

## ХАРАКТЕРИСТИКИ НОВЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ, ПОЛУЧЕННЫХ В КОЛЛЕКЦИИ КУЛЬТУР КЛЕТОК ПОЗВОНОЧНЫХ ИНЦ РАН В 2011—2013 гг.

*Г.Г. Полянская*

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, [poljansk@mail.cytspb.rssi.ru](mailto:poljansk@mail.cytspb.rssi.ru)

Дана краткая историческая справка о создании Российской коллекции клеточных культур и основополагающей роли в этом процессе профессора, Заслуженного деятеля науки РФ Георгия Петровича Пинаева. Изложены основные результаты научных исследований в 2011-2013 гг., свидетельствующие о продолжающемся развитии Коллекции культур клеток позвоночных (КККП) ИНЦ РАН. Описаны свойства вновь полученных клеточных линий человека. Показано, что полученные в системе фидерного и во вновь созданной системе бесфидерного культивирования линии эмбриональных стволовых клеток человека соответствуют статусу плюрипотентных стволовых клеток. Новые фибробластоподобные линии, полученные из разных источников: из эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека (линия SC5-MSC), костного мозга раннего эмбриона (линия FetMSC) и крайней плоти ребенка (линия FRSN), соответствуют статусу мезенхимных стволовых клеток (МСК) человека. Эти неиммортиализованные клеточные линии МСК человека включены в фонды КККП. Для них, согласно международным требованиям, разработаны паспорта, которые размещены на сайте Института цитологии РАН в разделе «Коллекции и каталоги» по адресу: [www.cytspb.rssi.ru](http://www.cytspb.rssi.ru)

**Ключевые слова:** коллекция культур клеток позвоночных, эмбриональные стволовые клетки человека, мезенхимные стволовые клетки человека.

Всесоюзная (Российская) коллекция клеточных культур (РККК) была создана в 1978 году. Основоположником создания РККК был профессор Георгий Петрович Пинаев. На протяжении 35 лет он являлся координатором работы РККК. Он основал ежегодный сборник «Клеточные культуры» (информационный бюллетень). Сборник содержит информацию о новых направлениях фундаментальных и прикладных исследований на клеточных культурах, о

деятельности созданной Г.П. Пинаевым Межрегиональной общественной научной организации «Ассоциация специалистов по клеточным культурам», Президентом которой он являлся до последнего дня жизни, о научных совещаниях и конференциях.

Перед Всесоюзной коллекцией была поставлена задача сбора и сохранения клеточных культур человека, животных и растений и обеспечения ими научных учреждений СССР. Главным учреждением по проблеме был определен Институт цитологии АН СССР. В настоящее время Российская коллекция клеточных культур человека, животных и растений (РККК) состоит из 9 специализированных коллекций, включающих разные по происхождению клеточные линии человека, позвоночных и беспозвоночных животных, а также растений. Коллекция культур клеток позвоночных ИНЦ РАН (КККП) является Центральным банком РККК. По своим функциональным задачам, КККП является наименее специализированной коллекцией, т.е. в фондах Коллекции представлены клеточные культуры человека и различных животных для широкого спектра фундаментальных и прикладных исследований в различных областях биологии.

Одной из основных задач любой Коллекции является ее постоянное развитие, которое в большой степени связано с расширением фондов Коллекции, т.е. с получением новых клеточных культур. Расширение фондов Коллекции культур клеток позвоночных ИНЦ РАН всегда определялось запросами фундаментальных исследований и практическими задачами здравоохранения. В связи с этим в последнее время большое внимание уделяется получению и характеристике клеточных линий, перспективных для использования в диагностике и биомедицинских технологиях. Последнее десятилетие наиболее ярко представлено развитием исследований в области стволовых клеток разного происхождения, которые дали огромный импульс для развития клеточной и молекулярной биологии, а также для решения прикладных задач в области регенеративной медицины и фармакологии.

За последние несколько лет в Коллекции культур клеток позвоночных ИНЦ РАН получено несколько постоянных линий ЭСК человека. 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.

