

Научная статья
УДК 576.5+576.316
doi: 10.17223/19988591/69/21

На пути к созданию надёжных линий наивных плюрипотентных клеток человека

Александр Игоревич Шевченко¹, Амин МХД Арссан²,
Ирина Сергеевна Захарова³

^{1, 2, 3} *Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, Россия*

¹ <https://orcid.org/0000-0001-6535-1627>, epigene@bionet.nsc.ru

² <https://orcid.org/0009-0001-2087-4202>, arsanmhdamin@yandex.ru

³ <https://orcid.org/0000-0003-3643-5818>, zakharova@bionet.nsc.ru

Аннотация. Линии наивных плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) человека – новый инструмент клеточной биологии, демонстрирующий огромный потенциал для научных исследований и практического применения, однако их массовому использованию препятствуют проблемы с длительным культивированием и неспособностью запускать процесс случайной инактивации X-хромосомы (гХС1). В данной работе мы исследовали возможность запускать гХС1 в среде HENSM, предложенной ранее для получения и длительного поддержания наивных ПСК. Мы показали, что наивные ПСК можно культивировать в среде HENSM, содержащей только ингибиторы сигнальных путей дифференцировки без ростовых факторов LIF и ACTIVIN A, что способствует повышению в культуре доли клеток, экспрессирующих транскрипционный фактор LEUTX, характерный для 8С-подобных тотипотентных клеток человека, а также приводит к увеличению доли клеток, способных запускать гХС1. Полученные результаты свидетельствуют, что возможность контролировать полную реактивацию, а также ранние стадии гХС1 у человека в культурах клеток, соответствующих преимплантационным стадиям развития эмбриона, лежит за пределами наивного плюрипотентного состояния и связана с переходом к тотипотентному состоянию.

Ключевые слова: наивные плюрипотентные стволовые клетки человека, инактивация X-хромосомы, клеточные модели заболеваний человека

Источник финансирования: работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект № 24-15-00346.

Благодарности: микроскопические исследования и проточная цитометрия проводились в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН (<https://ckp.icgen.ru/ckpmain/>), финансируемом в рамках бюджетного проекта FWNR-2022-0015. Секвенирование выполняли в ЦКП «Геномика» СО РАН.

Для цитирования: Шевченко А.И., Арссан А.М., Захарова И.С. На пути к созданию надёжных линий наивных плюрипотентных клеток человека // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2025. № 69. С. 184–193. doi: 10.17223/19988591/69/21

Original article

doi: 10.17223/19988591/69/21

Towards the generation of safe naïve human pluripotent cell lines

Alexander I. Shevchenko¹, Amin Mhd Arssan², Irina S. Zakharova³

^{1, 2, 3} *Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation*

¹ <https://orcid.org/0000-0001-6535-1627>, epigene@bionet.nsc.ru

² <https://orcid.org/0009-0001-2087-4202>, arsanmhdamin@yandex.ru

³ <https://orcid.org/0000-0003-3643-5818>, zakharova@bionet.nsc.ru

Summary. Naïve pluripotent stem cells (PSCs) have become an invaluable tool for biomedical research over the last decade. They correspond to pre-implantation epiblast blastomeres and have a broad differentiation potential into embryonic and extra-embryonic derivatives. Under certain conditions, naïve PSCs can initiate X-chromosome inactivation during differentiation, but this occurs in a non-random manner, with a preference for the X-chromosome, which was already inactive prior to the PSC conversion to the naïve state. As a result, the enormous potential of naïve PSCs is not fully exploited, prompting the need to improve the conditions for the derivation and maintenance of naïve PSCs. In this study, we evaluated the ability to induce random X chromosome inactivation (rXCI) by naïve embryonic stem cells (ESCs) cultured in three modifications of HENSM medium. We returned primed HuES9 ESCs to the naïve state in three media: HENSM-LA (supplemented with the growth factors LIF and Activin A), HENSM-L (supplemented with LIF only) and basal HENSM-0 without factors. The resulting cultures demonstrated a morphology and other characteristics of naïve pluripotency (See Fig. 1a-e), including increased expression of naïve pluripotency-associated transcription factors such as *TFCP2L1*, *KLF17* and *DMNT3L* (See Fig. 1, f). Naïve HUES9 cultures grown in HENSM medium without Activin A and/or LIF show significantly higher expression of the totipotency genes *LUETX*, *TPRX1* and *ZSCAN4* ($p < 0.01$) (See Fig. 1, f) and an increase in the proportion of cells with the *LEUTX* transcription factor, characteristic of 8C-like human totipotent cells (See Fig. 2, a). Thus, the absence of growth factors in HENSM medium results in naïve cells approaching the totipotent state. We also found that naïve human PSCs maintained in HENSM medium without growth factors have a greater potential to induce rXCI during differentiation (See Fig. 2). The likelihood of rXCI triggering in naïve HuES9 ESCs in HENSM medium increases with the proportion of cells expressing totipotency markers. This suggests that the capacity for rXCI in humans is restored close to the totipotent state. These results will help to improve the conditions for the generation and maintenance of naïve human PSC, allowing their unique properties to be more widely exploited in biomedical research.

