

## ХАРАКТЕРИСТИКА ДВУХ ЛИНИЙ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ВАРТОНОВА СТУДНЯ ПУПОЧНОГО КАНАТИКА ЧЕЛОВЕКА

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

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; 194064;*

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

Получены две новые неиммортизированные линии человека из Вартонова студня пупочного канатика разных доноров, названные MSCWJ-1 и MSCWJ-2. Проведен анализ ростовых характеристик и дифференцировочного потенциала этих линий и подтвержден для них статус мезенхимных стволовых клеток (МСК). Основные характеристики получены на 6-м пассаже. Среднее время удвоения клеточных популяций обеих линий одинаково и составляет 26.8 ч. Кривые роста свидетельствуют об активной пролиферации этих линий, но есть различия в длительности активной (логарифмической) фазы роста. Эффективность клонирования низкая, но одинаковая для обеих линий. Существенно различается время вступления в фазу репликативного старения. Клеточная линия MSCWJ-2 вступает в фазу активного старения гораздо раньше (13-й пассаж), чем клеточная линия MSCWJ-1 (20—25 пассажи). Морфологический анализ показывает типичные для фазы старения изменения, связанные с увеличением размера и степенью распластанности клеток. Количественный кариотипический анализ показал, что линии имеют нормальный кариотип 46, XX и 46, XY соответственно. Структурный кариотипический анализ показал существенные различия между линиями. Линия MSCWJ-2 имеет клональную перестройку короткого плеча хромосомы 7 в 28 % исследованных клеток в отличие от линии MSCWJ-1, у которой незначительное количество неклональных хромосомных перестроек. Для определения статуса линий провели анализ поверхностных маркеров с помощью проточной цитофлуориметрии. Анализ выявил в обеих линиях экспрессию поверхностных антигенов, характерных для МСК человека (CD44, CD73, CD90, CD105, HLA-ABC и виментин), и отсутствие экспрессии CD34, CD45 и HLA-DR. В обеих линиях показана экспрессия маркеров недифференцированных эмбриональных клеток человека (ЭСК) — SSEA-4 и SOX2. Обе линии экспрессируют маркеры ранней дифференцировки ЭСК в производные трех зародышевых листков. Показана способность обеих линий дифференцироваться в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях, что также подтверждает статус МСК. В отличие от линии MSCWJ-2 в линии MSCWJ-1 имеет место спонтанная эндотелиальная дифференцировка. Наблюдаемые межлинейные различия по некоторым характеристикам требуют продолжения исследований динамики кариотипического изменения при длительном культивировании и сопоставления полученных результатов с процессами старения этих линий, а также проведения сравнительного анализа ряда других характеристик МСК на ранних и поздних пассажах.

**Ключевые слова:** мезенхимные стволовые клетки человека, пролиферация, репликативное старение, поверхностные клеточные маркеры, кариотип, дифференцировка.

В настоящее время актуальной задачей клеточной биологии является выделение и сравнительная характеристика мезенхимных стволовых клеток (МСК) человека, полученных из разных источников. Важность таких исследований вытекает из особенностей взаимодействия МСК, выделенных из разных тканей, со свойственным каждой ткани характерным микроокружением. Происхождение или источник получения МСК могут определять их функциональные характеристики. Но тем не менее, согласно требованиям Международного общества клеточной терапии, статус МСК разного происхождения определяется рядом общих характеристик. К таким характеристикам относятся адгезивность к культуральному пластику, активная пролиферация, экспрессия поверхностных маркеров CD105, CD90, CD73, CD44 и HLA-ABC и отсутствие экспрессии CD34, CD45 и HLA-DR, способ-

ность к дифференцировке в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях (Dominici, 2006; Sensebé et al., 2010).

