающего эпителия, гладкомышечные клетки, клетки соединительной и жировой тканей, секретирующие эпителиальные клетки в зачатках крипт кишечника. В качестве примера дифференцировки ЭСК in vivo представлена линия SC7 (рис. 6).

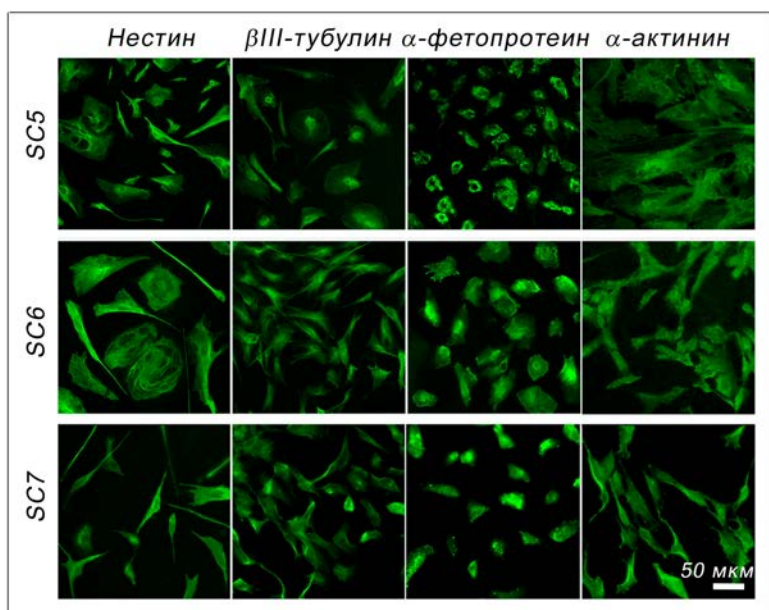


Рис. 5. Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии маркеров ранней дифференцировки ЭСК человека (нестина и β Штубулина – маркеры эктодермы, α -фетопротеина – маркер энтодермы, α -актинина – маркер мезодермы) в клетках линий SC5, SC6 и SC7.

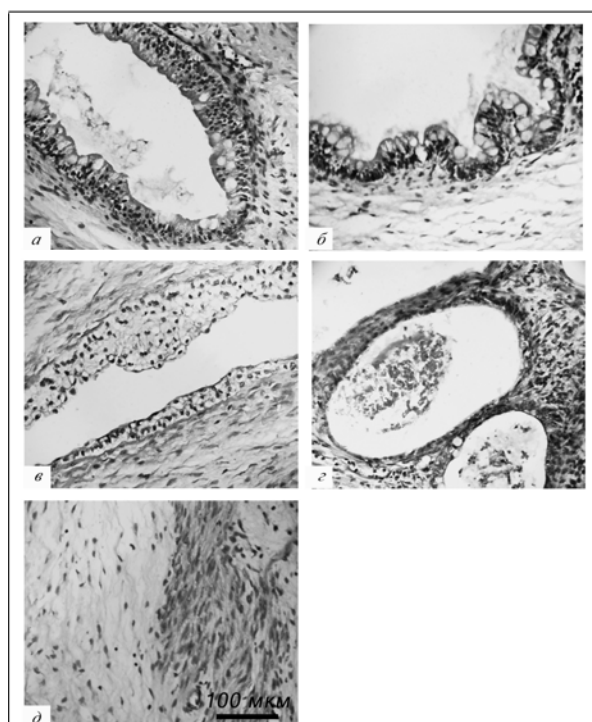


Рис. 6. Дифференцировка *in vivo* линий ЭСК человека в производные трех зародышевых листков в экспериментальных тератомах. а, б – секреторный эпителий кишечного типа в зачатках кишечных крипт; в – клетки соединительной и жировой ткани; г – клетки ороговевающего эпителия; д – гладкомышечные клетки; в качестве примера представлена линия SC7.

Таким образом, способность полученных линий ЭСК - SC5, SC6 и SC7 дифференцироваться в производные трех зародышевых листков как *in vitro*, так и *in vivo* подтверждает их плюрипотентный статус.

1.6. ПЦР анализ экспрессии генов плюрипотентных ЭСК и генов ранней дифференцировки в линиях SC5, SC6 и SC7. В качестве модели дифференцировки использовали эмбрионные тельца (ЭТ) на 1, 5 и 10-е сутки (Кольцова и др., 2011) (рис. 7). Было обнаружено, что недифференцированные клетки линий SC5, SC6 и SC7 экспрессируют гены транскрипционных факторов *OCT4* и *NANOG* и гены *DPPA3/STELLA* и *DAZZL*, отвечающие за

способность ЭСК дифференцироваться в линию половых клеток, но не экспрессируют гены-маркеры соматических клеток – *GATA4*, *AFP*, *BRY*, *PAX6*.

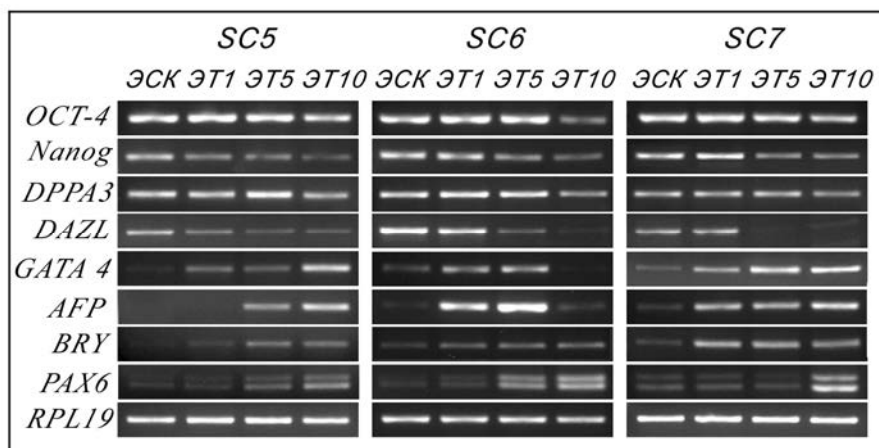


Рис. 7. Транскрипционный профиль недифференцированных ЭСК человека и эмбрионных телец (ЭТ) на 1, 5 и 10-е сут дифференцировки в клетках линий SC5, SC6 и SC7.

