

## ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА НЕИММОРТАЛИЗОВАННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КОЖИ ВЕК ВЗРОСЛЫХ ДОНОРОВ РАЗНОГО ВОЗРАСТА

© Т. А. Крылова, А. С. Мусорина, В. В. Зенин, А. М. Кольцова,  
И. В. Кропачева, В. И. Турилова, Т. К. Яковлева, Г. Г. Полянская<sup>1</sup>

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194964;

<sup>1</sup> электронный адрес: poljansk@incras.ru

Получены новые неиммортизированные клеточные линии человека из кожи век трех взрослых доноров в возрасте 37, 45 и 53 года, названные DF-1, DF-2 и DF-3 соответственно. Проведен сравнительный анализ ростовых характеристик и дифференцировочного потенциала этих линий и подтвержден их статус как линий мезенхимных стволовых клеток. Основные характеристики получены на 6-м пассаже. Среднее время удвоения клеточных популяций составляет 40, 35 и 33 ч для линий DF-1, DF-2 и DF-3 соответственно. Наблюдаемые различия по ростовым характеристикам клеточных линий не отражают возрастной зависимости, т. е. увеличения среднего времени удвоения с увеличением возраста от 37 до 53 лет, а, скорее, могут быть связаны с генетическими особенностями доноров. Кривые роста свидетельствуют об активной пролиферации всех линий. Эффективность клонирования невысокая, но одинаковая для всех линий. Вступление клеток в фазу репликативного старения наблюдается на 25-м пассаже, что составляет более 50 удвоений клеточных популяций и свидетельствует о неиммортизованности линий. Количественный и структурный кариотипический анализ показал, что линии имеют нормальный кариотип 46, XX. Но для линий DF-1 и DF-3 показано наличие ряда неклональных хромосомных перестроек. Для определения статуса линий провели сравнительный анализ поверхностных маркеров с помощью проточной цитофлуориметрии. Анализ выявил во всех линиях экспрессию поверхностных антигенов, характерных для МСК человека (CD44, CD73, CD90, CD105 и HLA-ABC), и отсутствие экспрессии CD34, CD45 и HLA-DR. Иммунофлуоресцентный анализ показал наличие экспрессии виментина во всех линиях, подтвердив статус МСК. Показана экспрессия коллагена 1-го типа, характеризующего фибробласты. Проточная цитофлуориметрия и иммунофлуоресцентный анализ показали наличие экспрессии маркера недифференцированных эмбриональных стволовых клеток — SSEA-4 — и маркеров их ранней дифференцировки в производные трех зародышевых листков, что, по-видимому, обеспечивает широкие возможности линий дермальных фибробластов при репарации разных тканевых повреждений. Показана способность клеток всех линий дифференцироваться в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях. В линии DF-3 уровень остеогенной дифференцировки значительно ниже, чем в DF-1 и DF-2. Возможно, что низкий уровень дифференцировки связан с большим возрастом донора (53 года). По остальным характеристикам зависимости от возраста донора (37—53 года) не обнаружено.

**Ключевые слова:** дермальные фибробласты, мезенхимные стволовые клетки человека, возраст донора, пролиферация, поверхностные клеточные маркеры, кариотип, дифференцировка.

Фибробласты — это основные клетки соединительных тканей, происходящие в основном из мезенхимных стволовых клеток (МСК). Основная функция фибробластов состоит в синтезе белков внеклеточного матрикса (ВКМ). ВКМ способствует поддержанию многоклеточных структур и создает каркас, внутри которого клетки могут мигрировать и взаимодействовать друг с другом с помощью разных межклеточных контактов. Связывание молекул ВКМ с интегринами ведет к активации локальных белковых киназ, которые активируют сигнальные пути, способствующие нормальной жизнедеятельности клеток (Freeman et al., 1991; Stallmach et al., 1994; Basson et al., 1996; Ziober et al., 1999; Ingber, 2002; Mostafavi-Pour et al., 2003; Ahmed et al., 2005; Kato et al., 2006; Wang, Milner, 2006; Van Laake et al., 2010; Кольцова и др., 2012;

Полянская, Кольцова, 2013; Bruekers et al., 2016). Фибробласты могут быть разной степени дифференцировки. Наименее дифференцированные фибробласты обладают высокой секреторной и пролиферативной активностью.

Сравнительный анализ поверхностных маркеров, дифференцировочного потенциала и иммуногенных свойств выявил сходство между МСК и фибробластами (Lorenz et al., 2008; Haniffa et al., 2009; Huang et al., 2010; Blasi et al., 2011; Halfon et al., 2011; Крылова и др., 2012; Zhang et al., 2014; Brandau et al., 2015; Ma et al., 2015). Клетки обоих типов имеют ряд характеристик, подтверждающих статус МСК: адгезивность к культуральному пластику; активная пролиферация; наличие экспрессии поверхностных маркеров CD105, CD90, CD73, CD44 и HLA-ABC и отсутствие экспрессии CD34, CD45 и HLA

DR; способность к дифференцировке в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях. Эти характеристики соответствуют требованиям, предъявляемым к статусу МСК Международным обществом клеточной терапии (Domonici, 2006; Sensebe et al., 2010).

Сходство фибробластов и МСК по основным критериям определяется, по-видимому, общностью выполняемых функций, связанных с синтетической и регенеративной способностью этих клеток. В связи с тем что функциональная активность клеток в большой степени определяется конкретными условиями микроокружения, ряд свойств фибробластов, выделенных из разных органов, может различаться. Так, показано, что эмбриональные и постнатальные фибробласты, выделенные как из разных анатомических районов кожи, так и из других органов, различаются по уровню экспрессии генов NOX, регулирующих синтез внеклеточного матрикса, липидный обмен, а также сигнальные пути, контролирующие пролиферацию, клеточную миграцию и дифференцировку (Chang et al., 2002). Показаны различия по дифференцировочному потенциалу между дермальными стволовыми клетками, находящимися в разных нишах волосяного фолликула (Varniarsky et al., 2015).

С учетом разнообразия источников, из которых выделены МСК и соответственно их разного микроокружения проводится много сравнительных исследований характеристик МСК. Полученные результаты свидетельствуют о количественных различиях по характеристикам, определяющим статус МСК, а также по другим важнейшим клеточным свойствам (Shih et al., 2005; Roubelakis et al., 2007; Riekstina et al., 2009; Barbet et al., 2011; Lai et al., 2011; Varga et al., 2011; Ge et al., 2012; Крылова и др., 2012; de Peppo et al., 2013; Yan et al., 2013; Isobe et al., 2015; Trivanovic et al., 2015; Yusoff et al., 2015; Ren et al., 2016). Кроме того, обнаружены различия между МСК и фибробластами, в основном по маркерам, не относящимся к тем, которые определяют статус МСК. В частности, показано, что МСК, полученные из жировой ткани, обладают значительно более высоким ангиогенным и противовоспалительным потенциалом, чем фибробласты (Blasi et al., 2011). Авторы предполагают, что частично эти различия могут быть связаны с тем, что МСК являются менее дифференцированными клетками, чем дермальные фибробласты (ДФ). С помощью иммунофлуоресцентного и молекулярно-генетического анализа показаны количественные различия между МСК и ДФ по экспрессии ряда генов, связанных, в частности, с пролиферацией и дифференцировкой (Ishii et al., 2005; Bae et al., 2009; Halfon et al., 2011; Woo et al., 2016).

С учетом происхождения как МСК, так и фибробластов из разных источников надо с осторожностью относиться к обнаруженным различиям между этими клетками. Так, показано, что экспрессия маркера CD146, связанного с клеточной дифференцировкой и миграцией, присутствует в МСК костного мозга и отсутствует в ДФ, тогда как в МСК из жировой ткани этот маркер есть, подобно ДФ, но экспрессирован минимально (на уровне 1—2 %). Возможно, подобные различия связаны с микроокружением, в котором функционируют конкретные МСК. Показано также, что уровень экспрессии генов может колебаться в зависимости от количества пройденных клетками пассажей (Blasi et al., 2011; Halfon et al., 2011; Choi et al., 2015; Somasundaram et al., 2015; Kundrotas et al., 2016).

Рассматривая проблему старения МСК, некоторые авторы пришли к заключению о том, что оно может быть связано не только с клеточным (репликативным) старением, которое прослеживается при длительном пассировании МСК в условиях *in vitro*, но и с внешними по отношению МСК факторами, т. е. с микроокружением. Старение организма обусловлено несколькими механизмами, в частности: укорочением теломер вследствие выключения теломеразы, что является основой репликативного старения; генетическими и митохондриальными повреждениями ДНК; увеличением содержания активных форм кислорода (АФК). Эти механизмы затрагивают как МСК или ДФ, так и микроокружение. В связи с этим взаимодействие МСК и микроокружения обеспечивает ухудшение возрастных характеристик МСК (Sethe et al., 2006; Tobin, 2016). Следует подчеркнуть, что в литературе имеются данные о зависимости характеристик МСК и ДФ от возраста донора, т. е. чем моложе донор, тем активнее проявляются свойства, ответственные, в частности, за пролиферативную активность и дифференцировочный потенциал. Но при этом не всегда одновременно и единообразно возраст влияет на все характеристики (Gago et al., 2009; Siegel et al., 2013; Kornicka et al., 2015; Maredziak et al., 2016).

Рассмотрим работу (Kornicka et al., 2015). Авторы изучали характеристики МСК жировой ткани в зависимости от возраста донора (23—77 лет) и убедительно показали увеличение содержания АФК и снижение антиоксидантной активности при увеличении возраста; на этом фоне происходят снижение пролиферативного потенциала, увеличение апоптоза и количества стареющих клеток, снижение остеогенного дифференцировочного потенциала. В другом исследовании МСК костного мозга человека показано существенное влияние гипоксии на ряд характеристик (Mohd et al., 2016). В частности, МСК от доноров моложе 30 лет имеют значительно более высокий пролиферативный и дифференцировочный потенциал, чем МСК от доноров старше 60 лет. Но культивирование в условиях гипоксии увеличивает потенциал МСК как молодых, так и старых доноров. Таким образом, изменение условий культивирования может положительным образом повлиять на свойства МСК.

Экспрессия ряда генов, ответственных за процесс заживления ран, имеет более высокий уровень в эмбриональных фибробластах по сравнению с клетками крайней плоти (Hirt-Burri et al., 2008). Показано, что 47 % генов, участвующих в процессе заживления ран и регулирующих клеточную адгезию, ВКМ, клеточный цикл, иммунный ответ и клеточные сигнальные пути, экспрессированы на более высоком уровне в эмбриональных ДФ, чем у взрослых ДФ (Ramelet et al., 2009). Есть также данные, свидетельствующие об отсутствии зависимости пролиферативного и дифференцировочного потенциала от возраста донора, в частности при исследовании характеристик МСК, полученных из миндалин (Choi et al., 2015). Анализ разных литературных источников, демонстрирующих зависимость характеристик МСК от возраста донора, показывает неоднозначность экспериментальных результатов. По-видимому, это связано как с разными источниками получения МСК и ДФ, так и с разными условиями выделения и культивирования клеток. Обобщение имеющихся результатов приводит к выводу о том, что для регенеративной медицины надежнее использовать стволовые клетки от молодых доноров (Gago et al., 2009). Тем не менее каждая конкретная прикладная био-

медицинская задача требует индивидуального подбора клеточных культур.