Сравнительный анализ характеристик, являющихся определяющими в поддержании статуса МСК, а также ряда других характеристик, ответственных за важнейшие клеточные процессы, способствует углублению фундаментальных знаний о МСК человека, что важно как для понимания механизмов биологических процессов в клетке, так и для расширения возможностей для использования МСК в регенеративной медицине. В связи с важностью МСК для функционирования организма широко исследуются механизмы взаимодействия МСК с поврежденными тканями и органами. Показано, что важнейшим механизмом действия разных МСК на поврежденные ткани являются способность их к миграции в эти участки и

оказание трофического действия за счет секреции биоактивных факторов, изменяющих микроокружение поврежденных клеток и тем самым улучшающих тканевую репарацию. В настоящее время в литературе широко обсуждаются механизмы тканевой репарации с помощью МСК, связанные с продукцией цитокинов и паракринных факторов (Phinney, Prockop, 2007; Carvalho et al., 2011; Gruenloh et al., 2011; Guiducci et al., 2011; Huang et al., 2013; Luo et al., 2013; Ando et al., 2014; Hendijani et al., 2015a, 2015b; Danieli et al., 2016; Julianto, Rindastuti, 2016; Teixeira et al., 2016; Vulcano et al., 2016; Zachar et al., 2016).

К настоящему времени накопилось много работ по сравнительному анализу МСК человека, выделенных из разных взрослых и эмбриональных тканей, а также из внезародышевых органов человека. Многие МСК, полученные из взрослых и эмбриональных тканей, включая ЭСК, имеют ограниченное применение из-за инвазивного способа их получения, малого количества полученных клеток в связи с невысоким пролиферативным потенциалом или этических проблем (Bongso, Fong, 2013). В связи с этим большое внимание уделяется выделению МСК из внезародышевых органов, которые формируются в 1-е нед беременности, а получение МСК из этих органов не связано с перечисленными ограничениями. К внезародышевым органам относятся амнион, желточный мешок, аллантоис, хорион, плацента и пупочный канатик. Наше внимание привлеч пупочный канатик, который состоит из разных компартментов, т. е. разных клеточных популяций.

Эти клетки происходят из эпибласта и в связи с этим имеют ряд промежуточных свойств между эмбриональными (ЭСК) и взрослыми стволовыми клетками. МСК выделяли из разных компартментов — из периваскулярного пространства, стенок сосудов, крови, эндотелия и Вартонова студня. Есть данные о том, что МСК, выделенные из разных компартментов пупочного канатика, представляют собой популяции, различающиеся по некоторым свойствам. Сравнительный анализ основных характеристик МСК из разных компартментов пупочного канатика убедительно доказывает, что МСК из Вартонова студня (WJ-MSC) являются наилучшим источником для регенеративной медицины (Conconi et al., 2011; Bongso, Fong 2013).

Рядом авторов проведены сравнительные исследования свойств WJ-MSC, ЭСК и взрослых МСК (Fong et al., 2007; Hsieh et al., 2010; Nekanti et al., 2010; Fong et al., 2011; Balasubramanian et al., 2013; Bongso, Fong, 2013; Lian et al., 2016). В частности, показано, что WJ-MSC экспрессируют большое количество генов, общих с ЭСК, а также низкий уровень ряда маркеров недифференцированных ЭСК, имеют высокую пролиферативную активность, расширенный дифференцировочный потенциал, близкий к ЭСК, в отличие от ЭСК не образуют тератом в иммунодефицитных мышах. По сравнению с МСК костного мозга WJ-MSC проходят большее число пассажей до наступления фазы старения, имеют более высокий дифференцировочный потенциал до поздних пассажей при сохранении кариотипической стабильности, а также проявляют дифференцировочную пластичность, экспрессируя ряд эндодермальных и эктодермальных маркеров. Возможно, что МСК костного мозга и WJ-MSC имеют разную степень коммитированности. WJ-MSC, подобно МСК из других источников, обладают высоким уровнем экспрессии туморсупрессорных генов и низкой иммуногенностью, что благоприятствует их использованию в регенеративной медицине (Fong et al., 2011; Gauthaman et al., 2012; Wang et al., 2016).