В процессе дифференцировки ЭТ, образованных клетками этих линий, увеличивается экспрессия генов *GATA4* и *AFP*, специфических для внезародышевой и зародышевой энтодермы, и генов *BRY* и *PAX6*, специфических для ранних мезодермальных и нейроэктодермальных клеток, соответственно, а уровень экспрессии генов, специфических для плюрипотентных клеток, постепенно снижается.

Таким образом, из полученных результатов по изучению транскрипционного профиля маркерных генов следует, что линии SC5, SC6 и SC7 удовлетворяют критериям недифференцированных плюрипотентных ЭСК.

1.7. Анализ экспрессии транспортера множественной лекарственной устойчивости в линиях SC5, SC6 и SC7.

В связи с данными о наличии в ряде линий ЭСК человека экспрессии генов транспортеров множественной лекарственной устойчивости, обеспечивающих механизм защиты от повреждающих воздействий различными химическими факторами (Sarkadi et al., 2006, 2009; Erdei et al., 2012) в полученных линиях была изучена экспрессия генов транспортеров ABCG2 и ABCB1.

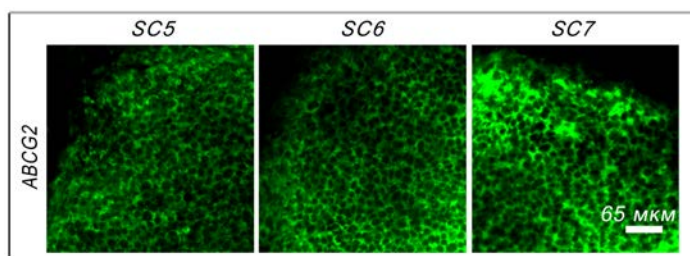


Рис. 8. Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии гена транспортера множественной лекарственной устойчивости ABCG2 в клетках линий – SC5, SC6 и SC7.

Иммунофлуоресцентная окраска моноклональными антителами против ABCG2 транспортера показала его наличие в линиях SC5, SC6 и SC7 (рис.8).

С помощью ПЦР-анализа была исследована экспрессия генов ABCG2 и ABCB1 в недифференцированных клетках и дифференцирующихся ЭТ (рис. 9).

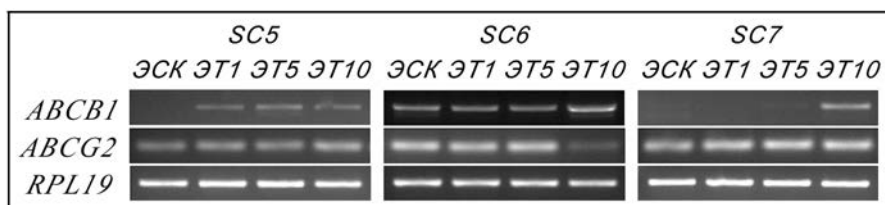


Рис. 9. Экспрессия генов транспортеров *ABCG2* и *ABCB1* в недифференцированных ЭСК человека и в эмбрионидных тельцах на 1, 5 и 10-е сут дифференцировки линий SC5, SC6 и SC7.

Экспрессия мРНК *ABCG2* транспортера наблюдалась во всех линиях на всех изученных стадиях. Полученные данные согласуются с результатами других авторов, также выявивших экспрессию гена *ABCG2* в ЭСК человека, как на уровне мРНК, так и на уровне белка (Bhattacharya et al., 2004; Pal et al., 2009; Erdei et al., 2012).

Существенно более низкий уровень экспрессии был обнаружен для гена транспортера *ABCB1*. В работе Апати и др. (Apati et al., 2008) с помощью ПЦР-анализа также была выявлена экспрессия *ABCB1* транспортера в ЭСК человека, однако иммунофлуоресцентный анализ с помощью моноклональных антител и анализ функционального действия этого транспортера не обнаружил экспрессии *ABCB1* на уровне белка. В связи с низким уровнем экспрессии мРНК *ABCB1* мы не проводили иммунофлуоресцентный анализ его экспрессии. Поэтому можно констатировать наличие некоторых межлинейных различий между линиями SC5, SC6 и SC7 по экспрессии *ABCB1* только на транскрипционном уровне. Есть данные, что экспрессия *ABCB1* транспортера развивается по ходу мезенхимной дифференцировки ЭСК человека (Barbet et al., 2012). Необходимо отметить, что экспрессия мРНК *ABCB1* транспортера в ЭСК человека находится на очень низком уровне и в некоторых случаях, возможно, он ниже уровня чувствительности используемого метода при описанных условиях. Возможно, функционирование этого транспортера в ЭСК человека проявляется не во всех условиях культивирования.

Таким образом, очевидно, что в разных линиях ЭСК присутствует экспрессия гена *ABCG2* транспортера множественной лекарственной устойчивости. По-видимому, наличие транспортера *ABCG2* является одним из механизмов, способствующих поддержанию генетической стабильности в линиях ЭСК человека.