Полученные из предимплантационных бластоцист новые постоянные линии ЭСК (SC5, SC6, SC7) прошли более 120 удвоений клеточной популяции, сохранили нормальный диплоидный кариотип и способность дифференцироваться *in vitro* в производные трех зародышевых листков. Эти линии экспрессируют маркеры недифференцированных ЭСК: Oct-4, Nanog, SSEA-4, TRA-1-60, щелочную фосфатазу. Недифференцированные клетки линий SC5, SC6 и SC7 экспрессируют гены DPPA3/STELLA, DAZL, специфичные для линии половых клеток, и не экспрессируют соматические маркеры дифференцировки. Линии SC5, SC6 и SC7, образовывали *in vivo* тератомы, содержащие производные трех зародышевых листков. Кроме того, известны данными о наличии в ряде линий ЭСК человека экспрессии генов транспортеров множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), обеспечивающих механизм защиты от повреждающих воздействий различными химическими факторами (1—3). С помощью иммунофлуоресцентного и ПЦР анализа в полученных нами линиях обнаружена экспрессия гена транспортера МЛУ ABCG2 в недифференцированных ЭСК всех линий и эмбрионидных тельцах, дифференцирующихся в течение 10 дней, тогда как экспрессия транспортера ABCB1 выявлена с помощью ПЦР анализа только в дифференцирующихся эмбрионидных тельцах всех линий. Возможно, что экспрессия транспортера ABCB1 развивается в процессе дифференцировки, как это показано для мезенхимной дифференцировки ЭСК человека (4). Совокупность представленных результатов подтверждает статус ЭСК человека (5).

Полученные линии культивировали в стандартных общепринятых для ЭСК человека условиях, включающих присутствие фидерных клеток в качестве субстрата. В роли фидерных клеток выступают фибробласты разного происхождения. Фидерные клетки экспрессируют факторы, способствующие росту ЭСК. В результате такого культивирования имеются 2 динамичные живые системы, каждая из которых зависит от условий культивирования. Таким образом, условия, созданные для ЭСК *in vitro*, менее стабильны, чем для других клеток, культивирующихся на постоянном субстрате, что может способствовать изменчивости клеточных линий ЭСК при длительном культивировании. Любой ксеногенный или аллогенный фидер не исключает риска контаминации для ЭСК. Кроме того, использование ЭСК человека для биомедицинских исследований предполагает также исключение из систем

культивирования любых ингредиентов животного происхождения (эмбриональную бычью сыворотку, некоторые добавки животного происхождения), которые также могут создать риск инфекций, в частности, способствовать контаминации вирусами и N-гликолил производным нейраминовой кислоты, инициирующей иммунный ответ после трансплантации (6—10). Поэтому преимущество при культивировании линий ЭСК имеют аутогенные фидерные клетки человека (11—16). Тем не менее, исследователи ищут пути преодоления нестабильности линий ЭСК, возможной при культивировании их на любых фидерных клетках, с исключением при культивировании ингредиентов животного происхождения.

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 (17); отдельные белки ВКМ — ламинин, фибронектин, коллаген, витронектин (18—21); искусственно синтезируемые пептиды (22); синтетические субстраты (23); белки ВКМ, синтезированные фидерными клетками (24, 25). 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 любой линии 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 линии ЭСК, помимо оптимизации условий культивирования в целом для ЭСК человека, необходим индивидуальный подход, связанный с применением некоторых методических модификаций.