ДФ в отличие от фибробластов других органов легко выделяются из разных участков кожи с помощью биопсии. Популяции ДФ, обладающие сходством с МСК по высоким пролиферативному и дифференцировочному потенциалам, являются удобным объектом, как для изучения биологии стволовых клеток, так и для прикладных исследований в области регенеративной медицины. Надо подчеркнуть, что при подборе взрослых стволовых клеток для использования в регенеративной медицине немаловажную роль играют следующие критерии: выделение клеток при минимальном дискомфорте для пациента; минимальное время обработки клеток для получения необходимой для клинического использования биомассы; отсутствие возрастной зависимости между свойствами стволовых клеток и возрастом донора (Choi et al., 2015). Однако из результатов, известных в настоящее время, следует, что в целом возрастная зависимость, как правило, в большей или меньшей степени присутствует. Поэтому имеет смысл подбирать оптимальные возрастные категории доноров для конкретной задачи.

Ранее нами были получены и охарактеризованы неиммортиализованные клеточные линии МСК человека, выделенные из разных источников: эмбриональных стволовых клеток, 5—6-недельного эмбриона (из костного мозга и мышцы конечности) и крайней плоти 3-летнего ребенка. В результате проведенной работы был подтвержден статус МСК клеток всех исследованных линий (Крылова и др., 2012, 2014).

С учетом широкого использования ДФ для прикладных биомедицинских исследований задачами данной работы явились получение и сравнительная характеристика трех линий ДФ, выделенных из кожи век взрослых доноров разного возраста (37, 45 и 53 года), и сравнение их с ранее полученными линиями МСК. Интерес к такому исследованию связан еще и с тем, что в лаборатории ведутся работы по разработке биотехнологий, связанных с ДФ. Согласно международным требованиям (FDA), стволовые клетки, используемые в регенеративной медицине, должны быть охарактеризованы по ряду признаков, в том числе по пролиферативному и дифференцировочному потенциалам, особенностям кариотипа, жизнеспособности и стерильности (Vapniarsky et al., 2015).

## Материал и методика

ДФ были получены от трех доноров женского пола в возрасте 37, 45 и 53 года. Клетки были любезно предоставлены на нулевом пассаже О. И. Александровой. Далее клетки культивировали в ростовой среде, содержащей 90 % среды DMEM/F12 (Gibco-Invitrogene, США) и 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) (Hyclone, США), в условиях 5 % CO<sub>2</sub> при 37 °С и влажности 90 %. Среду меняли каждые 2—3 сут до образования кон플юэнта. Затем проводили еще 5 пассажей, получив в результате неиммортиализованные клеточные линии, названные ДФ-1, ДФ-2 и ДФ-3, соответствующие возрасту доноров 37, 45 и 53 года. Все характеристики этих линий проводили на 6-м пассаже. Микробиологический анализ подтвердил отсутствие бактериальной, грибковой и микоплазменной контаминации.

Эффективность клонирования клеточных линий определяли в чашках Петри в условиях редкого

пассажа (3—4 кл./см<sup>2</sup>). Через 12 сут клетки окрашивали раствором кристалл-виолета и на чашках Петри считали число колоний, состоящих из не менее чем 50 клеток. Эффективность клонирования определяли отношением числа выросших колоний (клонов) к числу посеянных клеток в %.

Морфологический анализ линий проводили под инвертированным микроскопом (NICON, Япония).

Для характеристики пролиферативной активности оценивали индекс пролиферации (ИП) — отношение числа клеток в данный момент к исходному числу посеянных клеток — и строили кривые роста клеточных популяций. Для измерения среднего времени удвоения клеточной популяции каждый экспериментальный вариант повторяли 3—4 раза, ежедневно считая клетки в течение 5 сут (120 ч). Среднее время удвоения клеточной популяции ( $a_0$ ) определяли по формуле (Седова, 2008):

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

где  $M_t$  — количество клеток в момент времени  $t$ ;  $M_0$  — начальное количество клеток;  $t$  — время логарифмической фазы роста клеточной культуры. Анализ пролиферативной активности описанным методом проводили на 6-м и 20-м пассажах.

Старение клеток определяли с помощью активности фермента SA-β-галактозидазы. ДФ выращивали в 3,5-сантиметровых чашках Петри до образования конфлюэнта. Затем среду удаляли и окрашивали клетки с помощью Senescence SA-β-galactosidase staining kit (Cell Signaling, США) при pH 6.0 согласно инструкции. Клетки, вступающие в фазу репликативного старения, имеют ярко-синюю цитоплазматическую окраску. Анализ проводили на 6, 20 и 25-м пассажах с помощью инвертированного микроскопа (NICON, Япония).

Кариотипический анализ проводили на 6-м пассаже. Для получения препаратов метафазных хромосом за 2 ч до фиксации в культуру ДФ вводили колцемид KaryoMAX (0.1 мкг/мл, Gibco), клетки диссоциировали с помощью смеси трипсина и версена (1 : 3) и проводили гипотоническую обработку смесью 0.075 М раствора KCl и 1%-ного раствора цитрата натрия. Клетки 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). Модальное число хромосом и пределы изменчивости клеток по числу хромосом для каждой линии определяли при анализе 100 метафаз; долю полиплоидных клеток определяли при анализе 500 метафаз.

Для структурного кариотипического анализа проводили дифференциальное G-окрашивание хромосом в соответствии с ранее описанной методикой (Ozkinay, Mitelman, 1979). Анализировали 30 метафаз для каждой линии. Кариотип линии анализировали с помощью микроскопа Axio Imager.M1 (Carl Zeiss, ФРГ) с системой автоматического кариотипирования Ikaros 4 karyotyping system (MetaSystems, ФРГ) и описывали в соответствии с Международной системой цитогенетической номенклатуры хромосом человека ISCN (Shaffer et al., 2009).

Для определения статуса полученных клеточных линий анализировали экспрессию поверхностных антигенов с помощью проточной цитофлуориметрии на цитометре Beckman Coulter (США). Экспрес-



сию каждого маркера оценивали по результатам трех экспериментов для клеток, находящихся на 6-м пассаже. Иммунофенотипирование полученных клеточных линий проводили с помощью панели конъюгатов CD-маркерных моноклональных антител с флуорохромами. В работе использовали моноклональные антитела против CD-34, HLA-ABC и HLA-DR (Caltac, США), CD-44, CD-73 и CD-105 (Beckman Coulter, США), CD-90 и SSEA-4 (Chemicon, США). В качестве негативного контроля использовали очищенные мышинные антитела IgG1/Fitc и IgG1/RFE (ДАКО, Дания). Клетки снимали с поверхности чашки с помощью 0.05%-ного раствора трипсина с версеном (Gibco, США) и отмывали от него раствором PBS, не содержащим ионов  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  (Биолот, Россия). Полученную суспензию клеток (1 млн/мл) в PBS делили на пробы по 30 мкл, добавляли к каждой из них по 3 мкл антител и инкубировали при 4 °C в течение 30 мин. Далее пробы доводили до оптимального объема (0.3—0.4 мл) буфером FACS (PBS, содержащий 1 % бычьего сывороточного альбумина (BSA) и 0.05 % азида натрия).

Для иммунофлуоресцентного анализа экспрессии виментина и коллагена I-го типа как основных маркеров, подтверждающих статус МСК и фибробластов, а также поверхностных маркеров, характерных для эмбриональных стволовых клеток человека (ЭСК), и экспрессии маркеров ранней дифференцировки ЭСК в производные трех зародышевых листков использовали антитела против виментина (BD Pharmingen, Бельгия), коллагена I-го типа (Chemicon, США), транскрипционного фактора Oct-4 (Santa Cruz, США),  $\alpha$ -актинина (тест на мезодерму),  $\alpha$ -фетопротейна (тест на энтодерму) (Sigma, США) и нестина (тест на эктодерму) (Chemicon, США). Клетки фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида в течение 20 мин при комнатной температуре и блокировали 1%-ным раствором BSA (Sigma, США) в течение 1 ч. Для выявления Oct-4 проводили дополнительно пермеабиллизацию 0.1%-ным раствором Тритона X-100 в течение 15 мин при комнатной температуре. Далее все клетки инкубировали с первыми антителами в течение ночи при 4 °C. Вторые антитела (Alexa Fluor 488, Life Technologies, США) разводили в соотношении 1 : 500 и инкубировали с ними препараты в течение 1 ч в темноте при комнатной температуре. В качестве отрицательного контроля использовали клетки, меченные только вторыми антителами. Визуализацию проводили с помощью микроскопа Zeiss LSM 5 Pascal (Германия).

Для подтверждения статуса МСК проводили индукцию остеогенной, адипогенной и хондрогенной дифференцировки в трех линиях ДФ по модифицированному методу (Reyes et al., 2001). Клетки в концентрации 10 тыс. кл./см<sup>2</sup> высевали в остеогенную и адипогенную дифференцировочные среды с добавлением комплемента (HyClone Thermo Scientific HyClone Product, США). Хондрогенную дифференцировку проводили в культуре микромасс (Кольцова и др., 2014) в хондрогенной дифференцировочной среде (HyClone Thermo Scientific HyClone Product, США). Индукцию дифференцировки проводили в течение трех нед. Среду меняли через каждые 3—4 сут.

В качестве маркера остеогенной дифференцировки исследовали активность клеточной щелочной фосфатазы и наличие солей кальция во внеклеточном матриксе клеток. Для определения активности щелочной фосфатазы клетки в течение 20 мин фиксировали 4%-ным параформальдегидом, а затем 30 мин обрабатывали BCIP/NBT

Liquid Substrate System (Sigma, США) в темноте при комнатной температуре и исследовали распределение солей кальция во внеклеточном матриксе культуры клеток. Реакцию Van Kossa, позволяющую выявить нерастворимые соли кальция в межклеточном пространстве, проводили следующим образом: клетки фиксировали 2 мин в метаноле при –20 °C, далее окрашивали 2%-ным раствором нитрата серебра ( $AgNO_3$ ) (Вектон, Россия) в течение 1 ч под лампой мощностью 60 Вт. Окрашенные клетки промывали дистиллированной водой и на 5 мин помещали в 2.5%-ный раствор тиосульфата натрия ( $Na_2S_2O_3$ ). Затем окрашенные клетки снова промывали водой и высушивали.

Идентификацию сульфатированных гликозаминогликанов при хондрогенной дифференцировке проводили при помощи окраски 1%-ным раствором толуидинового синего в 50%-ном изопропанол (MP Biomedicals, США). Время окраски составляло 30 мин при комнатной температуре.

Для выявления адипогенной дифференцировки клетки промывали PBS без ионов  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$ , фиксировали в метаноле в течение 2 мин при –20 °C. Фиксированные клетки промывали 50%-ным этанолом и окрашивали красителем красным масляным (Oil Red O) в течение 10 мин. Окрашенные клетки промывали 50%-ным этанолом, затем дистиллированной водой и высушивали на воздухе.

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

## Результаты и обсуждение

В результате культивирования в течение 6 пассажей были получены линии фибробластоподобных клеток, которые назвали, согласно источнику их получения из дермы кожи век, DF-1, DF-2 и DF-3. Морфологический анализ этих линий показал однородность клеточных популяций со средними по размеру вытянутыми фибробластоподобными клетками (рис. 1).