The article contains 2 Figures, 5 References.

Keywords: naïve human pluripotent stem cells, X-chromosome inactivation, cell models of human diseases

Fundings: This work was supported by the Russian Science Foundation, project № 24-15-00346.

Acknowledgments: Microscopy and flow cytometry studies were performed at the Centre for Microscopic Analysis of Biological Objects, ICiG SB RAS (<https://ckp.icgen.ru/ckpmabo/>), funded under the state project FWNR-2022-0015. Sequencing was carried out at the Genomics Centre of the SB RAS.

For citation: Shevchenko AI, Arssan AM, Zakharova IS. Towards the generation of safe naïve human pluripotent cell lines. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2025;69:184-193. doi: 10.17223/19988591/69/21

Введение

Поддерживаемые в культуре наивные плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) человека – эквивалент преимплантационных blastомеров эпибласта ранней blastоцисты – представляют собой многообещающий инструмент для научных исследований процессов раннего развития, моделирования генетически детерминированных заболеваний, разработки лекарственных препаратов, прогресса репродуктивных технологий и регенеративной медицины [1–3]. Отмечают, что в культурах наивных ПСК с низкой частотой присутствуют клетки в тотипотентном состоянии, которые морфологически неотличимы от наивных ПСК [4]. Наивные ПСК получают из линий клеток с праймированной плюрипотентностью, отражающих более поздние этапы развития постимплантационного эмбриона на стадии начала гаструляции и имеющих существенные ограничения в потенциале дифференцировки, однако стабильно поддерживающихся в культуре на протяжении неограниченного числа пассажей. Несмотря на обилие протоколов, позволяющих получать наивные ПСК человека, длительное поддержание *in vitro* клеток в состоянии наивной плюрипотентности проблематично. Используемые компоненты «наивных» сред вызывают в культурах хромосомные aberrации и необратимое деметилирование импринтированных локусов генома. Кроме того, условия культивирования наивных ПСК не способствуют полной реактивации неактивной X-хромосомы и не позволяют запускать процесс случайной инактивации X-хромосомы, являющийся важным для нормального эмбрионального и постнатального развития. В 2021 г. для культивирования наивных ПСК человека предложена среда HENSM, которая включает ингибитор сигнального пути WNT и не содержит его активаторов, что способствует поддержанию кариотипической стабильности культур [3]. Также в среде HENSM снижена концентрация компонентов, вызывающих необратимое деметилирование ДНК. Однако потенциал данной среды к регуляции процесса случайной инактивации не выяснен. Цель работы – исследование возможности регулировать процесс инактивации X-хромосомы в наивных ПСК человека с использованием среды HENSM.

Материалы и методы

В работе использовали линию эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека NuES9 (номер hPSCreg: HVRDe009-A (RRID:CVCL_0057)) с кариотипом 46, XX. Праймированные ЭСК культивировали на слое митотически инактивированных эмбриональных фибробластов мыши в среде KnockOut DMEM, содержащей 15% заменителя сыворотки KnockOut SR, 1% раствора заменимых аминокислот NEAA, 0,25 мМ 2-меркаптоэтанола, 1 мМ глутамин GlutaMax (все – Thermo Fisher Scientific), 200 мкг/мл примочиона