Необходимо обратить внимание на принципиальное различие между WJ-MSC и ЭСК по геномной стабильности, которая крайне важна для использования стволовых клеток в регенеративной медицине. В плюрипотентных ЭСК имеет место более высокая степень цитогенетических изменений, чем в МСК, включая WJ-MSC, что является существенным преимуществом МСК перед ЭСК для использования в клеточных технологиях. Часть геномных изменений в ЭСК носит адаптивный характер. Эти адаптивные кариотипические изменения, частота которых существенно увеличивается при длительном культивировании, с одной стороны, способствуют постоянному самообновлению ЭСК, а с другой — малигнизации. Геномная нестабильность в дифференцированных производных опосредована возможностью перехода адаптивных изменений ЭСК в дифференцированные производные, а также возникновением геномных изменений под влиянием новых условий культивирования, связанных с направленной дифференцировкой (Полянская, 2014). Также WJ-MSC имеют преимущество и перед индуцированными стволовыми клетками человека (иПСКч), в которых по сравнению с ЭСК выявлены существенные цитогенетические изменения, туморогенность в иммунодефицитных мышах и более эффективное образование тератом (Gutierrez-Aranda et al., 2010; Laurent et al., 2011). Поэтому пока не преодолены эти препятствия, иПСКч преимущественно могут быть использованы только для изучения патогенеза болезней и в качестве технологической платформы для скрининга лекарственных препаратов (Bongso, Fong, 2013).

Таким образом, WJ-MSC представляют собой перспективный материал для изучения механизмов влияния МСК на различные клеточные процессы, а также для использования их в регенеративной медицине. Причем при одинаковой выраженности признака предпочтение для использования в биомедицинских технологиях отдается WJ-MSC вместо взрослых или эмбриональных МСК в связи с отсутствием этических проблем при выделении клеток (Karaoz et al., 2016).

Тем не менее, несмотря на общую характеристику WJ-MSC, свидетельствующую о ряде преимуществ этого типа клеток перед взрослыми МСК, представляет существенный интерес получить новые линии WJ-MSC и сравнить их свойства с уже полученными нами ранее МСК, в частности выделенными из раннего эмбриона человека и ЭСК (Крылова и др., 2012, 2014). Особый интерес представляет сравнительный анализ экспрессии маркеров ЭСК в новых линиях WJ-MSC и в изученных ранее МСК разного происхождения. Данные из литературы по экспрессии Oct-4, SOX2, SSEA-4 и TRA-1-60 в МСК противоречивы, нет четкой зависимости экспрессии этих маркеров от стадии онтогенеза, в которой находится источник получения линии МСК. Функциональное значение экспрессии этих генов в МСК также окончательно не выяснено (Yen et al., 2005; Fong et al., 2007; Gang et al., 2007; Roubelakis et al., 2007; Mihy et al., 2009; Riekstina et al., 2009; Kita et al., 2010; Trubiani et al., 2010; Mamidi et al., 2011; Крылова и др., 2012, 2014, 2016; Aghajani et al., 2016; Matic et al., 2016). В связи с этим необходимо дальнейшее изучение экспрессии этих маркеров.

Таким образом, задачей данной работы является получение двух новых линий WJ-MSC, выделенных от разных доноров, и характеристика их по основным маркерам МСК человека, включая маркеры ЭСК.