Ростовые характеристики определяли двумя методами — по эффективности клонирования и по кривым роста с определением среднего времени удвоения клеточных популяций. Для всех линий независимо от возраста донора (37, 45 и 53 года) показана сходная невысокая эффективность клонирования. Так, для каждой клеточной линии при повторении каждого эксперимента трижды получены следующие результаты:  $34.5 \pm 3.7$ ,  $25.4 \pm 4.2$  и  $30.0 \pm 7.5$  % для линий DF-1, DF-2 и DF-3 соответственно. Исходя из данных по невысокой эффективности клонирования можно порекомендовать рассеивать эти клетки при культивировании с оптимальной плотностью  $(4—5) \cdot 10^4$  кл./см<sup>2</sup>.

Анализ кривых роста показал, что клетки всех трех линий активно делятся (рис. 2). Время активной (логарифмической) фазы роста на 6-м пассаже у линий DF-1 и DF-2 составляет 72 ч, а у линии DF-3 — 48 ч. Среднее время удвоения клеточных популяций составляет  $40.0 \pm 1.0$ ,  $35.0 \pm 0.3$  и  $33.0 \pm 1.6$  ч для линий DF-1, DF-2 и DF-3 соответственно. Следовательно, время удвоения клеток линии DF-1 больше, чем линий DF-2 и DF-3 ( $P < 0.01$ ). По-видимому, наблюдаемые различия ростовых характеристик клеточных линий, полученные из одной ткани, но от разных доноров, не отражают возрастной зависимости, т. е. увеличение среднего времени уд-



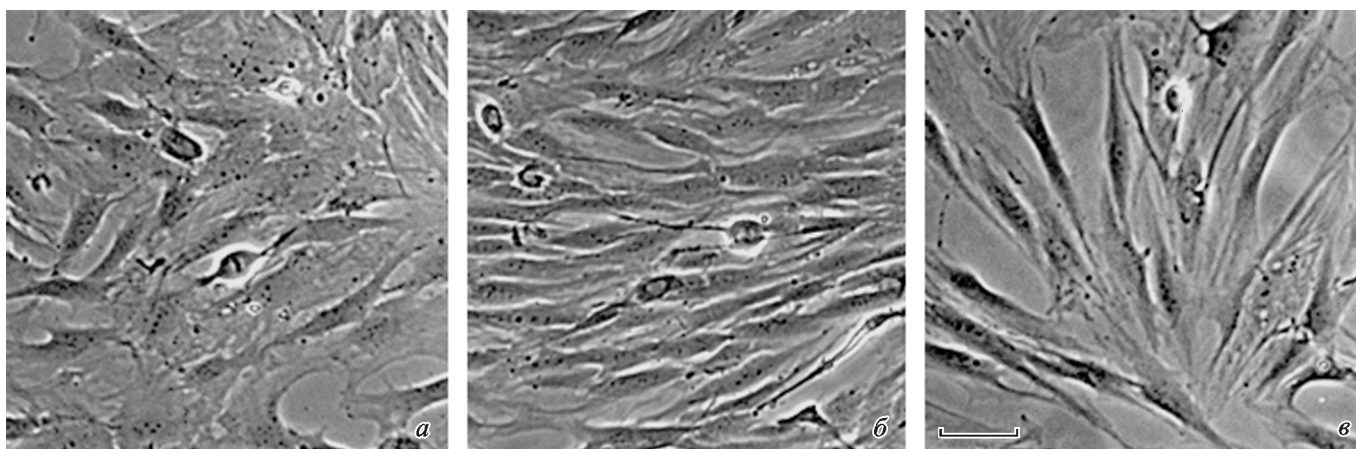


Рис. 1. Прижизненные фотографии клеток линий DF-1 (а), DF-2 (б) и DF-3 (в).

Масштабный отрезок — 50 мкм.

воения с увеличением возраста от 37 до 53 лет может быть связано, скорее, с генетическими особенностями доноров. Существенно было выяснить динамику пролиферации полученных неиммortalизованных клеточных линий при длительном культивировании. В связи с этим проанализировали кривые роста на 20-м пассаже и полученные данные сопоставили с возрастом доноров и с числом удвоений клеточных популяций. Клетки линий DF-1, DF-2 и DF-3 к 20-му пассажу прошли 48, 42 и 44 удвоения соответственно. Существенных различий между 6-м и 20-м пассажами по характеру кривых роста отмечено не было, поэтому эти данные не представлены. Среднее время удвоения для линий DF-1 и DF-3 соответствует времени на 6-м пассаже —  $43.5 \pm 1.0$  и  $35.5 \pm 0.9$  соответственно. Единственное различие, которое было обнаружено при сравнительном анализе ростовых характеристик, относится к увеличению среднего времени удвоения клеток линии DF-2 на 20-м пассаже по сравнению с 6-м пассажем —  $49.7 \pm 0.7$  против  $35.0 \pm 0.9$ . Этот результат нельзя связать ни с возрастом донора (43 года), ни с количест-

вом удвоений клеточной популяции (42 удвоения против 48 и 44 у двух других линий). Возможно, что это связано с генетическими особенностями конкретного донора.

Анализ репликативного старения клеток показал, что на 20-м пассаже, так же как и на 6-м, не обнаружено признаков старения клеток популяций трех линий по выявлению активности  $\beta$ -галактозидазы (рис. 3). Вступление клеток в фазу старения по наличию активности  $\beta$ -галактозидазы было обнаружено для всех линий на 25-м пассаже, т. е. после 50 удвоений клеточных популяций (рис. 3). На рис. 3 видно, что окрашены не все клетки, и это свидетельствует, по-видимому, о начальной стадии старения. Эти результаты подтверждают ограниченный срок жизни линий DF-1, DF-2 и DF-3, что свойственно неиммortalизованным клеточным линиям (Hayflick, 1965; Matsumura et al., 1979; Vonab et al., 2006).

Количественный кариотипический анализ линий DF-1, DF-2 и DF-3 показал, что они характеризуются одинаковой высокой частотой клеток с модальным числом хромосом, равным 46 ( $98.0 \pm 1.4\%$ ); доля полиплоидных клеток низкая и составляет  $0.8 \pm 0.3$ ,  $1.2 \pm 0.5$  и  $0.2 \pm 0.1\%$  соответственно.

Структурный кариотипический анализ показал, что все линии имеют нормальный кариотип человека — 46, XX (рис. 4). Тем не менее анализ 30 метафазных пластинок для каждой линии показал существенные различия между ними по кариотипической стабильности. Так, в линии DF-1 структурные перестройки выявлены в 4 из 30 кариотипированных клеток (рис. 4, а). В 3 клетках обнаружены реципрокные (сбалансированные) транслокации хромосом 1 и 2 —  $t(1;2)(p31;q14.2)$ , хромосом 2 и 6 —  $t(2;6)(q24;q25)$ , хромосом 4 и 5 —  $t(4;5)(q12;q13)$ . В 1 клетке обнаружены перестройки обоих гомологов хромосомы 11. Частота клеток с хромосомными aberrациями в этой линии составляет 13.3%. В линии DF-2 структурных перестроек хромосом не выявлены (рис. 4, б). В линии DF-3 структурные перестройки хромосом обнаружены в 8 из 30 кариотипированных клеток (рис. 4, в). В 3 клетках выявлены аномалии хромосомы 1: делеция  $del(1)(q11)$ , перестройка обоих гомологов, транслокация хромосом 1 и 8 —  $t(1;8)(q11;q24.3)$ . В остальных 5 клетках отмечены реципрокные (сбалансированные) транслокации хромосом 4 и 15 —  $t(4;15)(q21;q15)$ , хромосом 14 и 16 —  $t(14;16)(q11.2;q22)$ , парацентрические инверсии в хромосоме 7 и в хромосоме 11

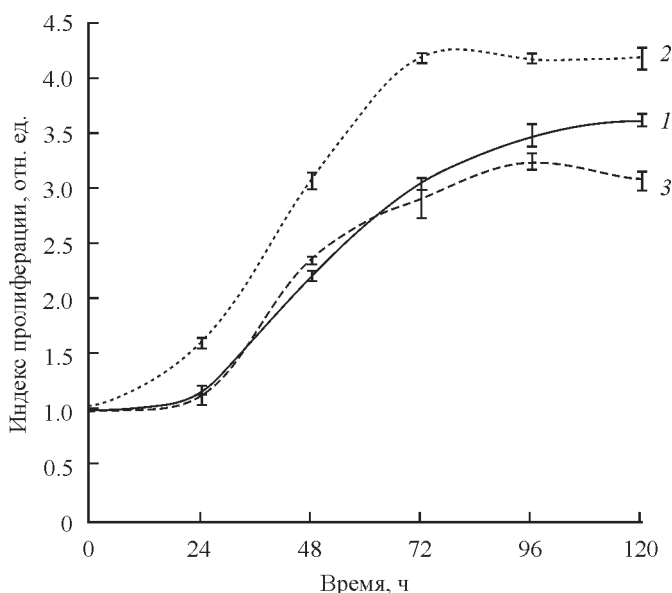


Рис. 2. Кривые роста клеток линий DF-1 (кривая 1), DF-2 (кривая 2) и DF-3 (кривая 3).