(InvivoGen) и 10 нг/мл bFGF (Sci-store). Индукцию и поддержание наивного состояния в клетках HuES9 осуществляли в среде HENSM-0 [3], представляющей собой смесь сред Neurobasal и DMEM-F12 в соотношении 1:1; добавки: 1% N2, 1 мМ GlutaMAX, 1% NEAA (все – Thermo Fisher Scientific), 200 мкг/мл примоцина (InvivoGen), 2% B27 (Invitrogen), 0,8 мМ dimethyl 2-oxoglutarate (Merk), 0,2% Geltrex (Invitrogen), 50 мг/мл L-ascorbic acid 2-phosphate (Merk), а также ингибиторы киназ: 1 мкМ PD0325901; 2 мкМ XAV939; 2 мкМ Gö6983, 1,2 мМ CGP77675 (все – R&D). Кроме того, использовали среды HENSM-L, отличающиеся от HENSM-0 наличием 20 нг/мл рекомбинантного LIF (Sci-store), а также HENSM-LA, в которую кроме LIF добавляли 10 нг/мл ACTIVIN A (Peprotech). Дифференцировку наивных ЭСК в производные трёх примитивных зародышевых листков, клетки трофобласта, а также получение трёхмерных клеточных бластоидов проводили по ранее опубликованным протоколам [3, 5]. Клетки культивировали при 37°C в атмосфере, содержащей 5% углекислого газа. Наличие специфических поверхностных антигенов и транскрипционных факторов в наивных ЭСК, а также маркеров дифференцировки у их производных демонстрировали с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания антителами по стандартным протоколам [3, 5]. Получение и анализ изображений проводили с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа «Nikon Ti-E» (Япония) и программы «NIS Elements AR».

Из праймированных и наивных клеток HuES9 выделяли РНК и на её основе синтезировали кДНК. Относительные уровни экспрессии генов *OCT4*, *NANOG*, *KLF17*, *TFCP2L1*, *DNMT3b*, *LEUTX*, *TPRX1* и *ZSCAN4* определяли с помощью полуколичественного ПЦР в режиме реального времени, используя метод $\Delta\Delta C_t$ с нормализацией на уровень генов домашнего хозяйства *ACTB*, *TFRC* и *B2M*. Эксперимент проводили в трёх биологических и двух технических повторностях. Последовательности праймеров и методические детали опубликованы ранее [3–5].

Долю клеток в культуре наивных ЭСК, экспрессирующих транскрипционный фактор LEUTX, характерный для 8С-подобных тотипотентных клеток человека, определяли на приборе «FACS Aria III» (BD, USA), анализируя 10^4 событий после преципитации клеток с соответствующими антителами (Thermo Fisher Scientific). В качестве негативного контроля использовали неокрашенные клетки и клетки, инкубированные с флуоресцентно мечеными IgG кролика. Эксперимент повторяли троекратно.

Характеристику активного и неактивного состояния X-хромосомы проводили методом иммунофлуоресцентного окрашивания антителами к модификации H3K27me3 (Abcam), характерной для хроматина тельца Барра, а также при помощи РНК FISH с зондом X-сцепленного гена *HUWE1* (BAC-клон RP11-975N19). При получении ампликонов X-сцепленных генов использовали следующие пары праймеров: (5'-ctcactgctgatgtgaccaga-3'; 5'-gcttgaacacagtgcctggccaaactg-3') для *IGSF1*, (5'-tcctgtcaaaatctgctcatca-3'; 5'-agctcccaagtagatgctactg-3') для *INTS6L* и (5'-gcactgatgatcgccaactc-3'; 5'-сааатагагагассасссгт-3') для *CD99*. Аллельное соотношение транскриптов

генов *IGSF1*, *INTS6L* и *CD99* X-хромосомы определяли методом пиросеквенирования ампликонов, содержащих однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), на приборе «RugomarkQ24» (QIAGEN, Германия) с использованием наборов фирмы «Интерлабсервис» (Россия). Интегральную характеристику, определяющую отклонения от случайной инактивации, рассчитывали как среднее арифметическое долей аллельной экспрессии трёх X-сцепленных генов.

Статистическую обработку результатов проводили в программах R и Excel. Достоверность отличий оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони для множественного сравнения.