## Материал и методика

Клетки были выделены из Вартонова студня пупочного канатика от двух доноров. Из фрагмента пупочного канатика (3—4 см в длину), тщательно отмытого от клеток крови в среде, содержащей гентамицин, стерильным одноразовым хирургическим скальпелем вырезали участок Вартонова студня, расположенного между двумя пупочными венами и артерией. Клетки от разных доноров выделяли разными методами — механическим и ферментативным. Ферментативный метод состоит в следующем: фрагмент Вартонова студня механически измельчали и подвергали ферментативной дезагрегации смесью коллагеназы 1-го и 4-го типов (Sigma, Германия) в соотношении 1 : 1 с концентрацией 0.075 %. Ферментацию проводили в центрифужной пробирке при 37 °С в течение 30 мин, периодически перемешивая содержимое пробирки. После ферментации суспензию фильтровали, переносили в новые центрифужные пробирки и центрифугировали в течение 6 мин при 1000 об/мин. Осадок ресуспендировали в полной ростовой среде, содержащей 90 % среды DMEM/F12 (Gibco-Invitrogen, США), 2 мМ глутамина (Sigma, Германия) и 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (Hyclone, США). Клетки высевали в чашки Петри в концентрации  $(5—6) \cdot 10^4$  кл./см<sup>2</sup>.

Механический метод состоит в следующем: фрагмент Вартонова студня при помощи скальпеля измельчали на небольшие кусочки размером 1—3 мм<sup>3</sup>, переносили в чашку Петри и для фиксации их на поверхности накрывали предметным стеклом. В чашку добавляли ростовую среду, в состав которой входил антибиотик гентамицин в концентрации 50 мкг/мл (Биолот, Россия). Фрагменты ткани в чашках культивировали при 37 °С в 5 % CO<sub>2</sub> в течение 2 нед. Среду меняли каждые 3—4 сут. За время культивирования фибробластоподобные клетки «выползали» из фрагментов ткани, образуя обширные зоны роста. К концу 2-й нед предметные стекла из чашек Петри убрали, а зоны роста фибробластоподобных клеток обрабатывали 0.25%-ным раствором Трипсин-ЭДТА (Gibco, Англия) и пересевали на новую чашку Петри. Продолжали культивировать стандартным методом. Далее клетки, полученные двумя способами, культивировали в ростовой среде, содержащей 90 % среды DMEM/F12 и 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (FBS), в условиях 5 % CO<sub>2</sub> при 37 °С и влажности 90 %. Среду меняли каждые 2—3 сут до образования 80%-ного конфлюэнта. Затем проводили еще 5 пассажей, получив в результате 2 неиммortalизованные клеточные линии, названные MSCWJ-1 и MSCWJ-2. Все характеристики этих линий получали 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 14 сут клетки окрашивали 1%-ным водным раствором кристалл-виолета и на чашках Петри считали число колоний. Эффективность клонирования определяли отношением числа выросших колоний (клонов) к числу посеянных клеток в %.

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

Старение клеток определяли по активности фермента SA-β-галактозидазы. Клетки линий MSCWJ-1 и 2 выращивали в 3.5-сантиметровых чашках Петри до об-

разования конфлюэнта. Затем среду удаляли и окрашивали клетки с помощью набора реактивов Senescence SA-β-galactosidase (Cell Signaling, США) при pH 6.0 согласно инструкции. Клетки, вступающие в фазу репликативного старения, имеют ярко-синюю окраску цитоплазмы. Анализ проводили с помощью инвертированного микроскопа (NICON, Япония) на 6, 13, 20 и 25-м пассажах.

Для характеристики пролиферативной активности оценивали индекс пролиферации (ИП) — отношение числа клеток в текущий 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—6 сут (120—144 ч). Среднее время одного удвоения клеточной популяции ( $a_0$ ) определяли по формуле (Седова, 2008):

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

где  $M_t$  — число клеток в момент времени  $t$ ,  $M_0$  — начальное число клеток,  $t$  — время логарифмической фазы роста клеточной культуры. Пролиферативную активность анализировали на 6-м пассаже для линии MSCWJ-1 и MSCWJ-2.