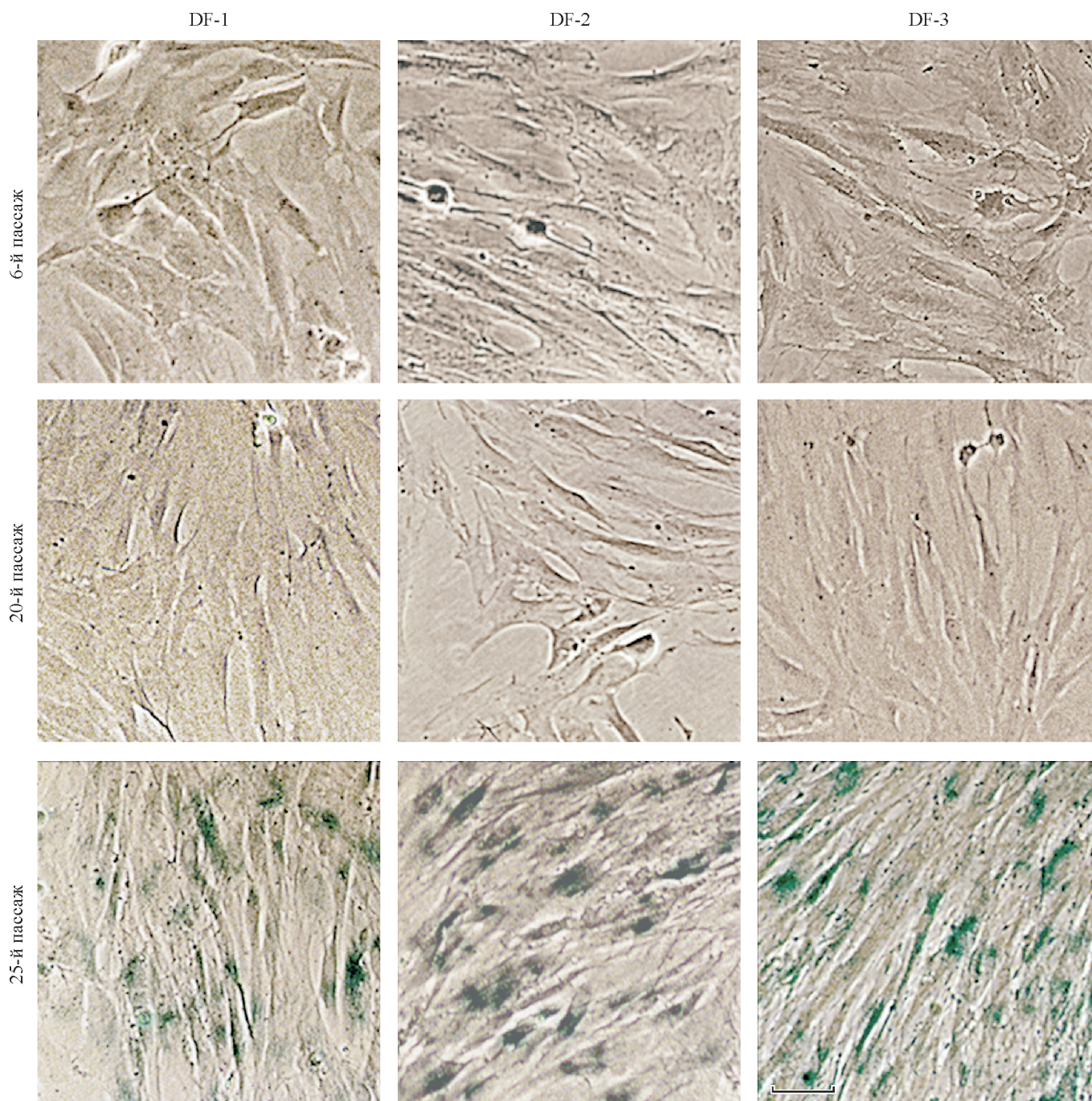


Рис. 3. Окрашивание клеток для выявления активности  $\beta$ -галактозидазы в линиях DF-1, DF-2 и DF-3.

Использовали набор реактивов Senescence SA- $\beta$  galactosidase staining kit на 6, 20 и 25-м пассажах. Масштабный отрезок — 50 мкм.

(inv(7)(p13p22) и inv(11)(q22q25) соответственно), перестройки хромосом 6 и 12 (add(6)(p21.1) и add(12)(q24.3) соответственно).

Таким образом, доля клеток с неклональными структурными перестройками в линии DF-3 составляет 26.7 %. Следовательно, наибольшей кариотипической нестабильностью обладает линия DF-3. Анализ кариотипической стабильности большого числа доноров разного возраста позволил сделать вывод о том, что причиной наблюдаемой нестабильности, по-видимому, являются главным образом различия между донорами, хотя нельзя исключить и возрастную зависимость (Stultz et al., 2016). Наши

результаты не позволяют сделать окончательный вывод в пользу одного из этих предположений, поскольку линия DF-1, полученная от 37-летнего донора, имеет существенную кариотипическую нестабильность, а линия от 45-летнего донора показывает стабильный кариотип. Но наибольшая кариотипическая нестабильность показана для линии DF-3, полученной от 53-летнего донора. Следует подчеркнуть, что мы исследовали клетки на 6-м пассаже, т. е. когда первоначальный этап адаптации клеточной линии к условиям *in vitro*, связанный с возможным повышением хромосомной нестабильности, уже прошел (Stultz et al., 2016).

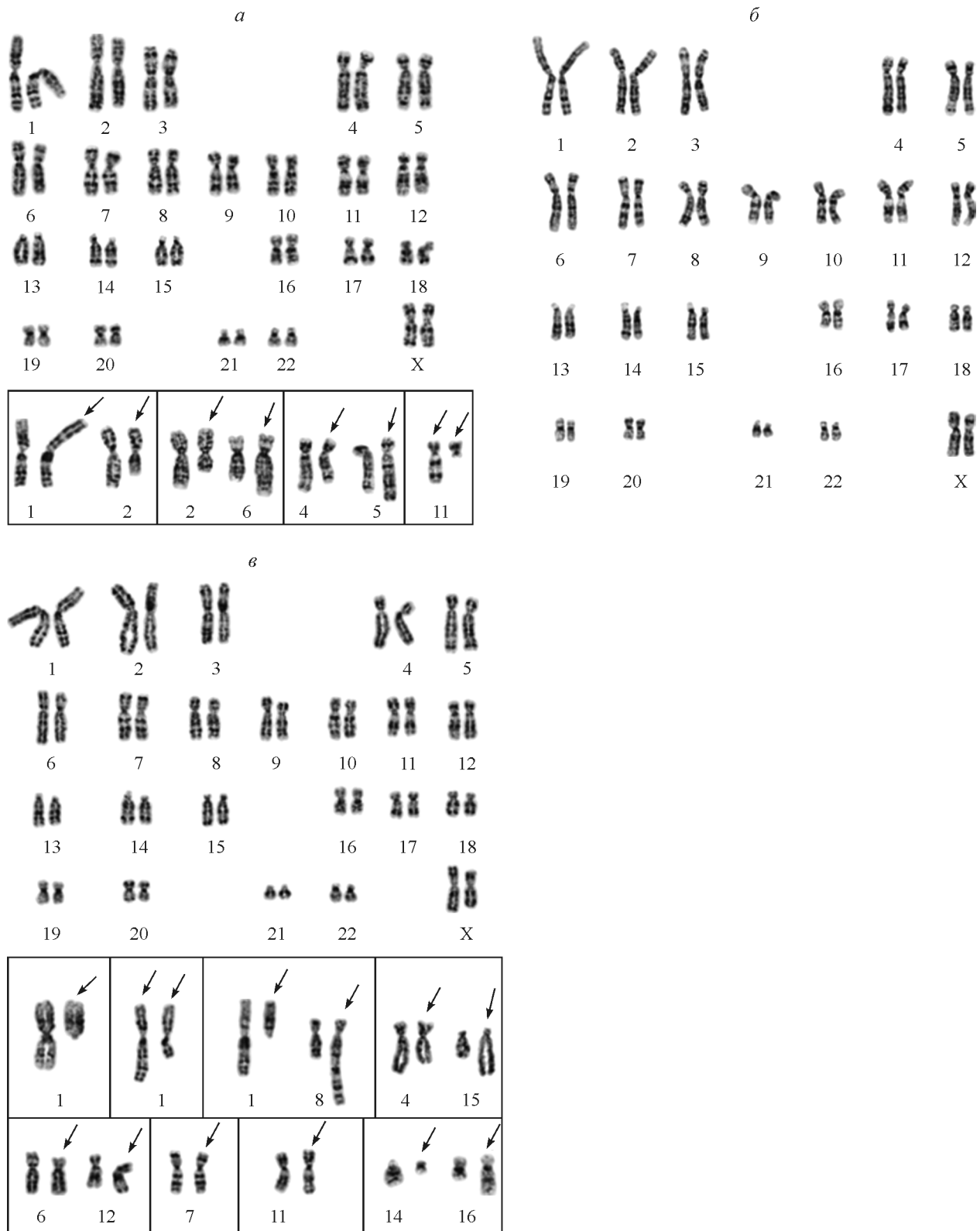


Рис. 4. Кариотипы (КП) клеточных линий DF-1 (а), DF-2 (б) и DF-3 (в).

Кариотип всех линий: 46, XX. а, *врезка* — структурно перестроенные хромосомы (*стрелки*), обнаруженные в отдельных клетках: дериваты хромосом 1 и 2  $der(1)(2qter \rightarrow 2q14.2::1p31 \rightarrow 1qter)$ ,  $der(2)(2pter \rightarrow 2q14.2::1p31 \rightarrow 1p36.1)$ ; дериваты хромосом 2 и 6  $der(2)(2pter \rightarrow 2q24::6q25 \rightarrow 6qter)$ ,  $der(6)(6pter \rightarrow 6q25::2q24 \rightarrow 2qter)$ ; дериваты хромосом 4 и 5  $der(4)(4pter \rightarrow 4q12::5q13 \rightarrow 5qter)$ ,  $der(5)(5pter \rightarrow 5q13::4q12 \rightarrow 4qter)$ ; перестройки обоих гомологов хромосомы 11  $der(11)(11pter \rightarrow 11q25::11q13 \rightarrow 11qter)$ ,  $del(11)(pter \rightarrow q13)$ . в, *врезка* — структурно перестроенные хромосомы (*стрелки*), обнаруженные в отдельных клетках: в *верхнем ряду* — делеция хромосомы 1  $del(1)(pter \rightarrow q11::?)$ ; перестройки обоих гомологов хромосомы 1  $der(1)(pter \rightarrow q21::?::q21 \rightarrow qter)$ ,  $add(1)(pter \rightarrow q21::?)$ ; делеция хромосомы 1  $del(1)(pter \rightarrow q11::?)$  и дериват хромосомы 8  $der(8)(8pter \rightarrow 8q24.3::1q11 \rightarrow 1qter)$ ; дериваты хромосом 4 и 15  $der(4)(4pter \rightarrow 4q21::15q15 \rightarrow 15qter)$ ,  $der(15)(15pter \rightarrow 15q15::4q21 \rightarrow 4qter)$ ; в *нижнем ряду* — перестройки хромосом 6 и 12  $add(6)(p21.1)$ ,  $add(12)(q24.3)$ ; инверсия в хромосоме 7  $inv(7)(pter \rightarrow p22::p13 \rightarrow p22::p13 \rightarrow qter)$ ; инверсия в хромосоме 11  $inv(11)(pter \rightarrow q22::q25 \rightarrow q22::q25 \rightarrow qter)$ ; дериваты хромосом 14 и 16  $der(14)(14pter \rightarrow 14q11.2::16q22 \rightarrow 16qter)$ ,  $der(16)(16pter \rightarrow 16q22::14q11.2 \rightarrow 14qter)$ .



Тем не менее в настоящее время нет предельных критериев для использования в регенеративной медицине клеточных культур с повышенным уровнем неклональных перестроек. Есть допустимый критерий только для клеточных линий, имеющих клональные хромосомные перестройки. Международное общество клеточной терапии и Рабочая группа по клеточным продуктам рекомендуют исключать клеточные культуры, имеющие 10 % и более клональных хромосомных нарушений при анализе минимум 20 клеток, используя метод дифференциального G-окрашивания хромосом (Meisner, Johnson, 2008; Shaffer et al., 2009; Barkholt et al., 2013). Тем не менее выявленная значительная хромосомная нестабильность в 2 из 3 линий может являться признаком кариотипической нестабильности, который при дальнейшем культивировании может обеспечить промежуточные этапы туморогенеза (Borgonovo et al., 2014). В нашем исследовании косвенным подтверждением дальнейшего усиления нестабильности могут служить данные о том, что при просмотре 100 клеток DF-1 появляется клональная хромосомная перестройка, связанная с нарушениями в обоих гомологах хромосомы 11. Также отмечено повторное вовлечение одного и того же локуса хромосомы 1 (1q11) в хромосомные перестройки. Тем не менее, несмотря на имеющиеся хромосомные нарушения в 2 из 3 полученных линий, все линии являются неиммортизированными, входящими в процесс репликативного старения после 50 удвоений клеточных популяций (рис. 2, 3).