Результаты исследования и обсуждение

Среда HENSM изначально предложена в двух вариантах: HENSM-LA с добавлением двух ростовых факторов LIF и ACTIVIN A, а также HENSM-L с добавлением только LIF [3]. Отмечалось, что в среде HENSM-LA клетки имеют более высокий уровень экспрессии ключевых транскрипционных факторов плюрипотентности *OCT4* и *NANOG*. Однако также известно, что усиление сигнального пути фактора роста LIF способствует инициации случайной инактивации X-хромосомы [1, 2]. Кроме того, многочисленные исследования, выполненные на разных протоколах культивирования наивных ПСК человека, свидетельствуют, что отказ от ростовых факторов не ведёт к дифференцировке клеток и основную нагрузку по поддержанию наивного плюрипотентного состояния несут используемые в средах ингибиторы сигнальных путей дифференцировки [2]. В связи с этим наблюдается тенденция к снижению концентрации ростовых факторов в «наивных» средах. Так, концентрация LIF может быть уменьшена в двадцать раз. Учитывая эти сведения, мы провели получение наивных ЭСК линии NuES9 в средах HENSM-LA и HENSM-L, а также в среде HENSM-0, не содержащей ростовых факторов, и сравнили способность наивных плюрипотентных клеток, поддерживаемых в разных условиях, инициировать случайную инактивацию X-хромосомы.

Культивируемые в трёх вариантах среды HENSM ЭСК линии NuES9 имеют куполообразную форму колоний (рис. 1, *a*), демонстрируют наличие поверхностного антигена CD75, а также транскрипционных факторов TFE3 и KLF17 (рис. 1, *b*). После перевода на среды HENSM культуры NuES9 сохраняют способность давать производные трех зародышевых листков (экто-, мезо- и энтодермы) при спонтанной дифференцировке (рис. 1, *c*), а при направленной дифференцировке образуют клетки трофобласта, позитивные по поверхностным антигенам TACSTD2 и ENPEP (рис. 1, *d*). При совместном культивировании в низкоадгезивных условиях ЭСК, полученных на средах HENSM, и их трофобластных производных два типа клеток самоорганизуются, формируя трёхмерные структуры – бластоиды, напоминающие ранние эмбрионы на стадии бластоцисты (рис. 1, *e*). Таким образом, клетки NuES9, переведённые на среды HENSM, демонстрируют ключевые свойства, характерные для культур наивных ПСК.