В результате проведенной работы была создана бесфидерная система культивирования ЭСК человека с использованием субстрата, который составляют белки ВКМ, синтезированные фидерными клетками, представляющими собой мезенхимные стволовые клетки (SC5-MSC), полученные из исходной линии ЭСК — SC5. В составе субстрата обнаружены белки ВКМ:

фибронектин и ламинин, способствующие росту ЭСК в бесфидерных системах. Существенным компонентом этой системы является использование SC5-MSC кондиционированной среды. Получены 2 сублинии ЭСК человека: сублинию SC5-FF культивировали в аутогенной, а сублинию SC7-FF — в аллогенной бесфидерной системе. Сублинии SC5-FF и SC7-FF прошли соответственно более 300 и 115 удвоений клеточной популяции, что значительно превосходит лимит Хейфлика. Линии сохранили нормальный диплоидный кариотип и способность дифференцироваться *in vitro* в производные трех зародышевых листков. Гистохимический и иммунофлуоресцентный анализы показали, что эти сублинии экспрессируют маркеры недифференцированных ЭСК: щелочную фосфатазу, Oct-4, SSEA-4, TRA-1-81, а также антиген транспортера множественной лекарственной устойчивости ABCG2. С помощью ПЦР-анализа показано, что недифференцированные клетки линии SC5-FF, подобно исходной линии SC5, поддерживаемой в фидерной системе культивирования, экспрессируют гены *OCT4*, *NANOG* для соматических клеток и *DPPA3/STELLA*, *DAZL* для линии половых клеток. В ходе дифференцировки эмбрионидных телец экспрессия генов *OCT4*, *NANOG*, *DPPA3/STELLA* и *DAZL* постепенно снижалась, а возрастала экспрессия генов, специфичных для ранних дифференцированных клеток: *GATA4*, *AFP* (внезародышевой и зародышевой энтодермы), *PAX6* (нейроэктодермы) и *BRY* (мезодермы). Сравнительный анализ ряда характеристик ЭСК (кариотипическая структура, среднее время удвоения клеточной популяции и количество недифференцированных клеток в популяциях) не показал существенных различий между исходными линиями SC5, SC7 и полученными из них сублиниями SC5-FF, SC7-FF. Это свидетельствует о том, что бесфидерные системы культивирования, которые гораздо стабильнее любых фидерных систем, не нарушают ключевые характеристики ЭСК в течение длительного времени и могут быть рекомендованы для фундаментальных, биомедицинских и фармакологических исследований, проводимых с использованием ЭСК человека (26).

Но, тем не менее, если фундаментальные исследования, проводимые на ЭСК человека, актуальны для различных областей клеточной и молекулярной биологии, а также эмбриологии, то для использования ЭСК в прикладных биомедицинских исследованиях существует ряд препятствий (27—34).

Одним из путей использования ЭСК человека в регенеративной медицине является получение из них мультипотентных мезенхимных стволовых клеток (МСК). При этом нивелируются основные трудности, мешающие использованию ЭСК в этой области. Известно,

что МСК, полученные из разных тканей взрослого организма (так называемые «взрослые МСК»), после определенного тестирования могут относительно безопасно использоваться в клеточной терапии (35—38). Но при использовании многих типов МСК возникают проблемы, связанные с невозможностью получения большого количества клеток в связи с невысоким пролиферативным потенциалом и с применением инвазивных методов получения этих клеток от доноров. МСК, полученные из ЭСК человека, по-видимому, могут явиться альтернативной моделью для использования их в клеточной терапии. Эти клеточные популяции, сходные с взрослыми МСК по гомогенной фибробластоподобной морфологии, основным поверхностным маркерам, иммуномодулирующим свойствам и мультипотентной дифференцировке, являются неограниченным источником получения генетически однородных клеточных популяций без использования инвазивных процедур. Работы в этом направлении начались сравнительно недавно. В настоящее время известно, что МСК, выделенные из ЭСК, обладают большим, чем взрослые МСК, пролиферативным потенциалом, более низкой экспрессией генов HLA-ABC и увеличенной экспрессией ряда туморсупрессорных генов (33, 39—48). Тем не менее, активно получают и используют в прикладных биомедицинских исследованиях МСК, выделенные и из других источников, которыми являются разные ткани эмбрионов и взрослых организмов.