Кариотипический анализ проводили на 6-м пассаже. Для получения препаратов метафазных хромосом за 2 ч до фиксации в культуры клеток вводили колцемид KaryoMAX (0.1 мкг/мл, Gibco, США), клетки диссоциировали 0.25%-ным раствором Трипсин-ЭДТА (Gibco, Англия) 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, Германия). 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 100 метафаз для каждой линии. Кариотип анализировали с помощью микроскопа Axio Imager.M1 (Carl Zeiss, Германия) 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). Экспрессию каждого маркера оценивали по результатам 3—5 экспериментов для клеток, находящихся на 6-м пассаже. Иммунофенотипирование проводили с помощью панели конъюгатов CD-маркерных моноклональных антител с флуорохромами. В работе использовали моноклональные антитела против CD34, CD45, HLA-ABC и HLA-DR (Caltac, США), CD44, CD73, CD105 (Beckman Coulter, США), CD90 и CD31 (BD Pharmingen, США). В качестве негативного контроля использовали очищенные мышинные

антитела IgG1/Fitc и IgG1/RFE (DAKO, Дания). Клетки снимали с поверхности чашки с помощью 0.05%-ного раствора Трипсин-ЭДТА (Gibco, США) и отмывали от него раствором PBS, не содержащим ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  (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 и 0.05 % азида натрия).

Для иммунофлуоресцентного анализа экспрессии поверхностных маркеров, характерных для эмбриональных стволовых клеток человека (ЭСК), и экспрессии маркеров ранней дифференцировки ЭСК в производные трех зародышевых листков использовали антитела против транскрипционного фактора Oct-4 (Santa Cruz, США), TRA-1-60,  $\alpha$ -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, блокировали 1%-ным раствором BSA (Sigma, ФРГ) 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, окрашенные только со вторыми антителами. Визуализацию проводили с помощью микроскопа Zeiss LSM 5 Pascal (Германия).

Для количественной оценки маркеров недифференцированных ЭСК SSEA-4 (Santa Cruz, США), TRA-1-60 (Chemicon, США), SOX2 (Sigma, Германия) и мезенхимного маркера виментина использовали метод проточной цитофлуориметрии после проведения реакции иммунофлуоресценции в клеточной суспензии.

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

В качестве маркеров 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, Германия) в темноте при комнатной температуре. 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 ( $\text{AgNO}_3$ ) (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. Затем окрашенные клетки снова промывали водой и высушивали.

Сульфатированные гликозаминогликаны при хондрогенной дифференцировке идентифицировали по окраске 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  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ , 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.

Для выявления спонтанной эндотелиальной дифференцировки клетки линий MSCWJ-1 и MSCWJ-2 доводили до полного монослоя и исследовали морфологическую структуру клеток через 3—4 сут после образования монослоя. В качестве контроля использовали линию МСК, выделенных из костного мозга раннего эмбриона человека, — FetMSC, полученную из ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных» (Института цитологии РАН, Санкт-Петербург). Подробные характеристики этой линии описаны ранее (Крылова и др., 2012). С помощью проточной цитофлуориметрии была проведена проверка экспрессии маркера CD31, свидетельствующего о начале эндотелиальной дифференцировки.

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 Вартонова студия, MSCWJ-1 и MSCWJ-2. Морфологический анализ этих линий показал однородность клеточных популяций со средними по размеру вытянутыми фибробластоподобными клетками (рис. 1).

Анализ репликативного старения клеток показал отсутствие старения на 6-м пассаже. На более поздних пассажах имеют место различия между линиями.

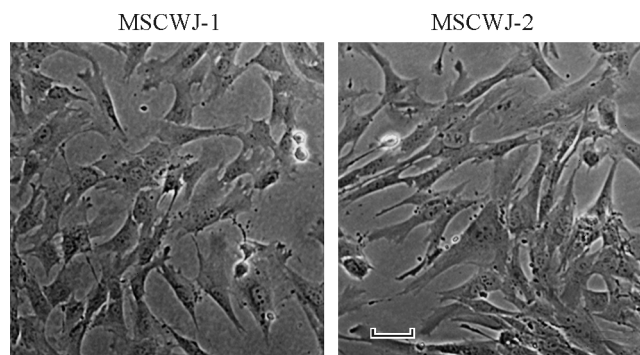


Рис. 1. Прижизненные фотографии клеток линий MSCWJ-1 (а) и MSCWJ-2 (б).