2. Влияние условий культивирования на проявление свойств линий ЭСК. Нами была показана зависимость свойств ЭСК от стабильности условий культивирования (Крылова, Кольцова и др., 2009 а, б). В системе фидерного культивирования были получены 2 линии ЭСК человека – SC3 и SC4. Клетки культивировали в тех же условиях, что и остальные линии, за исключением того, что в состав среды был введен ростовой фактор активин-А, а концентрация кислорода была снижена до физиологической – 5%,

способствующей стабилизации характеристик ЭСК (Ezashi et al., 2005; Chen et al., 2010). Линии SC3 и SC4 прошли около 120 удвоений клеточной популяции. Среднее время удвоения клеточной популяции составило 37.5 ± 4.2 ч и 28.2 ± 0.6 ч, соответственно. Гистохимический анализ активности щелочной фосфатазы, иммунофлуоресцентный анализ экспрессии транскрипционного фактора Oct-4 и поверхностных антигенов SSEA-4, TRA-1-60 и TRA-1-81, а также способность к дифференцировке *in vitro* в производные 3 зародышевых листков подтвердили статус ЭСК человека. Предварительный кариотипический анализ выявил нормальный кариотип исследуемых линий – 46, XX для SC3 и 46, XY для SC4.

Последующее резкое изменение условий культивирования – исключение из ростовой среды активина-А и повышение концентрации кислорода до 20% (стандартно используемая концентрация при культивировании клеток) – привело к изменению свойств клеточных линий. Так, произошло нарушение пролиферации, выраженное в асинхронности и неравномерной (скачкообразной) активности в течение одного пассажа. Одновременно клетки перестали четко окрашиваться ядерным флуоресцентным красителем – йодистым пропидием (PI). Причем подобный результат был отмечен при окрашивании как фиксированных, так и обработанных детергентами клеток, при существенном варьировании времени экспозиции. Далее была предпринята попытка окрашивания ядер ЭСК витальным флуоресцентным красителем Hoechst 33342, активно проникающим в клетки. Во всех случаях результат был аналогичен картине окрашивания PI. Существенно подчеркнуть, что нефлуоресцентный краситель Гимза четко окрашивал ядра вне зависимости от их состояния (рис.10).

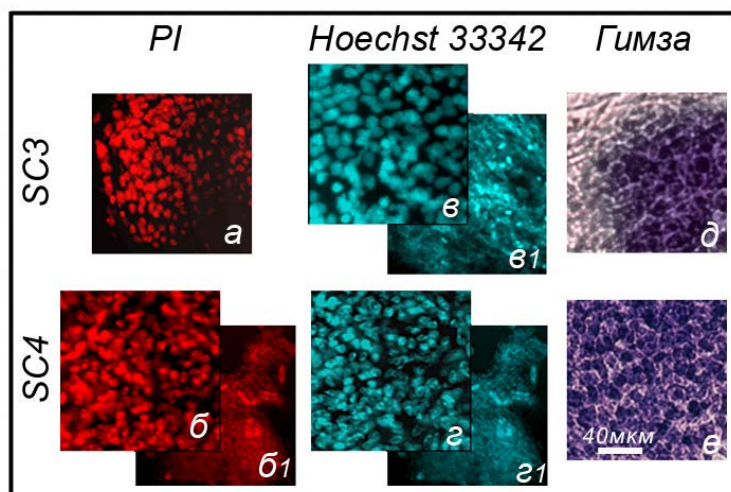


Рис. 10. Окрашивание ядер клеток линий SC3 и SC4 флуоресцент-ными красителями: йодистым пропидием (PI) и Hoechst 33342; окрашивание по Гимза. Окрашивание PI клеток SC3 и SC4 (а, б) соответственно и клеток SC4 после изменения условий культивирования (б₁); окрашивание Хехстом 33342 клеток SC3 и SC4 (в, г) соответственно и SC3, SC4 после изменения условий культивирования (в₁, г₁); окрашивание по Гимза клеток линий SC3 и SC4 (д, е),соответственно.

Следует также отметить, что в описываемых линиях наблюдали другую морфологию колоний. В отличие от плоских колоний в линиях SC3, SC4 до изменения условий и SC5 – SC7, колонии линий SC3, SC4 после изменения условий были многослойными. Корреляция между многослойностью колоний,

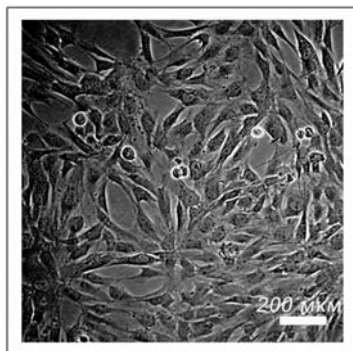
характером пролиферативной активности и диффузным окрашиванием флуоресцентными ядерными красителями была выявлена ранее еще в 5 линиях ЭСК (Крылова и др., 2003, 2005). Обнаруженное явление может быть связано с нарушением равновесия в структуре колоний ЭСК, которое, в свою очередь, было спровоцировано резким изменением состава газовой фазы, исключением из ростовой среды активина-А и, возможно, другими неучтенными факторами.

Линии SC3 и SC4 по-разному отреагировали на изменение условий: если линия SC3 повела себя описанным выше образом, то линия SC4 быстро ушла в дифференцировку, перестала делиться и погибла.

Другие изменения наблюдали при кратковременном культивировании линии SC3 при 5% O₂ и добавлении в среду активина-А с последующим переводом и длительным культивированием в стандартных условиях. Полученная сублиния SC3а по морфологии колоний и основным свойствам была сходна с линиями SC5, SC6 и SC7, но имела ограниченный дифференцировочный потенциал (Кольцова и др., 2011).

Таким образом, приведенные данные подтверждают необходимость не только создания оптимальной системы культивирования, но и поддержания этой системы в стабильном состоянии. Нельзя также исключить и генетическую детерминированность процесса образования постоянных линий ЭСК человека.