Для подтверждения статуса МСК полученных линий DF-1, DF-2 и DF-3 с помощью проточной цитофлуориметрии сравнительно проанализировали поверхностные маркеры, характерные для МСК. Анализ подтвердил наличие статуса МСК у 3 линий ДФ и отсутствие различий между ними по основным маркерам МСК. Из представленных результатов (см. таблицу) следует наличие экспрессии поверхностных антигенов, характерных для МСК человека: CD44, CD73, CD90 и CD105. Выявлено отсутствие экспрессии антигенов CD34, CD45 и HLA-DR. Экспрессия маркера HLA-ABC составляет для всех линий около 70 %. Таким образом, согласно требованиям Международного общества клеточной терапии, для всех линий DF подтвержден статус МСК (Domonici, 2006; Sensebe et al., 2010). Эти данные совпадают с данными, полученными нами ранее на МСК, выделенных из разных источников: эмбриональных стволовых клеток, костного мозга и зачатка конечности раннего эмбриона и крайней плоти 3-летнего ребенка, а также данными других авторов (Halfon et al., 2011; Крылова и др., 2012, 2014; Somasundaram et al., 2015; Denu et al., 2016).

Следует подчеркнуть, что не обнаружено зависимости количества клеток, экспрессирующих эти маркеры, от возраста доноров (37—53 года). Нам известны результаты одного исследования, где тоже не установлена зависимость числа клеток, экспрессирующих характерные для МСК поверхностные маркеры, от возраста доноров, но показано уменьшение числа эпителиальных клеток CD90, связанного, в частности, с процессами дифференцировки и старения клеток у донора 67 лет (Brun et al., 2016). Кроме того, есть ряд работ, демонстрирующих различия между МСК и фибробластами по экспрессии маркеров, не входящих в обязательный перечень, характеризующий статус МСК, но связанных с важнейшими клеточными процессами, такими как пролиферация, дифференцировка, межклеточные взаимодействия, миграция и др. (Halfon et al., 2011; Somasundaram et al., 2015). Тем не менее многочисленные

**Экспрессия (%) поверхностных маркеров в клетках линий DF-1, DF-2 и DF-3**

Маркер	DF-1	DF-2	DF-3
CD44	99.90 ± 0.05	99.50 ± 0.30	99.90 ± 0.05
CD73	99.10 ± 0.70	99.40 ± 0.20	99.70 ± 0.20
CD90	99.90 ± 0.07	99.40 ± 0.04	99.80 ± 0.04
CD105	97.00 ± 0.09	95.40 ± 3.00	94.50 ± 5.00
CD34	0.10 ± 0.03	0.07 ± 0.05	0.40 ± 0.30
CD45	0.14 ± 0.05	0.32 ± 0.15	0.23 ± 0.20
HLA-DR	0.08 ± 0.04	0.07 ± 0.03	0.16 ± 0.07
SSEA-4	5.90 ± 0.80	7.60 ± 3.50	9.70 ± 6.60

Примечание. Даны средние значения и их ошибки доли клеток (несущих маркер) из 3 экспериментов.

результаты свидетельствуют о различиях между экспрессией ряда генов в разных по происхождению фибробластах, так же как и в МСК, выделенных из разных источников, причем степень различий, представленных в разных исследованиях, между МСК и фибробластами сравнима с различиями между МСК из разных источников (Denu et al., 2016).

Иммунофлуоресцентный анализ показал наличие экспрессии виментина во всех трех линиях дермальных фибробластов, подтвердив статус МСК. Кроме того, показана экспрессия коллагена 1-го типа, характерная для фибробластов (рис. 5).

Учитывая результаты наших предыдущих исследований, а также данные других работ о присутствии экспрессии некоторых маркеров ЭСК в МСК, мы сравнительно проанализировали экспрессию маркеров, характерных для ЭСК человека, во вновь полученных линиях ДФ. С помощью проточной цитофлуориметрии во всех трех линиях обнаружен невысокий уровень экспрессии поверхностного маркера SSEA-4 (см. таблицу). Обращает на себя внимание большая величина погрешности при количественной оценке числа клеток в популяции, экспрессирующих SSEA-4, в линиях DF-2 и DF-3, что свидетельствует о существенной вариабельности клеточных популяций по этому маркеру. Похожий результат был нами зафиксирован при анализе экспрессии этого маркера в линиях МСК — FetMSC и M-FetMSC (Крылова и др., 2014). Иммунофлуоресцентный анализ показал отсутствие экспрессии транскрипционного фактора Oct-4 во всех трех линиях (данные не показаны). Эти результаты совпадают с полученными ранее нами на МСК разного происхождения (Крылова и др., 2012, 2014; Кольцова и др., 2015). Таким образом, наличие экспрессии SSEA-4 косвенно еще раз подтверждает функциональное сходство линий ДФ и МСК.

В настоящее время идет накопление экспериментальных данных по экспрессии маркеров недифференцированных ЭСК в МСК, которые пока не систематизированы. В целом данные литературы противоречивы, так как показано и отсутствие, и присутствие этих маркеров в разных линиях МСК. Не выявлено зависимости наличия экспрессии этих маркеров от стадии онтогенеза, в которой находится источник получения линии МСК. Тем не менее сравнительный анализ имеющихся данных по экспрессии маркеров ЭСК и сопоставление этих данных с другими характерными свойствами в разных по проис-

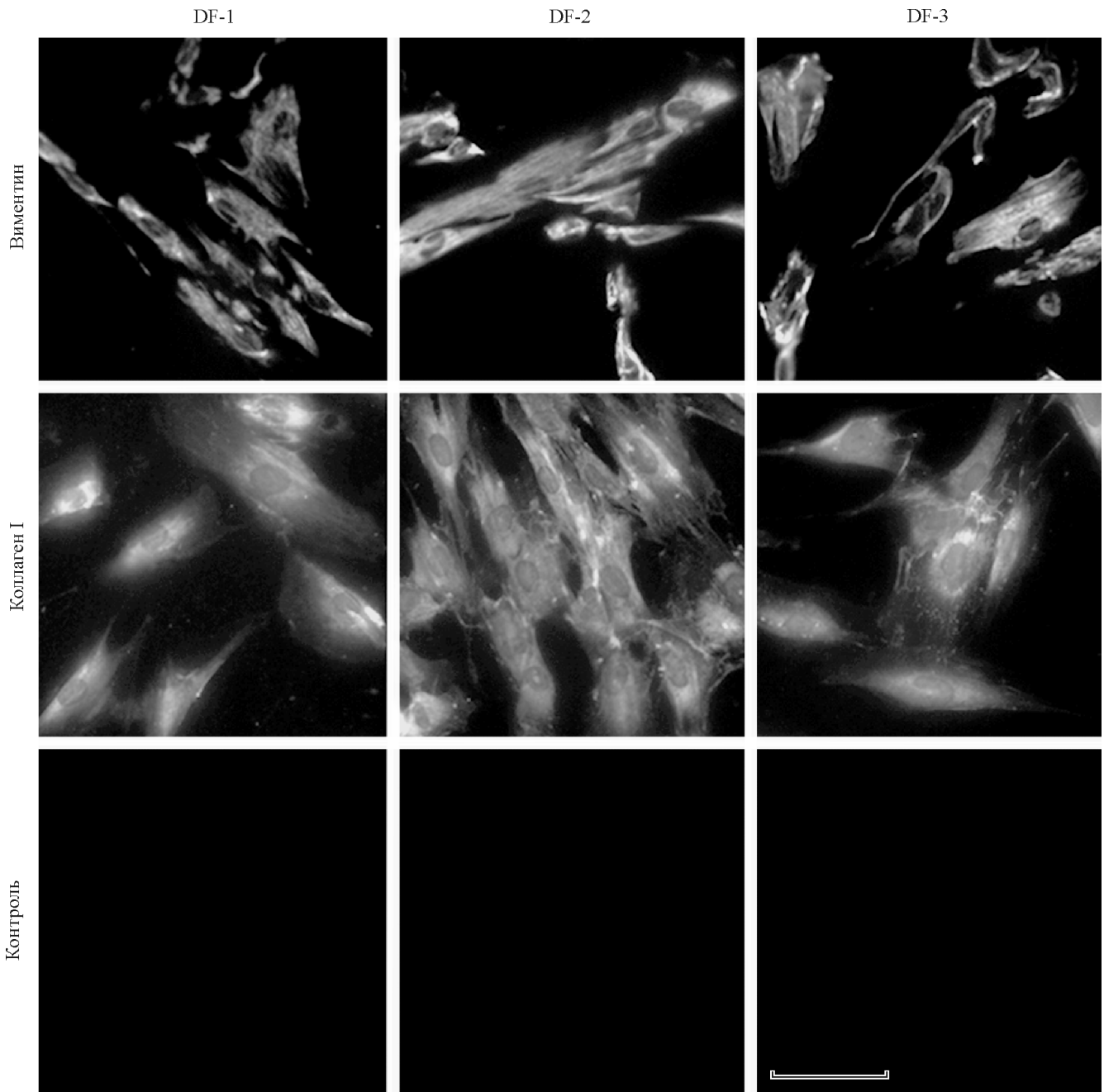


Рис. 5. Идентификация поверхностных маркеров для линий DF-1, DF-2 и DF-3 по флуоресценции соответствующих моноклональных антител.

Масштабный отрезок — 100 мкм.

хождению МСК позволяют предположить, что существование плюрипотентных маркеров в МСК может способствовать повышенной пролиферативной активности и расширению мультипотентного потенциала МСК (Gang et al., 2007; Roubelakis et al., 2007; Riekstina et al., 2009; Wu et al., 2013; Aghajani et al., 2016).

Иммунофлуоресцентный анализ показал, что клетки линий DF-1, DF-2 и DF-3 экспрессируют маркеры ранней дифференцировки ЭСК в производные трех зародышевых листков (рис. 6). Эти результаты совпадают с ранее полученными данными о наличии экспрессии этих маркеров в МСК разного происхождения (Крылова и др., 2012, 2014; Кольцова и др., 2015). Другими авторами раз-

ными методами также показана экспрессия этих маркеров в разных по происхождению МСК (Riekstina et al., 2009; Huang et al., 2010; Antonucci et al., 2011; Mamidi et al., 2011). Таким образом, полученные нами линии ДФ из кожи век взрослых доноров также имеют маркеры ранней дифференцировки ЭСК. Возможно, что дифференцировочная пластичность МСК связана с присутствием этих маркеров. Но так как механизмы взаимосвязи маркеров ранней дифференцировки с дифференцировочной пластичностью неизвестны, это предположение можно рассматривать только как одну из гипотез. Есть и другая гипотеза, предполагающая, что эти два явления не имеют друг к другу отношения, а связаны с эмбриональным про-