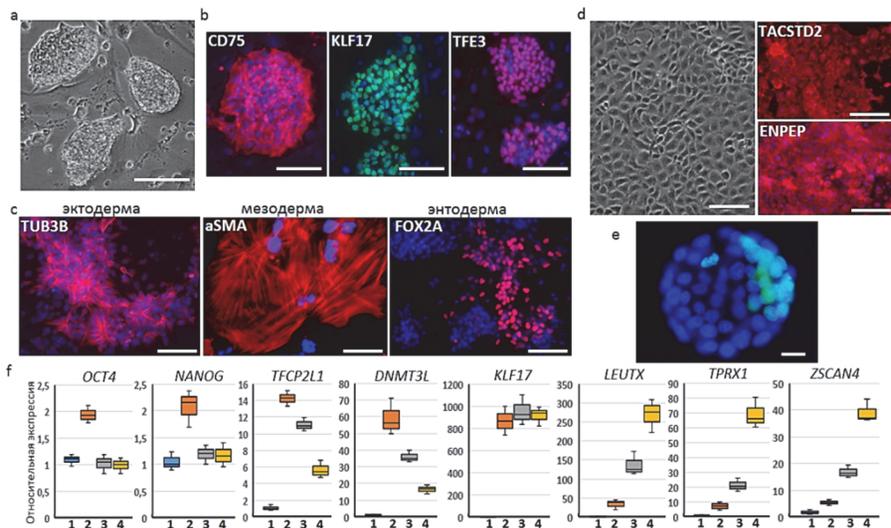


Рис. 1. Наивные ЭСК человека линии NuES9, полученные в средах HENSM: *a* – морфология колоний наивных ЭСК, *b* – иммунофлуоресцентная детекция специфических для наивного состояния ЭСК поверхностного антигена CD75 (красный), а также транскрипционных факторов TFE3 (зеленый) и KLF17 (красный), *c* – иммунофлуоресцентная детекция маркеров эктодермы (TUB3B, красный), мезодермы (α SMA, красный), энтодермы (FOX2A, красный) после спонтанной дифференцировки наивных ЭСК в производные трёх зародышевых листков, ядра окрашены DAPI (синий), линейка – 100 мкм, *d* – морфология клеток ранней трофэктодермы, производных наивных ЭСК, и их иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к поверхностным маркерам TACSTD2 (красный) и ENPEP (красный), ядра окрашены DAPI (синий), линейка – 100 мкм, *e* – репрезентативное изображение бластоида, полученного путем самоагрегации наивных ЭСК (окрашены зелёным с помощью антител к OCT4) и их трофэктодермальных производных (синий, ядра окрашены DAPI), линейка 10 мкм, *f* – относительный уровень экспрессии мРНК генов (ось Y) общей плюрипотентности (*OCT4*, *NANOG*), наивной плюрипотентности (*TFCP2L1*, *DNMT3L*, *KLF17*) и тотипотентности (*LEUTX*, *TPRX1*, *ZSCAN4*) в культурах праймированных ЭСК (1) и наивных ЭСК, поддерживаемых в средах HENSM-LA (2), HENSM-L (3) и HENSM-0 (4)

[Fig. 1. Naïve human ESCs of NuES9 line expanded in HENSM media: *a* - morphology of naïve ESC colonies, *b* - immunofluorescence detection of naïve-specific ESC surface antigen CD75 (red) as well as transcription factors TFE3 (green) and KLF17 (red), *c* - immunofluorescence detection of ectoderm (TUB3B, red), mesoderm (α SMA, red), endoderm (FOX2A, red) after spontaneous differentiation of naïve ESCs into derivatives of three germ layers, nuclei are stained with DAPI (blue), scale bar is 100 μ m, *d* - morphology of early trophoblast cells derived from naïve ESCs, and their immunofluorescence staining with antibodies to surface markers TACSTD2 (red) and ENPEP (red), nuclei are stained with DAPI (blue), scale bar is 100 μ m, *e* - representative image of blastoid obtained by self-aggregation of naïve ESCs (stained green, using antibodies to OCT4) and their trophoblast derivatives (blue, nuclei are stained with DAPI), scale bar is 10 μ m, *f* - relative mRNA expression level of genes (Y-axis) of general pluripotency (*OCT4*, *NANOG*), naïve pluripotency (*TFCP2L1*, *DNMT3L*, *KLF17*) and totipotency (*LEUTX*, *TPRX1*, *ZSCAN4*) in cultures of primed ESCs (1) and naïve ESCs maintained in HENSM-LA (2), HENSM-L (3) and HENSM-0 (4) media]

Основные эндогенные факторы транскрипции плюрипотентности *OCT4* и *NANOG* по результатам ПЦР в режиме реального времени демонстрируют высокие уровни экспрессии в наивных ЭСК, при этом в культурах HENSM-L и HENSM-0 они сопоставимы с таковыми в праймированных ЭСК, а в клетках

HENSM-LA имеют статистически более высокий уровень ($p < 0,01$) (рис. 1, f). В наивных ЭСК по сравнению с праймированными обнаруживается статистически более высокий уровень мРНК генов *TFCP2L1*, *DNMT3L* и *KLF17* ($p < 0,01$). Однако относительная экспрессия *TFCP2L1* и *DNMT3L* значимо ниже ($p < 0,01$) в клетках HENSM-L и HENSM-0 по сравнению с таковой в клетках HENSM-LA. В то же время клетки HENSM-L и HENSM-0 по сравнению с праймированными ЭСК и клетками HENSM-LA имеют повышенный уровень мРНК генов *LEUTX*, *TPRX1* и *ZSCAN4* ($p < 0,01$), высокая экспрессия которых характерна для 8С-подобных тотипотентных клеток человека. Таким образом, можно предположить, что в культурах клеток HENSM-L и HENSM-0 увеличивается доля клеток, экспрессирующих гены, свойственные тотипотентному состоянию.