Показано, что важнейшим механизмом действия МСК на поврежденные ткани является способность их к миграции в эти участки и оказание трофического действия, путем секреции биоактивных факторов, изменяющих микроокружение поврежденных клеток, тем самым способствуя улучшению тканевой репарации (44, 49—52). В настоящее время в литературе широко обсуждаются механизмы тканевой репарации с помощью МСК, связанные с продукцией цитокинов и паракринных факторов. Существует и другой механизм, обеспечивающий дифференцировку МСК в функциональные клетки, которые заменяют поврежденные. Но есть ряд данных, свидетельствующих о том, что при трансплантации МСК обнаруживается низкий уровень их приживления, но при этом имеет место существенный положительный терапевтический эффект при различных повреждениях легких, почек, костей, хрящей, при диабете, инфаркте и т.д. Поэтому исследователи придают большое значение трофическому механизму действия МСК, используемых для тканевой репарации (49, 53).

Задачей нашей работы было получение и сравнительное изучение МСК, выделенных из разных источников: из ЭСК, костного мозга раннего эмбриона и крайней плоти ребенка. В результате проведенной работы получены новые неиммортизированные

фибробластоподобные клеточные линии человека: линия SC5-MSC из ЭСК, линия FetMSC из костного мозга 5—6-недельного эмбриона и линия FRSN из крайней плоти 3-х-летнего ребенка. Все линии успешно используются в качестве фидера при культивировании ЭСК человека. Среднее время удвоения клеточных популяций составляло  $25.5 \pm 0.1$  ч (SC5-MSC);  $33.5 \pm 1.4$  ч (FetMSC) и  $30.0 \pm 0.8$  ч (FRSN). Для линии SC5-MSC среднее время удвоения было достоверно меньше, чем для FetMSC ( $P < 0.01$ ). Кривые роста свидетельствуют об активной пролиферации клеток всех линий. Но наиболее активный рост наблюдался для линии SC5-MSC. Количественный и структурный кариотипический анализ показал, что эти линии имеют нормальный кариотип: 46, XX (SC5-MSC) и 46, XY (FetMSC и FRSN). Сравнительный анализ поверхностных маркеров с помощью проточной цитофлуориметрии выявил во всех линиях экспрессию поверхностных антигенов, характерных для МСК человека: CD44, CD73, CD90, CD105 и HLA-ABC и отсутствие экспрессии CD34 и HLA-DR (табл.1). Наблюдаемые межлинейные различия по ростовым характеристикам и по экспрессии CD90 и HLA-ABC не имеют принципиального значения для определения статуса МСК.

Таблица 1.

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

Маркер	SC5-MSC	FetMSC	FRSN
CD44	$99.3 \pm 0.5$	$99.5 \pm 0.1$	$98.7 \pm 0.3$
CD73	$99.6 \pm 0.2$	$99.6 \pm 0.1$	$98.9 \pm 0.4$
CD90	$57.3 \pm 1.5$	$87.4 \pm 4.6$	$98.4 \pm 0.9$
CD105	$97.5 \pm 1.4$	$95.4 \pm 2.5$	$93.8 \pm 1.3$
CD34	$0.13 \pm 0.07$	$0.20 \pm 0.08$	$0.6 \pm 0.4$
HLA-ABC	$37.0 \pm 15.0$	$26.4 \pm 0.2$	$71.5 \pm 6.4$
HLA-DR	$0.27 \pm 0.01$	$0.20 \pm 0.04$	$0.19 \pm 0.09$

Примечание: приведены средние ( $\bar{x} \pm s_x$ , %) из 4-х экспериментов.

Показана способность клеток всех линий направленно дифференцироваться в адипогенном и остеогенном направлениях (36), а также — в хондрогенном направлении

(неопубликованные данные). Все представленные характеристики подтверждают статус МСК человека.