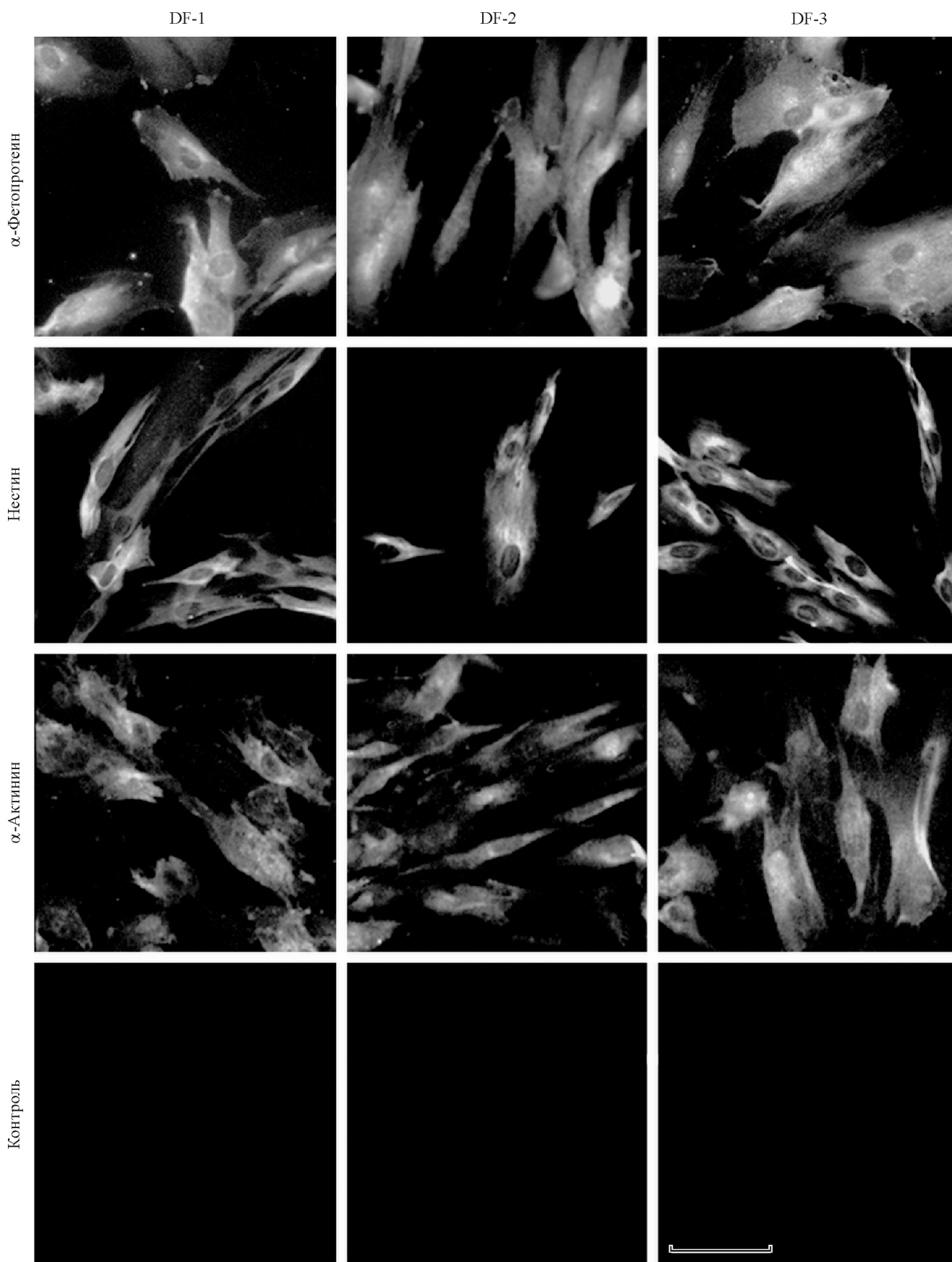


Рис. 6. Идентификация маркеров эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) в клетках линий DF-1, DF-2 и DF-3. Флуоресценция соответствующих моноклональных антител.

Показаны маркеры ранней дифференцировки ЭСК:  $\alpha$ -фетопротейина (маркера энтодермы), нестина (маркера эктодермы) и  $\alpha$ -актинина (маркера мезодермы). Масштабный отрезок — 100 мкм.



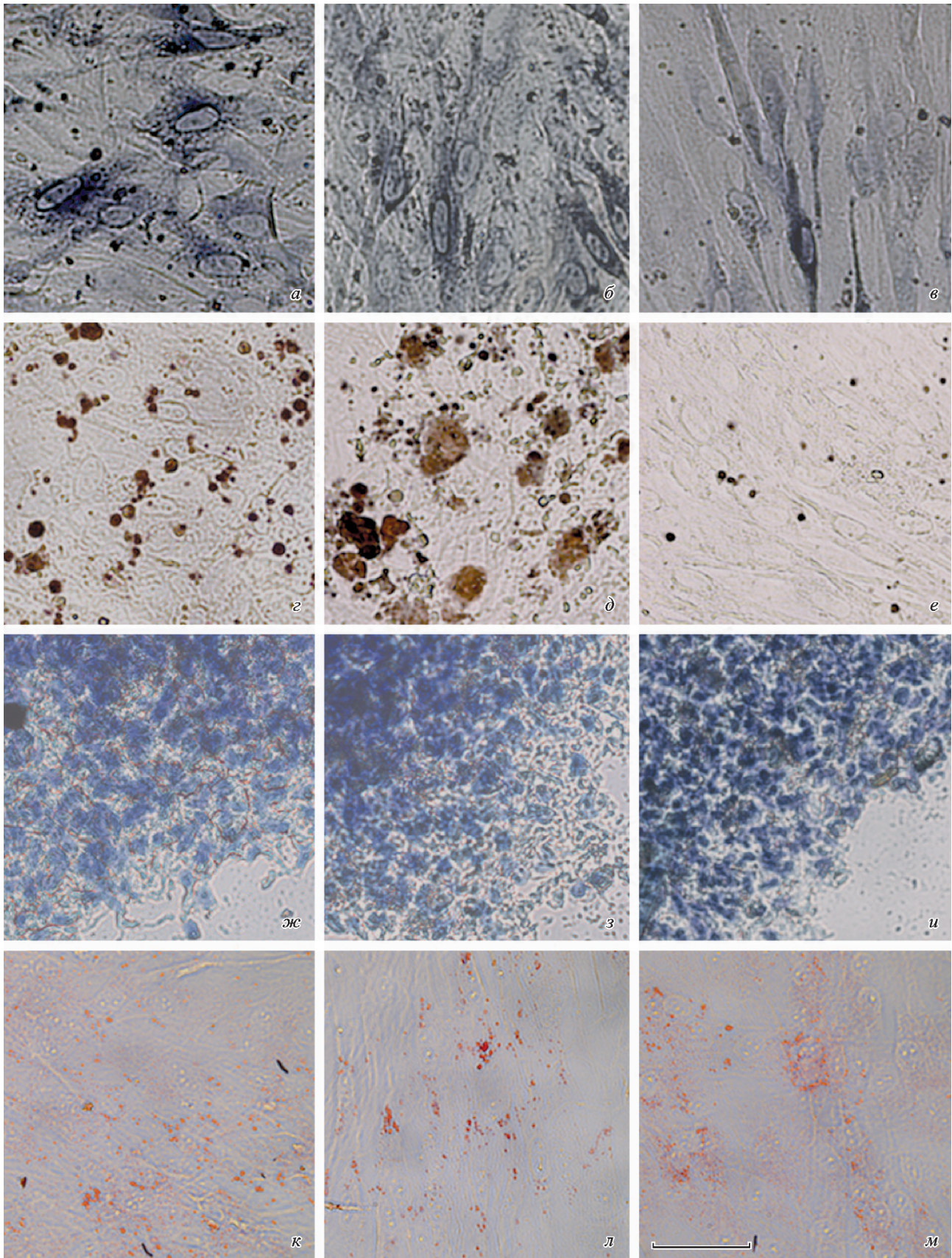


Рис. 7. Дифференцировка клеток линий DF-1, DF-2 и DF-3 в остеогенном (а—е), хондрогенном (ж—и) — и адипогенном (к—м) направлениях.

а—в — окрашивание на щелочную фосфатазу; з—е — реакция Van Kossa, выявляющая нерастворимые соли кальция в межклеточном пространстве, окраска толуидиновым синим; к—м — окрашивание жировых включений масляным красным. Масштабный отрезок — 50 мкм.



исхождением МСК (Riekstina et al., 2009; Sensebe et al., 2010).

Индукция остеогенной, хондрогенной и адипогенной дифференцировки в линиях DF-1, DF-2 и DF-3 выявила способность клеток формировать костную, хондрогенную и жировую ткани, что соответствует статусу МСК (рис. 7) (Dominici et al., 2006; Sensebe et al., 2010). Так, культивирование клеток в остеогенной среде способствовало повышению активности щелочной фосфатазы и формированию минеральных комплексов при использовании реакции Van Kossa, позволяющей выявить нерастворимые соли кальция в межклеточном пространстве. Тем не менее обнаружены различия по интенсивности остеогенной дифференцировки между линиями DF-1, DF-2 и линией DF-3. В линии DF-3 она значительно меньше, чем в двух других. Возможно, что низкий уровень дифференцировки связан с большим возрастом донора (53 года) по сравнению с дифференцировкой клеток линий от двух других доноров (37 и 45 лет). Культивирование клеток в хондрогенной среде привело к образованию структур, которые выявляются с помощью окрашивания толуидиновым синим (идентификация сульфатированных гликозаминогликанов). Культивирование клеток в адипогенной среде способствовало образованию кластеров адипоцитов, показанных с помощью окрашивания красителем масляным красным (Oil Red O). Различий между линиями по этой дифференцировке не обнаружено.

В заключение следует подчеркнуть, что мы исследовали зависимость пролиферативной активности и дифференцировочного потенциала трех линий фибробластов в возрастном интервале от 37 до 53 лет. Интерес к такому исследованию связан с тем, что полученные линии планируются использовать в биотехнологических работах, связанных с регенеративной медициной. Основываясь на данных литературы, можно сделать вывод о том, что этот возрастной интервал характеризуется средним уровнем пролиферативной активности и дифференцировочного потенциала. Наиболее активны эти характеристики в возрасте до 30 лет, а наименее активны у доноров около 60 лет и старше (Gago et al., 2009; Kornicka et al., 2015; Brun et al., 2016; Maredziak et al., 2016). Тем не менее следует обратить внимание на уменьшенный остеогенный потенциал уже у 53-летнего донора (линия DF-3).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-000-68).

#### Список литературы

Кольцова А. М., Воронкина И. В., Гордеева О. Ф., Зенин В. В., Лифанцева Н. В., Мусорина А. С., Смагина Л. В., Яковлева Т. К., Полянская Г. Г. 2012. Разработка новой бесфицеллярной системы и характеристика полученных в ней сублиний эмбриональных стволовых клеток человека при аутогенном и аллогенном культивировании. Цитология. 54 (8) : 637—651. (Koltsova A. M., Voronkina I. V., Gordeeva O. F., Zenin V. V., Lifantseva N. V., Musorina A. S., Smagina L. V., Yakovleva T. K., Poljanskaya G. G. 2012. Developing of a new feeder-free system and characterization of human embryonic stem cell sublines, derived in this system, under autogenic and allogenic culturing. Tsitologiya. 54 (8) : 637—651.)

Кольцова А. М., Зенин В. В., Яковлева Т. К., Полянская Г. Г. 2015. Характеристика новой линии мезенхимных стволовых клеток, выделенных из эмбриональных стволовых клеток человека. Цитология. 57 (11) : 761—770. (Koltsova A. M., Zenin V. V., Yakovleva T. K., Poljanskaya G. G. 2015.

Characteristics of new mesenchymal stem cell line derived from human embryonic stem cells. Tsitologiya. 57 (11) : 761—770.)