3. Получение и характеристика клеточной линии SC5-MSC, полученной из линии ЭСК SC5. С целью получения аутогенного субстрата для дальнейшего культивирования ЭСК была проведена дифференцировка



линии SC5 в мезенхимном направлении. В результате была получена неиммортилизованная линия SC5-MSC, представленная фибробластоподобными клетками (рис.11) (Крылова, Кольцова и др., 2012). SC5-MSC характеризуется высокой пролиферативной активностью и нормальным кариотипом 46, XX.

Рис. 11. Морфология клеток линии SC5-MSC.

Методом проточной цитофлуориметрии было показано наличие экспрессии поверхностных антигенов, характерных для МСК человека: CD44, CD73, CD90, CD105, HLA-ABC и отсутствие экспрессии антигенов: CD34 и HLA-DR

При индукции дифференцировки *in vitro* линия SC5-MSC показала способность формировать жировую, костную и хрящевую ткань, что соответствует статусу МСК (рис.12).

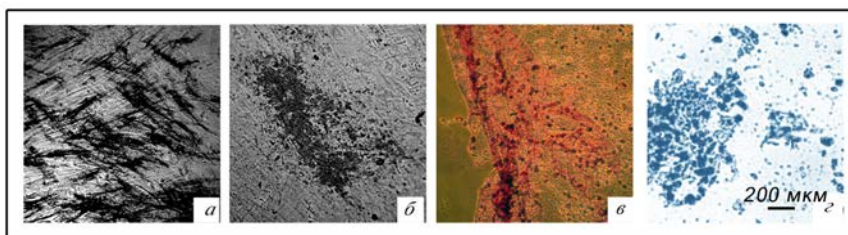


Рис. 12. Дифференцировка клеток в направлении остео-, адипо- и хондрогенеза. *а* – выявление активности щелочной фосфатазы при культивировании в остеогенной

среде; *б* – формирование минеральных комплексов по реакции von Kossa в межклеточном пространстве; *в*- окрашивание клеток Oil Red O при культивировании в адипогенной среде; *з* - окрашивание клеток толуидиновым синим при культивировании в хондрогенной среде.

Таким образом, полученная клеточная линия обладает набором свойств, характерных для МСК.

Мы использовали линию SC5-MSC в качестве продуцента компонентов ВКМ и ростовых факторов для бесфидерного культивирования ЭСК человека.

4. Разработка бесфидерной системы культивирования ЭСК человека

4.1. Подбор состава ростовой среды для бесфидерного культивирования ЭСК человека. В работе показано, что культивирование ЭСК человека с использованием кондиционированной среды позволило

упростить систему культивирования, избежать включения в ростовую среду дополнительных ростовых факторов семейства $TGF\beta$. Наличие экспрессии гена $TGF\beta 1$ в клетках линии SC5-MSC, а также ряда других генов семейства $TGF\beta$ и гена $FGF2$, поддерживающих рост недифференцированных ЭСК человека, было подтверждено методом ПЦР-анализа (Кольцова и др., 2012).

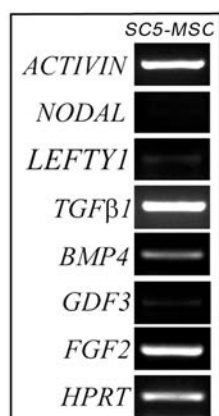
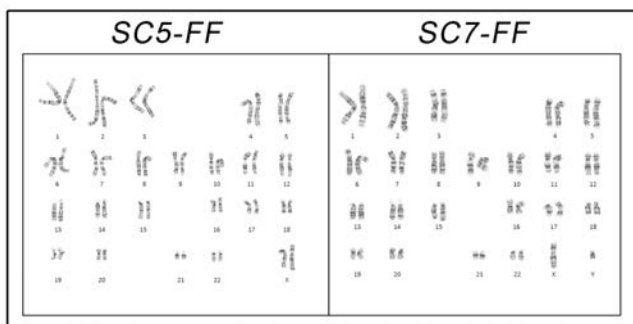


Рис. 22. Анализ экспрессии генов семейства $TGF\beta$ и $FGF2$ в кондиционированной среде от фидерных клеток SC5-MSC.

4.2. Анализ белкового состава внеклеточного матрикса, полученного после снятия фидерных клеток линии SC5-MSC разными способами. Был проведен анализ ВКМ от линии SC5-MSC, полученного разными способами. В результате был выбран ВКМ, получаемый при механическом снятии необработанного монослоя фидерных клеток. (Кольцова и др., 2012). В отличие от ВКМ, получаемого при механическом снятии необработанного монослоя фидерных клеток после предварительной криогенной процедуры и ВКМ после механического снятия митотически инактивированного митомицином-С монослоя фидерных клеток, при использовании выбранного варианта матрикса наблюдали высокую степень адгезии кластеров ЭСК при посеве. Возможно, это определяется наличием в его составе наибольшего количества фибронектина и ламинина.

5.1. Получение и характеристика сублиний ЭСК человека в системе бесфидерного культивирования. При длительном культивировании клеток линии SC5 на выбранном субстрате (аутогенная бесфидерная система) и клеток линии SC7 (аллогенная бесфидерная система) образовались две постоянные сублинии ЭСК – SC5-FF и SC7-FF. Среднее время одного удвоения клеточной популяции для них составило 23.0 ± 0.8 ч и 25.0 ± 1.5 ч, соответственно. Для сублинии SC7-FF оно практически совпадает с исходной линией SC7 (24.0 ± 2.4 ч). Однако среднее время удвоения в сублинии SC5-FF достоверно меньше, чем в SC5 – 28.2 ± 0.6 ч ($P < 0.01$), т.е. в бесфидерной системе имеет место более быстрое обновление клеточной популяции. Это может свидетельствовать о том, что данная система аутогенного бесфидерного культивирования оптимальна для этой линии. Из представленных результатов следует, что в настоящий момент сублиния SC5-FF прошла более 300, а сублиния SC7-FF – более 115 удвоений клеточной популяции.