Масштабный отрезок — 50 мкм.

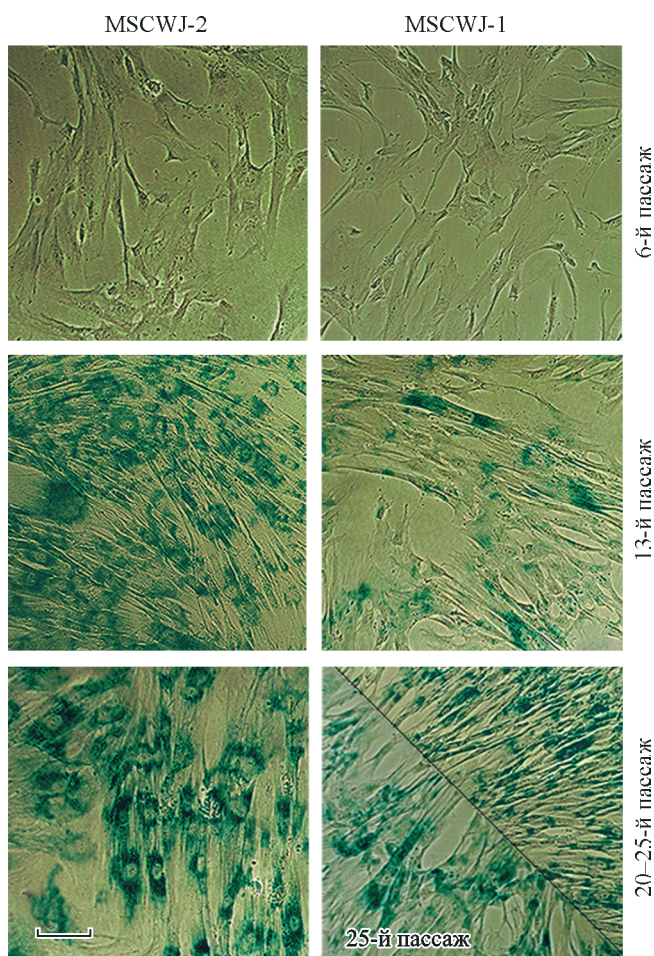


Рис. 2. Окрасивание клеток для выявления активности  $\beta$ -галактозидазы в линиях MSCWJ-1 и MSCWJ-2 на разных пассажах.

Использовали набор реактивов Senescence SA- $\beta$  galactosidase staining kit на 6, 13, 20 и 25-м пассажах. Масштабный отрезок — 50 мкм.

В линии MSCWJ-1 обнаружены признаки старения клеточных популяций по наличию значительной активности  $\beta$ -галактозидазы на 20-м и 25-м пассажах (рис. 2). В линии MSCWJ-2 вступление клеток в фазу старения, определенное по значительному увеличению активности  $\beta$ -галактозидазы, обнаружено гораздо раньше — уже на 13-м пассаже, что подтверждается и на 20-м пассаже (рис. 2). В линии MSCWJ-1 на 13-м пассаже было обнаружено небольшое количество окрашенных клеток в поле зрения по сравнению с линией MSCWJ-1. Также показано изменение морфологии клеток в процессе старения. На более поздних пассажах наблюдается увеличение размеров и степени распластанности клеток (рис. 2).