Иммунофлуоресцентный и цитофлуориметрический анализ экспрессии поверхностных маркеров и транскрипционного фактора Oct-4, характерных для ЭСК человека, показал, что во всех 3-х линиях отсутствует экспрессия TRA-1-60 и Oct-4, а по экспрессии SSEA-4 наблюдаются межлинейные различия, не зависящие от происхождения клеток. Пока неясно, имеют ли обнаруженные межлинейные различия существенное влияние на функциональный статус МСК. С помощью иммунофлуоресцентного анализа в клетках всех линий показана экспрессия маркеров ранней дифференцировки в производные 3-х зародышевых листков, характеризующих ЭСК, что, возможно, обеспечивает широкие возможности МСК при репарации разных тканевых повреждений в зависимости от соответствующего микроокружения.

Линии ЭСК человека, полученные в разных системах культивирования, используются пока для внутренних исследований в коллекции. Тогда как полученные неиммортизированные клеточные линии МСК человека (SC5-MSC, FetMSC и FRSN) включены в фонды КККП. Для них разработаны, согласно международным требованиям, паспорта, которые размещены на сайте Института цитологии РАН в разделе «Коллекции и каталоги» по адресу: [www.cytspb.rssi.ru](http://www.cytspb.rssi.ru) Образцы этих линий предназначены для обеспечения пользователей коллекции.

### Список литературы

1. **Sarkadi B., Homolya L., Szakacs G., Varadi A.** Human Multidrug Resistance ABCB and ABCG Transporters: Participation in a Chemoimmunity Defense System. *Physiol. Rev.*, 2006, 86: 1179—1236.
2. **Sarkadi B., Orbán T.I., Szakács G., Várady G., Schamberger A., Erdei Z., Szebényi K., Homolya L., Apáti A.** Evaluation of ABCG2 expression in human embryonic stem cells: crossing the same river twice? *Stem Cells*, 2010, 28: 174—176.
3. **Erdei Z, Sarkadi B, Brózik A, Szebényi K, Várady G, Makó V, Péntek A, Orbán TI, Apáti Á.** Dynamic ABCG2 expression in human embryonic stem cells provides the basis for stress response. *Eur Biophys J.*, 2013, 42: 169—179.
4. **Barbet R, Peiffer I, Hutchins J.R, Hatzfeld A, Garrido E, Hatzfeld J.A.** Expression of the 49 human ATP binding cassette (ABC) genes in pluripotent embryonic stem cells and in early- and late-stage multipotent mesenchymal stem cells: possible role of ABC plasma membrane transporters in maintaining human stem cell pluripotency. *Cell Cycle.*, 2012, 11: 1611—1620.
5. **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, 42 (4): 249—263.



6. **Martin M.J., Muotri A., Gage F., Varki A.** Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat. Med.*, 2005, 11: 228—232.

7. **Heiskanen A., Satomaa T., Tiitinen S., Laitinen A., Mannelin 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.** N-glycolylneuraminic acid xenoantigen contamination of human embryonic and mesenchymal stem cells is substantially reversible. *Stem cells.*, 2006, 25: 197—202.

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

9. **Cobo F., Navarro J.M., Herrera M.I, Vivo A., Porcel D., Hernández C., Jurado M., García-Castro J., Menendez P.** 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.*, 2008, 10: 65—74.

10. **Kubikova I., Konecna H., Sedo O., Zdrahal Z., Rehulka P., Hribkova H., Rehulkova H., Hampl A., Chmelik J., Dvorak P.** Proteomic profiling of human embryonic stem cell-derived microvesicles reveals a risk of transfer of proteins of bovine and mouse origin. *Cytherapy*, 2009. 11: 330—340.

11. **Stojkovic P., Lako M., Stewart R., Przyborski S., Armstrong L., Evans J., Murdoch A., Strachan T., Stojkovic M.** An autogeneic feeder cell system that efficiently supports growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2005, 23: 306—314.

12. **Yoo S.J., Yoon B.S., Kim J.M., Song J.M., Roh S., You S., Yoon H.S.** Efficient culture system for human embryonic stem cells using autologous human embryonic stem cell-derived feeder cells. *Exp Mol Med.*, 2005, 37: 399—407.