5.2. Кариотипический анализ сублиний SC5-FF и SC7-FF. Количественный кариотипический анализ сублиний SC5-FF и SC7-FF проводили на 49 и 15 пассажах культивирования, соответственно. Модальное число хромосом и пределы изменчивости клеток по числу хромосом определяли при анализе 140 и 110 метафаз в SC5-FF и SC7-FF, соответственно. Долю полиплоидных клеток определяли при анализе 500 метафаз. Для сублиний SC5-FF и SC7-FF характерна высокая частота клеток с модальным числом хромосом, равным 46 (98.6 ± 1.0 ; $98.2 \pm 1.3\%$, соответственно). Доля полиплоидных клеток для обеих линий составила $6.6 \pm 1.1\%$, что достоверно выше, чем в исходных линиях SC5 и SC7, $P < 0.01$. Структурный кариотипический анализ дифференциально G-окрашенных хромосом в 70 метафазных пластинках для SC5-FF и в 50 – для SC7-FF при уровне разрешения 400–550 дисков на гаплоидный набор показал нормальный кариотип человека: 46, XX и 46, XY (рис.13). Кариотипическая структура SC7-FF стабильнее, чем исходной линии SC7, в которой было отмечено незначительное число



единичных хромосомных aberrаций, носящих случайный характер и не свидетельствующих об аномальности кариотипа клеточной линии.

Рис. 13. Кариотипы клеточных сублиний SC5-FF, SC7-FF.

5.3. Анализ маркеров недифференцированных ЭСК человека в полученных сублиниях. Гистохимический анализ выявил наличие активности щелочной фосфатазы в обеих сублиниях (рис. 14). Иммунофлуоресцентный анализ показал, что обе сублинии экспрессируют маркерные факторы,

подтверждающие статус ЭСК человека – транскрипционный фактор Oct-4 и поверхностные антигены SSEA-4 и TRA-1-81 (рис. 15).

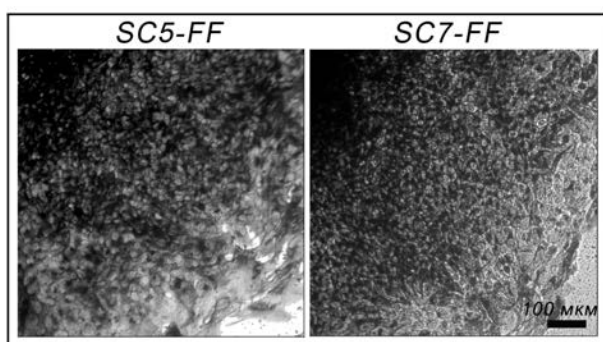


Рис. 14. Гистохимический анализ активности щелочной фосфатазы в недифференцированных ЭСК клетках сублиний SC5-FF и SC7-FF.

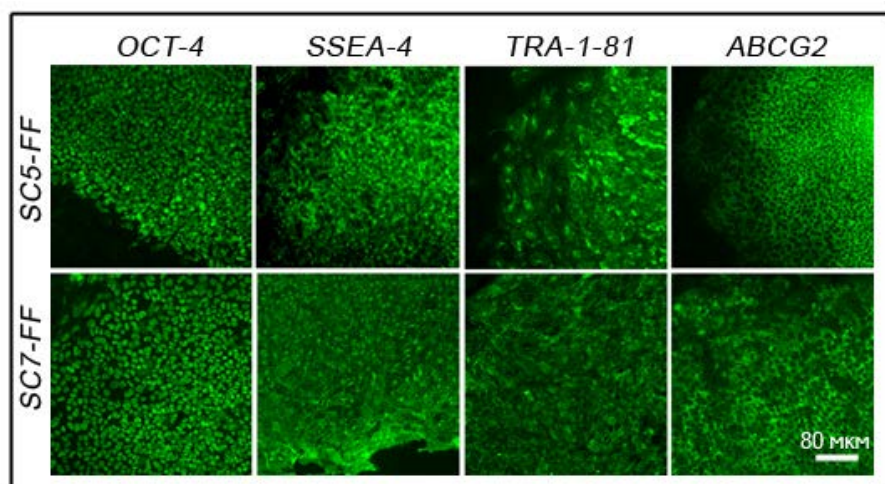
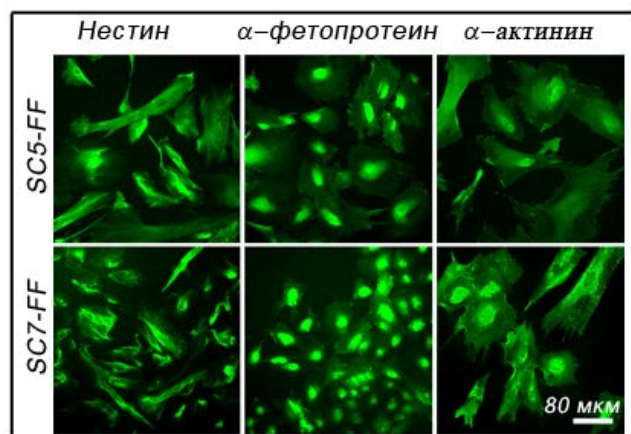


Рис.15. Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии маркеров недифференцированных ЭСК (Oct-4, SSEA-4, TRA-1-81) и транспортера множественной лекарственной устойчивости ABCG2 в клетках сублиний SC5-FF и SC7-FF.