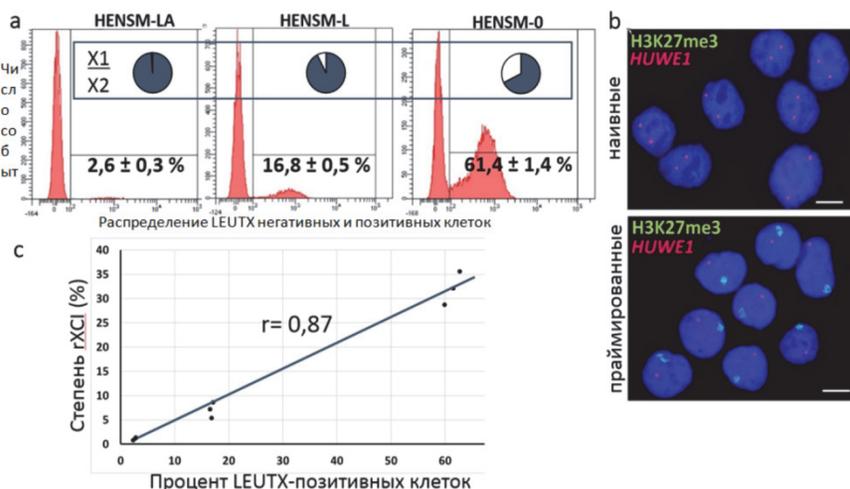


Рис. 2. Корреляция между долей клеток с маркером тотипотентности LEUTX в культуре наивных ЭСК и их способностью воспроизводить случайную инактивацию X-хромосомы: *a* – количественная оценка доли клеток с маркером LEUTX, культивируемых в средах HENSM-LA, HENSM-L и HENSM-0 (на графиках проточной цитометрии приведена средняя величина со стандартным отклонением), круговые диаграммы показывают соотношения экспрессии аллелей (X1/X2) генов X-хромосомы после запуска инактивации, *b* – эпигенетический статус X-хромосом в культурах наивных и повторно праймированных ЭСК, репрезентативные изображения иммунофлуоресцентного окрашивания ядер ЭСК с антителами к модификации H3K27me3 (зеленый) и РНК FISH с зондом X-сцепленного гена *HUWE1* (красный); ядра окрашены DAPI (синий), линейка – 10 мкм, *c* – график зависимости степени случайной инактивации (ось Y) от доли клеток с маркером тотипотентности LEUTX (ось X), величина, определяющая степень случайной инактивации (rXCI), рассчитана как среднее арифметическое долей аллельной экспрессии трёх X-сцепленных генов [Fig. 2. Correlation between the proportion of cells with LEUTX totipotency marker in naïve ESCs culture and their ability to reproduce random X chromosome inactivation: *a* - quantification of the proportion of cells with LEUTX marker, cultured in HENSM-LA, HENSM-L and HENSM-0 media (mean value with standard deviation are indicated on the flow cytometry plots), the pie charts show the allele expression ratio (X1/X2) of X chromosome genes after inactivation onset, *b* - epigenetic status of X chromosomes in cultures of naïve (top image) and re-primed ESCs (bottom image), representative immunofluorescence images of ESC nuclei stained with antibodies to H3K27me3 (green) and RNA FISH with the probe to the X-linked gene *HUWE1* (red); nuclei are stained with DAPI (blue), scale bar is 10 μm , *d* - correlation plot between the degree of random inactivation (Y-axis) and the proportion of cells with LEUTX totipotency marker X-axis, the value determining the degree of random inactivation was calculated as the mean of the allelic expression from 3 X-linked genes]

Анализ культур клеток методом проточной цитометрии показал, что доля клеток с маркером LEUTX, свойственным 8С-подобным тотипотентным клеткам человека, статистически значимо повышается в культурах наивных ПСК HENSM-L и HENSM-0, в которых отсутствуют ростовые факторы ACNIVIN A и/или LIF (см. рис. 2, а). Максимальная доля LEUTX-позитивных клеток при этом выявлена в среде HENSM-0, не содержащей ростовых факторов.