Ростовые характеристики определяли двумя методами — по эффективности клонирования и по кривым роста с определением среднего времени удвоения клеточных популяций. Для обеих линий при повторении каждого эксперимента трижды показана сходная низкая эффективность клонирования. Но размер выросших колоний при посеве 500 клеток на чашку 40 см<sup>2</sup> за 14 сут существенно различался. В линии MSCWJ-1 учет можно было проводить начиная с колоний, имеющих не менее 50 клеток. Эффективность клонирования была низкой —  $2.40 \pm 0.25$  %, тогда как в линии MSCWJ-2 за 14 сут колонии не дорастали до 50 клеток, а останавливались в ро-

сте при 20 клетках в колонии. При этом эффективность клонирования не отличалась от линии MSCWJ-1 и составляла  $2.80 \pm 0.90$  % ( $P > 0.05$ ). Поэтому исходя из полученных нами данных можно порекомендовать рассеивать эти клетки при культивировании с оптимальной плотностью  $\sim 5.0 \cdot 10^4$  кл./см<sup>2</sup>. По-видимому, как показано рядом авторов, эффективность клонирования зависит от первоначальной плотности посева клеток на культуральный сосуд в связи с возможным влиянием метаболических продуктов, секретируемых клетками, а также клеточной миграции, свойственной МСК. В связи с этим для строгой оценки клоногенной активности необходимо использовать посев единичных клеток с использованием 96-луночных плат (Sarugaser et al., 2009; Ali et al., 2015).

Далее получены результаты по характеристике пролиферативной активности при начальном посеве клеток с плотностью  $5.0 \cdot 10^4$  кл./см<sup>2</sup> на 6-м пассаже в линиях MSCWJ-1 и MSCWJ-2. Показано, что на 6-м пассаже клетки активно делятся. Анализ кривых роста показал, что время активной (логарифмической) фазы роста клеток MSCWJ-1 составляет 72, а MSCWJ-2 — 96 ч. Среднее время удвоения клеточных популяций одинаково для обеих линий и составляет  $26.8 \pm 0.8$  и  $26.8 \pm 0.6$  ч соответственно (рис. 3). Таким образом, 6-м пассаже, на котором анализировали характеристики МСК, соответствует 16—17 удвоениям клеточных популяций. Тем не менее эти линии существенно различаются по величине индекса пролиферации (ИП), характеризующего некоторые временные точки. Так, данные рис. 3 свидетельствуют о том, что в клетках MSCWJ-2 ИП существенно увеличивается через 96 и 120 ч по сравнению с линией MSCWJ-1 ( $P < 0.05$ ), в которой имеют место окончание логарифмической фазы роста и выход на плато через 96 ч.

Полученные результаты в целом подтверждают ограниченный срок жизни этих линий, что свойственно неиммортализованным клеточным линиям (Hayflick, 1965; Matsumura et al., 1979; Vonab et al., 2006). Тем не менее встает вопрос о возможных причинах наблюдаемых различий между линиями. В частности, возникло предположение о связи кариотипической стабильности линий со сроками репликативного старения клеточных популяций. Ранее мы наблюдали корреляцию между кариотипической нестабильностью и другим характерным свойством

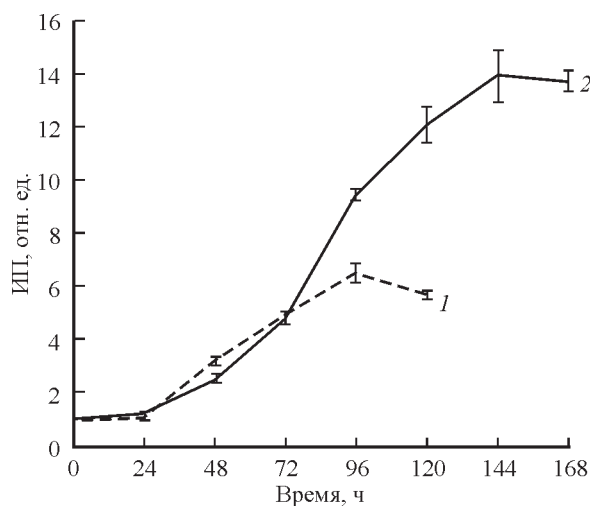


Рис. 3. Кривые роста клеток линий MSCWJ-1 (кривая 1) и MSCWJ-2 (кривая 2).