Ранее нами также было показано наличие экспрессии гена *ABCG2* в линиях ЭСК человека, в частности, в SC5 и SC7 (Кольцова и др., 2011). С целью выяснения влияния разных систем культивирования на наличие экспрессии этого гена мы провели иммунофлуоресцентный анализ и установили, что в обеих сублиниях, как и в линиях, из которых они были получены (рис.8), имеет место экспрессия *ABCG2* (рис.15).

5.4. Дифференцировка ЭСК сублиний SC5-FF и SC7-FF *in vitro*.

Иммунофлуоресцентный анализ дифференцированных клеток, выявил экспрессию маркеров ранней дифференцировки, характерных для производных эктодермы (нестин), мезодермы (α -актинин) и энтодермы (α -фетопротеин) в



сублиниях SC5-FF и SC7-FF (рис. 16), что подтвердило плюрипотентный статус сублиний.

Рис. 16. Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии маркеров ранней дифференцировки ЭСК (α -актинина - маркера мезодермы, α -фетопротеина - маркера энтодермы и нестина - маркера эктодермы) в клетках сублиний SC5-FF и SC7-FF.

6. Сравнительный ПЦР-анализ маркеров плюрипотентных ЭСК человека и маркеров ранней дифференцировки в линии SC5 и сублинии SC5-FF.

Исследуемая панель маркеров и проб клеток была аналогична панели в п.1.6. В результате анализа не было выявлено значительных различий в экспрессии изучаемых генов в клетках SC5 и SC5-FF (рис. 17).

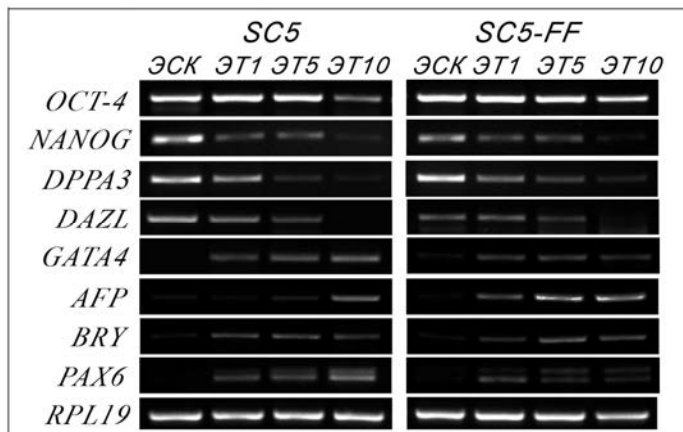


Рис. 17. Анализ экспрессии генов, специфических для плюрипотентных клеток и ранних клеток-предшественников трех зародышевых листков, в недифференцированных ЭСК и эмбрионидных тельцах (ЭТ) на 1, 5 и 10-е сут дифференцировки.

Таким образом, данные иммунофлуоресцентного и ПЦР анализов свидетельствуют о том, что сублинии SC5-FF и SC7-FF, культивирующиеся в аутогенной и аллогенной бесфидерных системах, сохраняют статус ЭСК, которым обладают линии SC5 и SC7, из которых они получены (Кольцова и др., 2012).

7. Сравнительная количественная оценка состава клеточной популяции методом проточной цитофлуориметрии

Метод проточной цитофлуориметрии показал отсутствие достоверных различий по уровню экспрессии маркеров SSEA-4 и TRA-1-81 между исходными линиями SC5 и SC7 и полученными из них сублиниями SC5-FF и SC7-FF ($P > 0.05$). Во всех случаях уровень экспрессии антигена SSEA-4 достоверно выше антигена TRA-1-81 ($P < 0.05$) (Кольцова и др., 2012). Показано, что в колониях ЭСК человека имеет место гетерогенность по экспрессии характерных поверхностных антигенов (Stewart et al., 2006; Li et al., 2011). Тем не менее, из представленных данных следует наличие во всех линиях большого количества недифференцированных ЭСК.

Таблица. Экспрессия поверхностных маркеров в клетках линий SC5, SC5-FF, SC7, SC7-FF.

Маркер	Доля клеток в разных линиях, экспрессирующих определенный маркер, %, $\bar{x} \pm s_x$			
	SC5	SC5-FF	SC7	SC7-FF
SSEA-4	93.5 \pm 1.9	91.6 \pm 3.9	98.2 \pm 0.3	95.1 \pm 2.4
TRA-1-81	60.7 \pm 7.7	73.2 \pm 3.5	54.5 \pm 5.8	63.8 \pm 8.6

Примечание: приведены средние значения из 3–4 экспериментов

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе в фидерной системе культивирования получены три новые линии ЭСК человека – SC5, SC6 и SC7. Эти линии имеют нормальный кариотип, экспрессируют маркеры недифференцированных ЭСК и способны дифференцироваться в производные трех зародышевых листков *in vitro* и *in vivo*.

Принимая во внимание недостатки фидерной системы, была разработана новая бесфидерная система культивирования, использующая в качестве субстрата ВКМ, синтезированный фидерными клетками. В качестве продуцента ВКМ использовали линию SC5-MSC, полученную методом ненаправленной индукции из линии ЭСК человека SC5.

Был разработан новый метод получения ВКМ, при котором использовали необработанные клетки-продуценты, а снятие монослоя проводили без использования каких-либо химических агентов или физического воздействия.

Использование ВКМ и кондиционированной среды, полученных от клеток линии SC5-MSC, позволило создать аутогенную бесфидерную систему культивирования для клеток линии SC5 и аллогенную – для клеток линии SC7. В результате длительного культивирования были получены две сублинии SC5-FF и SC7-FF, обладающие нормальным кариотипом и всеми основными маркерами недифференцированных ЭСК человека, а также способные дифференцироваться *in vitro* в производные трех зародышевых листков.