Далее мы показали, что в культурах наивных ЭСК HENSM-LA, HENSM-L и HENSM-0 наблюдается биаллельная экспрессия гена *HUWE1* (два сигнала в ядре) и отсутствие аккумуляции H3K27me3 на X-хромосоме, что свидетельствует о том, что обе X-хромосомы в ядрах активны (рис. 2, б). После возврата наивных ЭСК в праймированное состояние в клетках наблюдается моноаллельная экспрессия гена *HUWE1* (один сигнал в ядре) и детектируется область ядра, в которой происходит аккумуляция модификации H3K27me3, характерной для хромосомной территории, инактивированной X-хромосомы. Наивные ЭСК NuES9 в культурах HENSM-LA, HENSM-L и HENSM-0 имеют две активные X-хромосомы в 97–99% клеток ($N = 300$), а при возвращении наивных ЭСК в праймированное состояние в 94–97% клеток ($N = 300$) наблюдается инактивация X-хромосомы (рис. 2, б). Получена кДНК повторно праймированных клеток HENSM-LA, HENSM-L и HENSM-0, демонстрирующих инактивацию, и синтезированы ампликоны трёх генов в участках, содержащих SNP. Определение нуклеотидной последовательности ампликонов с помощью пиросеквенирования позволило установить долю каждого аллеля X-хромосом после инактивации. Праймированные производные клеток HENSM-LA показывают экспрессию преимущественно одного аллеля, что свидетельствует о практически полной случайной инактивации. В праймированных производных культур HENSM-L и HENSM-0 доля второго аллеля увеличивается, коррелируя с увеличением доли клеток с маркером тотипотентности LEUTX (рис. 2, а, с).

Таким образом, возврат праймированных ПСК в состояние, эквивалентное преимплантационным бластомерам, возможен в средах, содержащих исключительно ингибиторы киназ сигнальных путей дифференцировки без использования ростовых факторов. Можно предположить, что наличие ростовых факторов в среде HENSM усиливает плюрипотентность, тогда как отказ от ростовых факторов возвращает клетки на более ранние стадии эмбрионального развития, близкие к тотипотентному состоянию. Другой важный вывод этого исследования заключается в том, что клетки человека в состоянии наивной плюрипотентности, по-видимому, не способны запускать процесс случайной инактивации, и выбор X-хромосомы для инактивации на данной стадии уже предопределён. Отмена ростовых факторов в среде HENSM вызывает увеличение доли клеток, близких к тотипотентному состоянию, у которых появляется возможность выбора будущей неактивной X-хромосомы и запуска случайной инактивации. Результаты работы можно использовать для дальнейшей оптимизации протоколов получения и поддержания культур клеток, имитирующих преимплантационное развитие зародыша, обладающих кариотипической и эпигенетической стабильностью

и способных в полной мере воспроизводить ключевые процессы раннего эмбрионального развития.

Заключение

В результате работы показано, что способность культуры наивных плюрипотентных клеток человека воспроизводить процесс случайной инактивации X-хромосомы напрямую зависит от доли клеток в культуре, демонстрирующих переход к тотипотентному состоянию. Этот результат свидетельствует, что возможность исследовать и контролировать полную реактивацию, а также ранние стадии процесса инактивации X-хромосомы у человека в культурах клеток, соответствующих преимплантационным стадиям развития эмбриона, лежит за пределами наивного плюрипотентного состояния клеток и связана с их переходом к тотипотентному состоянию. В дальнейшем необходимо подтвердить полученные выводы, используя большее число линий ПСК.

Список источников

1. Collier A.J., Rugg-Gunn P.J. Identifying Human Naïve Pluripotent Stem Cells - Evaluating State-Specific Reporter Lines and Cell-Surface Markers // *BioEssays*. 2018. Vol. 40, № 5. 1700239. doi: 10.1002/BIES.201700239
2. Zhou J., Hu J., Wang Y., Gao S. Induction and application of human naive pluripotency. *Cell Reports*. 2023. Vol. 42, № 4. 112379. doi: 10.1016/J.CELREP.2023.112379
3. Bayerl J., Ayyash M., Shani T., Manor Y.S., Gafni O., Massarwa R., Kalma Y., Aguilera-Castrejon A., Zerbib M., Amir H., Sheban D., Geula S., Mor N., Weinberger L., Naveh Tassa S., Krupalnik V., Oldak B., Livnat N., Tarazi S., Tawil S., Wildschutz E., Ashoukhi S., Lasman L., Rotter V., Hanna S., Ben-Yosef D., Novershtern N., Viukov S., Hanna J.H. Principles of signaling pathway modulation for enhancing human naive pluripotency induction // *Cell Stem Cell*. 2021. Vol. 28, № 9. PP. 1549–1565.e12. doi: 10.1016/J.STEM.2021.04.001
4. Yu X., Liang S., Chen M., Yu H., Li R., Qu Y., Kong X., Guo R., Zheng R., Izsvák Z., Sun C., Yang M., Wang J. Recapitulating early human development with 8C-like cells // *Cell Reports*. 2022. Vol. 39, № 12. 110994. doi: 10.1016/j.celrep.2022.110994
5. Shevchenko A.I., Arssan A.M., Zakian S.M., Zakharova I.S. Chemokine CCL2 Activates Hypoxia Response Factors Regulating Pluripotency and Directed Endothelial Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells // *Russian Journal of Developmental Biology*. 2023. Vol. 54, № 2. PP. 134–146. doi: 10.1134/s1062360423020054