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

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

15. **Fu X, Toh W.S., Liu H., Lu K., Li M., Hande M.P., Cao T.** Autologous feeder cells from embryoid body outgrowth support the long-term growth of human embryonic stem cells more effectively than those from direct differentiation. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010, 16: 719—733.

16. **Lee E.J., Kang H.J, Lee H.N., Kang S.K., Kim K.H., Lee S.W., Lee G., Park Y.B., Kim H.S.** New culture system for human embryonic stem cells: autologous mesenchymal stem cell feeder without exogenous fibroblast growth factor 2. *Differentiation.*, 2012, 83: 92—100.

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

18. **Amit M., Shariki C., Margulets V., Itskovitz-Eldor J.** Feeder and serum free culture of human embryonic stem cells. *Biol.Reprod.*, 2004, 70: 837—845.

19. **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.** Recombinant vitronectin is a functionally defined substrate that supports human embryonic stem cell self-renewal via alphavbeta5 integrin. *Stem Cells.*, 2008, 26: 2257—2265.

20. Miyazaki T., Futaki S., Hasegawa K., Sanzen N., Hayashi M., Kawase E., Sekiguchi K., Nakatsuji N., Suemori H. Recombinant human laminin isoforms can support the undifferentiated growth of human embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008, 375: 27—32.
21. Jones M.B, Chu C.H, Pendleton J.C, Betenbaugh M.J, Shiloach J, Baljinnyam B, Rubin J.S, Shamblott M.J. Proliferation and pluripotency of human embryonic stem cells maintained on type I collagen. *Stem Cells Dev.*, 2010, 19: 1923—1935.
22. Kolhar P., Kotamraju V.R., Hikita S.T., Clegg D.O., Ruoslahti E. Synthetic surfaces for human embryonic stem cell culture. *J. Biotechnol.*, 2010, 146: 143—146.
23. Nandivada H., Villa-Diaz L.G., O'Shea K.S., Smith G.D., Krebsbach P.H., Lahann J. Fabrication of synthetic polymer coatings and their use in feeder-free culture of human embryonic stem cells. *Nat Protoc.*, 2011, 6: 1037—1043.
24. Klimanskaya I., Chung Y., Meisner L., Johnson J., West M.D., Lanza R. Human embryonic stem cells derived without feeder cells. *Lancet.*, 2005, 365: 1636—1641.
25. 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. Derivation and feeder-free propagation of human embryonic stem cells under xeno-free conditions. *Cytotherapy.*, 2012, 14: 122—128.
26. 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, 54 (8): 637—651.
27. Donovan P.J., Gearhart J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature*, 2001, 414: 92—97.
28. Odorico J.S., Kaufman D.S., Thomson J.A. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells*, 2001, 19: 193—204.
29. Drukker M., Katz G., Urbach A., Urbach A., Schuldiner M., Markel G., Itskovitz-Elder J., Reubinoff B., Mandelboim O., Benvenisty N. Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2002, 99: 9864—9869.
30. Drukker M., Benvenisty N. The immunogenicity of human embryonic stem-derived cells. *Trends in Biotechnol.*, 2004, 22: 135—141.
31. Allegrucci C, Young L.E. Differences between human embryonic stem cell lines. *Hum. Reprod. Update.*, 2007, 13: 103—120.
32. Гордеева О.Ф., Миталипов Ш.М. Плюрипотентные стволовые клетки: поддержание генетической и эпигенетической стабильности и перспективы клеточных технологий. *Онтогенез*, 2008, 39 (6): 405—419.
33. Lee E.J., Lee H.N., Kang H.J., Kim K.H., Hur J., Cho H.J., Lee J., Chung H.M., Cho J., Cho M.Y., Oh S.K., Moon S.Y., Park Y.B., Kim H.S. Novel embryoid body-based method to derive mesenchymal stem cells from human embryonic stem cells. *Tissue Eng Part A*, 2010, 16: 705—715.
34. Полянская Г.Г., Кольцова А.М. Проблема нестабильности генома при культивировании эмбриональных стволовых клеток человека (обзор). *Сб. «Клеточные культуры» (информ. бюлл.)*, 2013, 29: 3—13.
35. Kita K, Gauglitz G.G, Phan T.T, Herndon D.N, Jeschke M.G. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the sub-amniotic human umbilical cord lining membrane. *Stem Cells Dev.*, 2010, 19: 491—502.
36. 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, 54 (1): 5—16.