При сравнительном анализе свойств ЭСК, культивируемых в разных системах, были проведены следующие исследования: количественный и структурный кариотипический анализ; определение среднего времени удвоения клеточных популяций; цитофлуориметрический анализ уровня экспрессии поверхностных маркеров SSEA-4 и TRA-1-81, характеризующих количество недифференцированных, активно делящихся ЭСК в популяциях; иммунофлуоресцентный анализ экспрессии маркеров недифференцированных ЭСК; иммунофлуоресцентный анализ экспрессии маркеров плюрипотентности ЭСК; ПЦР-анализ экспрессии генов, специфичных для плюрипотентных ЭСК. Проведенный сравнительный анализ не выявил принципиальных различий по характерным свойствам между линиями, культивируемыми в разных системах. Учитывая разработку новой, универсальной системы бесфидерного культивирования, можно заключить, что как сама система культивирования, так и полученные в ней 2 сублинии расширили возможности для фундаментальных, биомедицинских и фармакологических исследований, проводимых с использованием ЭСК человека. Представленные результаты по получению и характеристике сублиний SC5-FF и SC7-FF соответствуют мировому уровню.

ВЫВОДЫ

1. В системе фидерного культивирования получены 3 новые постоянные линии ЭСК человека – SC5, SC6 и SC7. Все линии соответствуют статусу плюрипотентных стволовых клеток человека;

2. Поддержание стабильной системы культивирования является необходимым условием в работе с линиями ЭСК человека. Нарушение условий культивирования может привести к изменениям основных характеристик ЭСК, вплоть до их потери.

3. Полученная из линии SC5 неиммортилизованная линия фибробластоподобных клеток – SC5-MSC по своему фенотипу и способности к дифференцировке соответствует мезенхимным стволовым клеткам. Эта линия была использована в качестве продуцента компонентов ВКМ и ростовых факторов, необходимых для культивирования ЭСК.

4. Длительное культивирование линий SC5 и SC7 в разработанной новой бесфидерной системе, созданной на основе клеток линии SC5-MSC, позволило получить сублинии SC5-FF и SC7-FF, полностью соответствующие статусу плюрипотентных стволовых клеток человека.

5. Возможность создания не только аутогенной системы культивирования (SC5-FF) ЭСК человека, но и аллогенной (SC7-FF), свидетельствует об универсальности разработанной новой системы бесфидерного культивирования.

6. Сравнительный анализ основных характеристик линий ЭСК, культивируемых в фидерной системе, и их сублиний, полученных в бесфидерной системе, показал их сходство. Это свидетельствует о том, что разработанная бесфидерная система культивирования, которая гораздо стабильнее любой фидерной системы, может быть рекомендована для фундаментальных, биомедицинских и фармакологических исследований.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

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

Крылова Т.А., Кольцова А.М., Гордеева О.Ф., Мусорина А.С., Горячая Т.С., Пинаев Г.П., Полянская Г.Г. Выделение, идентификация и специфические особенности постоянных линий эмбриональных стволовых клеток человека // Сб. «Аутологичные стволовые клетки. Перспективы клинического применения», 2009б. Москва. Изд-во Литтерра, С. 23–42.

Кольцова А.М., Гордеева О.Ф., Крылова Т.А., Лифанцева Н.В., Мусорина А.С., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. Сравнительные характеристики новых линий эмбриональных стволовых клеток человека SC5, SC6, SC7 и SC3a // Онтогенез, 2011. Т. 42 (4), С. 1–15.

Lifantseva N., Koltsova A., Krylova T., Yakovleva T., Poljanskaya G., Gordeeva O. Expression Patterns of Cancer-Testis Antigens in Human Embryonic Stem Cells and Their Cell Derivatives Indicate Lineage Tracks // Stem Cells Int, 2011. Vol 2011, Article ID 795239, 13 pages.

Крылова Т.А., **Кольцова А.М.**, Зенин В.В., Мусорина А.С., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. Сравнительные характеристики новых линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из эмбриональных стволовых клеток, костного мозга и крайней плоти человека // Цитология, 2012. Т. 54 (1), С. 5–16.

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. Разработка новой бесфидерной системы и характеристика полученных в ней сублиний эмбриональных стволовых клеток человека при аутогенном и аллогенном культивировании// Цитология, 2012. Т.54 (8), С. 637–651.

Гамазин Д.А., **Кольцова А.М.** Белковый состав внеклеточного матрикса, продуцируемого фидерными фибробластами в культуре. Тезисы 10-й Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей «Человек и его здоровье». Санкт-Петербург, 20 – 21 апреля. 2007 г.

Кольцова А.М., Крылова Т.А. Полянская Г.Г. Получение линий эмбриональных стволовых клеток человека из предимплантационных бластоцист. Тезисы докладов и сообщений школы-конференции для молодых ученых «Методы культивирования клеток». Санкт-Петербург, 6 – 10 октября. Цитология, 2008 г. Т. 50. С. 808–809.

Кольцова А.М., Крылова Т.А., Зенин В.В., Мусорина А.С., Яковлева Т.К. Полянская Г.Г. Эмбриональные стволовые клетки человека. Тезисы докладов и сообщений Всероссийского симпозиума по биологии клетки в культуре «Культивируемые клетки как основа клеточных технологий». Санкт-Петербург, 12–14 октября. Цитология, 2009 г. Т. 51. С. 769–770.