Крылова Т. А., Кольцова А. М., Зенин В. В., Мусорина А. С., Яковлева Т. К., Полянская Г. Г. 2012. Сравнительные характеристики новых линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из эмбриональных стволовых клеток, костного мозга и крайней плоти человека. Цитология. 54 (1) : 5—16. (Krylova T. A., Koltsova A. M., Zenin V. V., Musorina A. S., Yakovleva T. K., Poljanskaya G. G. 2012. Comparative characteristics of new mesenchymal stem cell lines derived from human embryonic stem cells, bone marrow and foreskin. Tsitologiya. 54 (1) : 5—16.)

Крылова Т. А., Мусорина А. С., Зенин В. В., Яковлева Т. К., Полянская Г. Г. 2014. Сравнительные характеристики линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из костного мозга и мышцы конечности раннего эмбриона человека. Цитология. 56 (8) : 562 — 573. (Krylova T. A., Musorina A. S., Zenin V. V., Yakovleva T. K., Poljanskaya G. G. 2014. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells lines derived from bone marrow and muscle of limb of early human embryo. Tsitologiya. 56 (8) : 562—573.)

Полянская Г. Г., Кольцова А. М. 2013. Влияние субстрата, включающего в себя белки внеклеточного матрикса, на кариотипическую изменчивость в двух клеточных линиях фибробластов кожи индийского мунтжака. Цитология. 55 (7) : 463—471. (Poljanskaya G. G., Koltsova A. M. 2013. The influence of substrate from extracellular matrix proteins on karyotypic variability of the Indian muntjac skin fibroblast two cell lines. Tsitologiya. 55 (7) : 463—471.)

Седова Г. П. 2008. Количественные аспекты злокачественного роста. Математическая морфология. Электронный математический и медико-биологический журнал. 7 (2). URL: [Http://www.smolensk.ru/user/sgma/mmorph/n-18-html/cont.htm](http://www.smolensk.ru/user/sgma/mmorph/n-18-html/cont.htm). (Sedova G. P. 2008. Quantitative aspects of malignant body height. Mathematical morphology. Electronic Mathematical and Medicobiologic Journal. 7 (2). URL: [Http://www.smolensk.ru/user/sgma/mmorph/n-18-html/cont.htm](http://www.smolensk.ru/user/sgma/mmorph/n-18-html/cont.htm).)

Aghajani F., Hooshmand T., Khanmohammadi M., Khanjani S., Edalatkhah H., Zarnani A. H., Kazemnejad S. 2016. Comparative immunophenotypic characteristics, proliferative features, and osteogenic differentiation of stem cells isolated from human permanent and deciduous teeth with bone marrow. Mol. Biotechnol. 58 : 415—427.

Ahmed N., Riley C., Rice G., Quinn M. 2005. Role of integrin receptors for fibronectin, collagen and laminin in the regulation of ovarian carcinoma functions in response to a matrix microenvironment. Clin. Exp. Metastasis. 22 : 391—402.

Antonucci I., Stuppia L., Kaneko Y., Yu S., Tajiri N., Bae E. C., Chheda S. H., Weinbren N. L., Borlongan C. V. 2011. Amniotic fluid as rich source of mesenchymal stromal cells for transplantation therapy. Cell Transplant. 20 : 789—795.

Bae S., Ahn J. H., Park C. W., Son H. K., Kim K. S., Lim N. K., Jeon C. J., Kim H. 2009. Gene and microRNA expression signatures of human mesenchymal stromal cells in comparison to fibroblasts. Cell Tissue Res. 335 : 565—573.

Barbet R., Peiffer I., Hatzfeld A., Charbord P., Hatzfeld J. A. 2011. Comparison of gene expression in human embryonic stem cells, hESC-derived mesenchymal stem cells and human mesenchymal stem cells. Stem Cells Int. 2011 : 368192.

Barkholt L., Flory E., Jekerle V., Lucas-Samuel S., Ahnert P., Bisset L., Büscher D., Fibbe W., Foussat A., Kwa M., Lantz O., Maciulaitis R., Palomäki T., Schneider C. K., Sensebé L., Tachdjian G., Tarte K., Tosca L., Salmikangas P. 2013. Risk of tumorigenicity in mesenchymal stromal cell-based therapies—bridging scientific observations and regulatory viewpoints. Cytother. 15 : 753—759.

Basson M. D., Turowski G., Emenaker N. J. 1996. Regulation of human (Caco—2) intestinal epithelial cell differentiation by extracellular matrix proteins. Exp. Cell Res. 225 : 301—305.

Blasi A., Martino C., Balducci L., Saldarelli M., Soleti A., Navone S. E., Canzi L., Cristini S., Invernici G., Parati E. A., Alessandri G. 2011. Dermal fibroblasts display similar phenotypic and differentiation capacity to fat-derived mesenchymal stem cells, but

- differ in anti-inflammatory and angiogenic potential. *Vasc. Cell.* 3 : 5. doi: 10.1186/2045-824X-3-5.
- Bonab M. M., Alimoghaddam K., Talebian F., Ghaffari S. H., Ghavamzadeh A., Nikbin B. 2006. Aging of mesenchymal stem cell *in vitro*. *BMC Cell Biol.* 7 : 14.
- Borgonovo T., Vaz I. M., Senegaglia A. C., Rebelatto C. L., Brofman P. R. 2014. Genetic evaluation of mesenchymal stem cells by G-banded karyotyping in a Cell Technology Center. *Rev. Bras. Hematol. Hemother.* 36 : 202—207.
- Brandau S., Bruderek K., Hestermann K., Görtz G. E., Horstmann M., Mattheis S., Lang S., Eckstein A., Berchner-Pfannschmidt U. 2015. Orbital fibroblasts from graves' orbitopathy patients share functional and immunophenotypic properties with mesenchymal stem/stromal cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56 : 6549—6557.
- Bruekers S. M., Jaspers M., Hendriks J. M., Kurniawan N. A., Koenderink G. H., Kouwer P. H., Rowan A. E., Huck W. T. 2016. Fibrin-fiber architecture influences cell spreading and differentiation. *Cell Adh. Migr.* 24 : 1—10.
- Brun C., Maginiot F., Cras A., Wong H., Ly Ka So S., Larghero J., Bensussan A., Oddos T., Michel L. 2016. Intrinsically aged dermal fibroblasts fail to differentiate into adipogenic lineage. *Exp. Dermatol.* doi: 10.1111/exd.13080.
- Chang H. Y., Chi J. T., Dudoit S., Bondre C., van de Rijn M., Botstein D., Brown P. O. 2002. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 99 : 12 877—12 882.
- Choi J. S., Lee B. J., Park H. Y., Song J. S., Shin S. C., Lee J. C., Wang S. G., Jung J. S. 2015. Effects of donor age, long-term passage culture, and cryopreservation on tonsil-derived mesenchymal stem cells. *Cell Physiol. Biochem.* 36 : 85—99.
- Denu R. A., Nemcek S., Bloom D. D., Goodrich A. D., Kim J., Mosher D. F., Hematti P. 2016. Fibroblasts and mesenchymal stromal/stem cells are phenotypically indistinguishable. *Acta Haematol.* 136 : 85—97.
- De Peppo G. M., Sladkova M., Sjøvall P., Palmquist A., Oudina K., Hyllner J., Thomsen P., Petite H., Karlsson C. 2013. Human embryonic stem cell-derived mesodermal progenitors display substantially increased tissue formation compared to human mesenchymal stem cells under dynamic culture conditions in a packed bed/column bioreactor. *Tiss. Eng. (A).* 19 : 175—187.
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytother.* 8 : 315—317.
- Freeman M. R., Song Y., Carson D. D., Guthrie P. D., Chung L. W. 1991. Extracellular matrix and androgen receptor expression associated with spontaneous transformation of rat prostate fibroblasts. *Cancer Res.* 51 : 1910—1916.
- Gago N., Pérez-López V., Sanz-Jaka J. P., Cormenzana P., Eizaguirre I., Bernad A., Izeta A. 2009. Age-dependent depletion of human skin-derived progenitor cells. *Stem Cells.* 27 : 1164—1172.
- Gang E. J., Bosnakovski D., Figueiredo C. A., Visser J. W., Perlingeiro R. C. 2007. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood.* 109 : 1743—1751.
- Ge S., Mroczek K. M., Menicanin D., Gronthos S., Bartold P. M. 2012. Isolation and characterization of mesenchymal stem cell-like cells from healthy and inflamed gingival tissue: potential use for clinical therapy. *Regen. Med.* 7 : 819—832.
- Hayflick L. 1965. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 37 : 614—636.
- Halfon S., Abramov N., Grinblat B., Ginis I. 2011. Markers distinguishing mesenchymal stem cells from fibroblasts are downregulated with passaging. *Stem Cells Develop.* 20 : 53—66.
- Hanjiffa M. A., Collin M. P., Buckley C. D., Dazzi F. 2009. Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? *Haematology.* 94 : 258—263.
- Hirt-Burri N., Scaletta C., Gerber S., Pioletti D. P., Applegate L. A. 2008. Wound-healing gene family expression differences between fetal and foreskin cells used for bioengineered skin substitutes. *Artif. Organs.* 32 : 509—518.
- Huang H. I., Chen S. K., Ling Q. D., Chien C. C., Liu H. T., Chan S. H. 2010. Multilineage differentiation potential of fibroblast-like stromal cells derived from human skin. *Tissue Eng. (A).* 16 : 1491—1501.
- Ingber D. E. 2002. Mechanical signaling and the cellular response to extracellular matrix in angiogenesis and cardiovascular physiology. *Circ. Res.* 91 : 877—887.
- Ishii M., Koike C., Igarashi A., Yamanaka K., Pan H., Higashi Y., Kawaguchi H., Sugiyama M., Kamata N., Iwata T., Matsubara T., Nakamura K., Kurihara H., Tsuji K., Kato Y. 2005. Molecular markers distinguish bone marrow mesenchymal stem cells from fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332 : 297—303.
- Isobe Y., Koyama N., Nakao K., Osawa K., Ikeno M., Yamanaoka S., Okubo Y., Fujimura K., Bessho K. 2015. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovial fluid, adult dental pulp, and exfoliated deciduous tooth pulp. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 45 : 124—131.
- Kato K., Shiga K., Yamaguchi K., Hata K., Kobayashi T., Miyazaki K., Saijo S., Miyagi T. 2006. Plasma-membrane-associated sialidase (NEU3) differentially regulates integrin mediated cell proliferation through laminin- and fibronectin-derived signaling. *Biochem. J.* 394 (Pt 3) : 647—656.
- Kornicka K., Marycz K., Tomaszewski K. A., Maredziak M., Śmieżek A. 2015. The effect of age on osteogenic and adipogenic differentiation potential of human adipose derived stromal stem cells (hASCs) and the impact of stress factors in the course of the differentiation process. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2015 : 309169. doi: 10.1155/2015/309169.
- Kundrotas G., Gasperskaja E., Slapsyte G., Gudleviciene Z., Krasko J., Stumbryte A., Liudkeviciene R. 2016. Identity, proliferation capacity, genomic stability and novel senescence markers of mesenchymal stem cells isolated from low volume of human bone marrow. *Oncotarget.* doi: 10.18632/oncotarget.7456.
- Lai R. C., Choo A., Lim S. K. 2011. Derivation and characterization of human ESC-derived mesenchymal stem cells. *Math. Mol. Biol.* 698 : 141—150.
- Lorenz K., Sicker M., Schmelzer E., Rupf T., Salvetter J., Schulz-Siegmund M., Bader A. 2008. Multilineage differentiation potential of human dermal skin-derived fibroblasts. *Exp. Dermatol.* 17 : 925—932.
- Ma D., Kua J. E., Lim W. K., Lee S. T., Chua A. W. 2015. *In vitro* characterization of human hair follicle dermal sheath mesenchymal stromal cells and their potential in enhancing diabetic wound healing. *Cytother.* 17 : 1036—1051.
- Mamidi M. K., Pal R., Mori N. A., Arumugam G., Thrichelvam S. T., Noor P. J., Abdullah H. M., Gupta P. K., Das A. K., Zakaria Z., Bhonde R. 2011. Co-culture of mesenchymal-like stromal cells derived from human foreskin permits long term propagation and differentiation of human embryonic stem cells. *J. Cell. Biochem.* 112 : 1353—1363.
- Maredziak M., Marycz K., Tomaszewski K. A., Kornicka K., Henry B. M. 2016. The influence of aging on the regenerative potential of human adipose derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Int.* 2016 : 2152435. doi: 10.1155/2016/2152435.
- Matsumura T., Zerrudo Z., Hayflick L. 1979. Senescent human diploid cells in culture: survival, DNA synthesis and morphology. *J. Gerontol.* 34 : 328—334.
- Meisner L. F., Johnson J. A. 2008. Protocols for cytogenetics studies of human embryonic stem cells. *Methods.* 45 : 133—141.
- Mohd Ali N., Boo L., Yeap S. K., Ky H., Satharasinghe D. A., Liew W. C., Ong H. K., Cheong S. K., Kamarul T. 2016. Probable impact of age and hypoxia on proliferation and microRNA expression profile of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Peer J.* 4 : e1536. doi: 10.7717/peerj.1536. eCollection 2016.
- Mostafavi-Pour Z., Askari J. A., Parkinson S. J., Parker P. J., Ng T. T. C., Humphries M. J. 2003. Integrin-specific signaling pathways controlling focal adhesion formation and cell migration. *J. Cell Biol.* 161 : 155—167.
- Ozkinay C., Mitelman F. 1979. A simple trypsin-Giemsa technique producing simultaneous G- and C-banding in human chromosomes. *Hereditas.* 90 : 1—4.