37. **Zhang H, Zhang B, Tao Y, Cheng M, Hu J, Xu M, Chen H.** Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from whole human umbilical cord applying a single enzyme approach. *Cell Biochem Funct.*, 2012, 30: 643—649.

38. **Leyva-Leyva M, Barrera L, López-Camarillo C, Arriaga-Pizano L, Orozco-Hoyuela G, Carrillo-Casas EM, Calderón-Pérez J, López-Díaz A, Hernandez-Aguilar F, González-Ramírez R, Kawa S, Chimal-Monroy J, Fuentes-Mera L.** Characterization of mesenchymal stem cell subpopulations from human amniotic membrane with dissimilar osteoblastic potential. *Stem Cells Dev.*, 2013, 22: 1275—1287.

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

40. **Lian Q., Lye E., Suan Yeo K., Khia Way Tan E., Salto-Tellez M., Liu TM., Palanisamy N., El Oakley R.M., Lee E.H., Lim B., Lim S.K.** Derivation of clinically compliant MSCs from CD105+, CD24- differentiated human ESCs. *Stem Cells*, 2007, 25: 425—436.

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

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

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

44. **Gruenloh W., Kambal A., Sondergaard C., McGee J., Nacey C., Kalomoiris S., Pepper K., Olson S., Fierro F., Nolte J.A.** Characterization and In Vivo Testing of Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Embryonic Stem Cells. *Tissue Eng Part A.*, 2011, 17: 1517—1525.

45. **Hematti P.** Human embryonic stem cell-derived mesenchymal progenitors: an overview. *Methods Mol Biol.*, 2011, 690: 163—174.

46. **Lin W, Oh S.K, Choo A.B, George A.J.** Activated T cells modulate immunosuppression by embryonic- and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells through a feedback mechanism. *Cytotherapy*, 2012, 14: 274—284.

47. **Tan Z., Su Z.Y, Wu R.R., Gu B., Liu Y.K., Zhao X.L., Zhang M.** Immunomodulative effects of mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cells in vivo and in vitro. *J Zhejiang Univ Sci B.*, 2011, 12: 18—27.

48. **Varga N, Veréb Z, Rajnavölgyi E, Németh K, Uher F, Sarkadi B, Apáti A.** Mesenchymal stem cell like (MSCI) cells generated from human embryonic stem cells support pluripotent cell growth. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2011, 414: 474—480.

49. **Phinney D.G., Prockop D.J.** Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views. *Stem Cells*, 2007, 25: 2896—2902.

50. **Carvalho M.M., Teixeira F.G., Reis R.L., Sousa N., Salgado A.J.** Mesenchymal stem cells in the umbilical cord: phenotypic characterization, secretome and applications in central nervous system regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther.*, 2011, 6: 221—228.

51. **Guiducci S, Manetti M, Romano E, Mazzanti B, Ceccarelli C, Dal Pozzo S, Milia AF, Bellando-Randone S, Fiori G, Conforti ML, Saccardi R, Ibbá-Manneschi L, Matucci-Cerinic M.** Bone marrow-derived mesenchymal stem cells from early diffuse systemic sclerosis exhibit a paracrine machinery and stimulate angiogenesis in vitro. *Ann Rheum Dis.*, 2011, 70: 2011—2021.

52. **Luo J, Zhao X, Tan Z, Su Z, Meng F, Zhang M.** Mesenchymal-like progenitors derived from human embryonic stem cells promote recovery from acute kidney injury via paracrine actions. *Cytherapy*, 2013, 15: 649—662.
53. **Caplan A.I., Dennis J.E.** Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J. Cell Biochem.*, 2006, 98: 1076—1084.