Кольцова А.М., Крылова Т.А., Яковлева Т.К. Мусорина А.С., Полянская Г.Г. Получение и идентификация постоянных линий эмбриональных стволовых клеток человека. Материалы Всероссийской научной школы-конференции для молодежи «Аутологичные стволовые клетки: экспериментальные и клинические исследования». Москва. 21-26 сентября. 2009 г. С. 31–32.

Кольцова А.М., Крылова Т.А., Зенин В.В., Мусорина А.С., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. Эмбриональные стволовые клетки человека. Тезисы Всероссийского симпозиума по биологии клетки в культуре «Культивируемые клетки как основа клеточных технологий», Санкт-Петербург, 12–14 октября. Цитология, 2009 г. Т. 51. С. 769–770.

Кольцова А.М., Крылова Т.А., Мусорина А.С., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. Аутологичная система бесфидерного культивирования эмбриональных стволовых клеток человека. Материалы Всероссийской научной школы-конференции. Москва, 25–28 октября. Сб. тезисов «Стволовые клетки и регенеративная медицина», 2010 г. С. 38–39.

Кольцова А.М., Крылова Т.А., Мусорина А.С., Полянская Г.Г. Бесфидерная система культивирования эмбриональных стволовых клеток человека. Материалы Всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия», Санкт-Петербург, 21–22 декабря. 2010 г. С. 209.

Кольцова А.М., Крылова Т.А., Зенин В.В., Мусорина А.С., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. Характеристика мезенхимных стволовых клеток, полученных из эмбриональных стволовых клеток человека. Материалы конференции «Биология стволовых клеток: фундаментальные аспекты», Москва, 6–8 июня, 2011 г.

Кольцова А.М., Крылова Т.А., Гордеева О.Ф., Лифанцева Н.В., Зенин В.В., Мусорина А.С., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. Плюрипотентные эмбриональные стволовые клетки человека. Получение, характеристика, дифференцировка. Материалы конгресса «Симбиоз – Россия 2011». 23 -27 мая, Воронеж. 2011. С. 207–210.

Кольцова А.М., Смагина Л.В., Воронкина И.В., Полянская Г.Г.. Влияние внеклеточного матрикса, полученного разными методами, на поддержание эмбриональных стволовых клеток человека в культуре. Тезисы докладов 3-й конференции молодых ученых ИИЦ РАН. 15 -16 мая, Санкт-Петербург. Цитология, 2012 г. Т. 57 (4), С. 343.

Кольцова А.М., Гордеева О.Ф., Зенин В.В., Лифанцева Н.В., Мусорина А.С., Яковлева Т.К., Г.Г. Полянская. Сравнительный анализ свойств постоянных линий эмбриональных стволовых клеток человека, при культивировании в разных системах // Медицинский академический журнал, 2012. Т. 12 (3). С. 61-63.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Крылова и др. (2003) Цитология. 2003. Т. 12. С. 1172–1178. – **Крылова и др.** (2005) Цитология. 47. 121–129. – **Abeyta et al.** (2004) Hum. Mol. Genet. 13, 601–608. – **Allegrucci, Young.** (2007) Hum. Reprod. Update. 13. 103–120. – **Amit et al.** (2004) Biol. Reprod. 70. 837–845. – **Apati et al.** (2008) Biochimica et Biophysica Acta. 1778. 2700–2709. – **Barbet et al.** (2012) Cell Cycle. 11. 1611–620. – **Bhattacharya et al.** (2004) Blood. 103. 2956–2961. – **Braam et al.** (2008) Stem Cells. 26. 2257–2265. – **Chen et al.** (2010) Tissue Eng Part A. 16. 2901–2913. – **Cobo et al.** (2008) Cloning Stem Cells. 10. 65–74. – **Draper et al.** (2002) J Anat. 200. 249–258. – **Drukker et al.** (2002) Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 99. 9864–9869. – **Erdei et al.** (2012) Eur Biophys J. [Epub ahead of print]. – **Ezashi et al.** (2005) Proc. Natl. Acad. USA. 102. 4783–4788. – **Fu et al.** (2010) Tissue Eng Part C Methods. 16. 719–733. – **Ginis et al.** (2004) Dev Biol. 269. 360–380. – **Ilic et al.** (2012) Cytotherapy. 14. 122–128. – **Jones et al.** (2010) Stem Cells Dev. 19. 1923–1935. – **Klimanskaya et al.** (2005) Lancet. 365. 1636–1641. – **Kolhar et al.** (2010) J Biotechnol. 146. 143–146. – **Kubikova et al.** (2009) Cytotherapy. 11. 330–340. – **Lagarkova et al.** (2006) Cell Cycle. 5. 416–420. – **Lee et al.** (2012) Differentiation. 83. 92–100. – **Li et al.** (2011) Langmuir. 27. 8294–8301. – **Martin et al.** (2005) Nat. Med. 11. 228–232. – **Miyazaki et al.** (2008) Biochem. Biophys. Res. Commun. 375. 27–32. – **Nandivada et al.** (2011) Nat Protoc. 6. 1037–1043. – **Ozkinay and Mitelman** (1979) Hereditas. 90. 1–4. – **Pal et al.** (2009) Exp. Biol. Med. (Maywood). 234. 1230–1243. – **Reyes et al.** (2001) Blood. 98. 2615–2625. – **Sarkadi et al.** (2006) Physiol. Rev. 86. 1179–1236. – **Sarkadi et al.** (2009) Stem Cells. 28. 174–176. – **Stewart et al.** (2006) Nature Methods. 3. 807–815. – **Tavakoli et al.** (2009) BMC Cell Biol. 10. 44–58. – **Thomson et al.** (1998) Science. 282. 1145–1147. – **Xu et al.** (2001) Nat Biotechnol. 19. 971–974. – **Shaffer et al.** (2009). (ISCN). S. Karger, Basel.