- Ramelet A. A., Hirt-Burri N., Raffoul W., Scaletta C., Pioletti D. P., Offord E., Mansourian R., Applegate L. A. 2009. Chronic wound healing by fetal cell therapy may be explained by differential gene profiling observed in fetal versus old skin cells. *Exp. Gerontol.* 44 : 208—218.
- Ren H., Sang Y., Zhang F., Liu Z., Qi N., Chen Y. 2016. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from umbilical cord, dental pulp, and menstrual blood as sources for cell therapy. *Stem Cells Int.* 2016 : 3516574. doi: 10.1155/2016/3516574.
- Reyes M., Lund T., Lenvik T., Aguiar D., Koodie L., Verfaille C. M. 2001. Purification and *ex vivo* expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood.* 98 : 2615—2625.
- Riekstina U., Cakstina I., Parfejevs V., Hoogduijn M., Jankovskis G., Muiznieks I., Muceniece R., Ancans J. 2009. Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem Cell Rev.* 5 : 378—386.
- Roubelakis M. G., Pappa K. I., Bitsika V., Zagoura D., Vlahou A., Papadaki H. A., Antsaklis A., Anagnou N. P. 2007. Molecular and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid: comparison to bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Develop.* 16 : 931—952.
- Sensebé L., Krampera M., Schrezenmeier H., Bourin P., Gordan R. 2010. Mesenchymal stem cells for clinical application. *Vox Sang.* 98 : 93—107.
- Sethe S., Scutt A., Stolzing A. 2006. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res. Rev.* 5 : 91—116.
- Shaffer I. G., Slovak M. L., Campbell L. J. (Eds.). 2009. An international system for human cytogenetic nomenclature. Basel: S. Karger. 138 p.
- Shih D. T., Lee D. C., Chen S. C., Tsai R. Y., Huang C. T., Tsai C. C., Shen E. Y., Chiu W. T. 2005. Isolation and characterization of neurogenic mesenchymal stem cells in human scalp tissue. *Stem Cells.* 23 : 1012—1020.
- Siegel G., Kluba T., Hermanutz-Klein U., Bieback K., Northoff H., Schläfer R. 2013. Phenotype, donor age and gender affect function of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Med.* 11 : 146. doi: 10.1186/1741-7015-11-146.
- Somasundaram I., Mishra R., Radhakrishnan H., Sankaran R., Garikipati V. N., Marappagounder D. 2015. Human adult stem cells maintain a constant phenotype profile irrespective of their origin, Basal media, and long term cultures. *Stem Cells Int.* 2015 : 146051. doi: 10.1155/2015/146051.
- Stallmach A., von Lampe B., Orzechowski H. D., Matthes H., Riecken E. O. 1994. Increased fibronectin-receptor expression in colon carcinoma-derived HT 29 cells decreases tumorigenicity in nude mice. *Gastroenterology.* 106 : 19—27.
- Stultz B. G., McGinnis K., Thompson E. E., Lo Surdo J. L., Bauer S. R., Hursh D. A. 2016. Chromosomal stability of mesenchymal stromal cells during *in vitro* culture. *Cytother.* 18 : 336—343.
- Tobin D. J. 2016. Introduction to skin aging. *J. Tissue Viability.* pii: S0965-206X(16)00028-0. doi: 10.1016/j.jtv.2016.03.002.
- Trivanović D., Jauković A., Popović B., Krstić J., Mojsilović S., Okić-Djordjević I., Kukolj T., Obradović H., Santibanez J. F., Bugarski D. 2015. Mesenchymal stem cells of different origin: comparative evaluation of proliferative capacity, telomere length and pluripotency marker expression. *Life Sci.* 141 : 61—73.
- Van Laake L. W., van Donselaar E. G., Monshouwer-Klots J., Schreurs C., Passier R., Humbel B. M., Doevendans P. A., Sonnenberg A., Verkleij A. J., Mummery C. L. 2010. Extracellular matrix formation after transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Cell Mol. Life Sci.* 67 : 277—290.
- Vapniarsky N., Arzi B., Hu J. C., Nolte J. A., Athanasiou K. A. 2015. Concise review: human dermis as an autologous source of stem cells for tissue engineering and regenerative medicine. *Stem Cells Transl. Med.* 4 : 1187—1198.
- Varga N., Veréb Z., Rajnavölgyi E., Németh K., Uher F., Sarkadi B., Apáti A. 2011. Mesenchymal stem cell like (MSC1) cells generated from human embryonic stem cells support pluripotent cell growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 414 : 474—480.
- Wang J., Milner R. 2006. Fibronectin promotes brain capillary endothelial cell survival and proliferation through alpha5beta1 and alpha5beta3 integrins via MAP kinase signaling. *J. Neurochem.* 96 : 148—159.
- Woo D. H., Hwang H. S., Shim J. H. 2016. Comparison of adult stem cells derived from multiple stem cell niches. *Biotechnol. Lett.* 38 : 751—759.
- Wu R., Gu B., Zhao X., Tan Z., Chen L., Zhu J., Zhang M. 2013. Derivation of multipotent nestin(+)/CD271 (-)/STRO-1 (-) mesenchymal-like precursors from human embryonic stem cells in chemically defined conditions. *Hum. Cell.* 26 : 19—27.
- Yan Z. J., Hu Y. Q., Zhang H. T., Zhang P., Xiao Z. Y., Sun X. L., Cai Y. Q., Hu C. C., Xu R. X. 2013. Comparison of the neural differentiation potential of human mesenchymal stem cells from amniotic fluid and adult bone marrow. *Cell Mol. Neurobiol.* 33 : 465—475.
- Yusoff N. H., Alshehadat S. A., Azlina A., Kannan T. P., Hamid S. S. 2015. A comparison of culture characteristics between human amniotic mesenchymal stem cells and dental stem cells. *Trop. Life Sci. Res.* 26 : 21—29.
- Zhang K., Na T., Wang L., Gao Q., Yin W., Wang J., Yuan B. Z. 2014. Human diploid MRC-5 cells exhibit several critical properties of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Vaccine.* 32 : 6820—6827.
- Ziobor B. L., Chen Y. Q., Ramos D. M., Waleh N., Kramer R. H. 1999. Expression of the  $\alpha 7 \beta 1$  Laminin receptor suppresses melanoma growth and metastatic potential. *Cell Growth Differ.* 10 : 479—490.

Поступила 10 VI 2016

DERIVATION AND CHARACTERISTIC OF A NON-IMMORTALIZED CELL LINES  
OF HUMAN DERMAL FIBROBLASTS, GENERATED FROM SKIN OF THE EYELIDS  
OF ADULT DONORS OF DIFFERENT AGE

T. A. Krylova, A. S. Musorina, V. V. Zenin, A. M. Koltsova, I. V. Kropacheva,  
V. I. Turilova, T. K. Yakovleva, G. G. Poljanskaya<sup>1</sup>

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;  
<sup>1</sup> e-mail: poljansk@incras.ru

New non-immortalized human cell lines were generated from the skin of the eyelids of grown-up donors of 37, 45 and 53 years old and were named DF-1, DF-2 and DF-3. Growth characteristics and differentiation potential of these cell lines were compared, and their status as mesenchymal stem cells was confirmed. The main characteristics were determined at the 6<sup>th</sup> passage. The average population doubling time was determined to be 40.0, 35.0 and 33.0 h for cell lines DF-1, DF-2 and DF-3, respectively. The differences in growth characteristics

do not depend of age, i. e. increase in population doubling time does not correlate with the increasing in the donor's age from 37 to 53 years, but rather reflect the donor's genetic features. The growth curves show that all the lines proliferate actively. The plating efficiency is not high but similar for all three cell lines characterized. The lines entered the replicative senescence phase at the 25<sup>th</sup> passage, which corresponds to more than 50 population doubling and indicates that the lines are non-immortalized. Numerical and structural karyotypic analysis showed that the lines have normal karyotype of 46, XX. The presence of some nonclonal chromosomal aberration was however revealed for cell lines DF-1 and DF-3. To determine status of these cell lines, comparative analysis of the surface markers was performed using flow cytometry. By this analysis, all the lines expressed the surface antigens that characteristic of human MSC: CD44, CD73, CD90, CD105, HLA-ABC and did not express CD34, CD45 and HLA-DR. Immunofluorescence analysis revealed the presence of vimentin confirming the MSC status. Expression of collagen type 1 which is typical for fibroblasts was also revealed. Flow cytometry and immunofluorescence analysis showed the presence of non-differentiated ESC-SSEA-4 and markers of early differentiation ESC in the derivatives of 3 germ layers which may promote sufficient opportunities for MSC to be useful for repair of tissue injuries. Capability of all these cell lines to differentiate to osteogenic, chondrogenic and adipogenic directions has been shown. Compared to the two other cell lines, differentiation of DF-3 line was reduced. The low level of this differentiation is probably due to the fact that the donor was older than others. The other characteristics did not reveal any difference depending on the donor age.

**Key words:** dermal fibroblasts, human mesenchymal stem cells, the age of the donor, surface cell markers, karyotype, differentiation.

---