References

1. Collier AJ, Rugg-Gunn PJ. Identifying Human Naïve Pluripotent Stem Cells - Evaluating State-Specific Reporter Lines and Cell-Surface Markers. *BioEssays*. 2018;40(5):1700239. doi: 10.1002/BIES.201700239
2. Zhou J, Hu J, Wang Y, Gao S. Induction and application of human naive pluripotency. *Cell Reports*. 2023;42(4):112379. doi: 10.1016/J.CELREP.2023.112379
3. Bayerl J, Ayyash M, Shani T, Manor YS, Gafni O, Massarwa R, Kalma Y, Aguilera-Castrejon A, Zerbib M, Amir H, Sheban D, Geula S, Mor N, Weinberger L, Naveh Tassa S, Krupalnik V, Oldak B, Livnat N, Tarazi S, Tawil S, Wildschutz E, Ashoukhi S, Lasman L, Rotter V, Hanna S, Ben-Yosef D, Novershtern N, Viukov S, Hanna JH. Principles of signaling pathway modulation for enhancing human naive pluripotency induction. *Cell Stem Cell*. 2021;28(9):1549-1565.e12. doi: 10.1016/J.STEM.2021.04.001

4. Yu X, Liang S, Chen M, Yu H, Li R, Qu Y, Kong X, Guo R, Zheng R, Izsvák Z, Sun C, Yang M, Wang J. Recapitulating early human development with 8C-like cells. *Cell Reports*. 2022;39(12):110994. doi: 10.1016/j.celrep.2022.110994
5. Shevchenko AI, Arssan AM, Zakian SM, Zakharova IS. Chemokine CCL2 Activates Hypoxia Response Factors Regulating Pluripotency and Directed Endothelial Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells. *Russian Journal of Developmental Biology*. 2023;54(2):134-146. doi: 10.1134/s1062360423020054

Информация об авторах:

Шевченко Александр Игоревич, канд. биол. наук, с.н.с. лаборатории клеточных 3D-моделей атеросклероза ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6535-1627>

E-mail: epigene@bionet.nsc.ru

Арссан МХД Амин, м.н.с. межинститутской лаборатории молекулярной палеогенетики и палеогеномики ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-2087-4202>

E-mail: arsanmhdamin@yandex.ru

Захарова Ирина Сергеевна, канд. биол. наук, зав. лабораторией клеточных 3D-моделей атеросклероза ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3643-5818>

E-mail: zakharova@bionet.nsc.ru

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Information about the authors:

Alexander I. Shevchenko, PhD (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of 3D Cellular Models of Atherosclerosis, Institute of Cytology and Genetics SB RAS (Novosibirsk, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6535-1627>

E-mail: epigene@bionet.nsc.ru

Amin Mhd Arssan, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Palaeogenetics and Palaeogenomics, Institute of Cytology and Genetics SB RAS (Novosibirsk, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-2087-4202>

E-mail: arsanmhdamin@yandex.ru

Irina S. Zakharova, PhD (Biol.), Head of the Laboratory of 3D Cellular Models of Atherosclerosis, Institute of Cytology and Genetics SB RAS (Novosibirsk, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3643-5818>

E-mail: zakharova@bionet.nsc.ru

The Authors declare no conflict of interest.

*Статья поступила в редакцию 29.08.2024;
одобрена после рецензирования 20.11.2024; принята к публикации 03.03.2025.*

*The article was submitted 29.08.2024;
approved after reviewing 20.11.2024; accepted for publication 03.03.2025.*