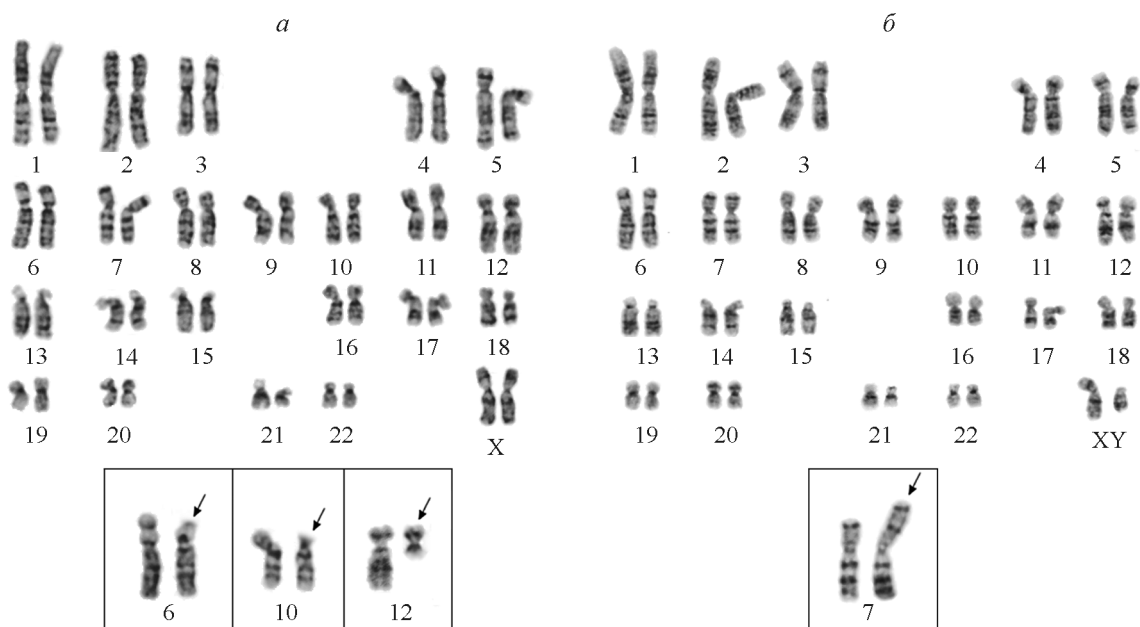


Рис. 4. Кариотипы (КП) клеточных линий MSCWJ-1 (а) и MSCWJ-2 (б). 6-й пассаж. КП линий: 46, XX.

а, *врезка* — структурно перестроенные хромосомы (*стрелки*), обнаруженные в отдельных клетках: del(6)(p22); del(10)(p11.2); del(12)(q13); 46, XY. б, *врезка* — клональная структурная перестройка хромосомы 7 (*стрелка*): der(7)(pter→p13::p?:p22→qter).

МСК — дифференцировочным потенциалом. Так, было показано наличие существенной кариотипической нестабильности, связанной с неклональными структурными перестройками (более 20%), в новой линии дермальных фибробластов (DF-3), соответствующей статусу МСК (Крылова и др., 2016). Была показана корреляция между слабой интенсивностью остеогенной дифференцировки в линии DF-3 и наибольшей кариотипической нестабильностью в ней в отличие от двух других полученных линий. Кроме того, была показана корреляция между аномальным кариотипом (45, X0) МСК линии SC6-MSK, существенно сниженной частотой поверхностных маркеров CD90 и CD105 и отсутствием адипогенной дифференцировки, характерных для кариотипически нормальных МСК человека (Кольцова и др., 2015). В связи с этим для характеристики полученных линий MSCWJ провели детальный анализ кариотипической структуры обеих линий.

Количественный кариотипический анализ линий MSCWJ-1 и MSCWJ-2 показал, что они характеризуются одинаковой высокой частотой клеток с модальным числом хромосом, равным 46 ( $98.0 \pm 1.4$  и  $100 \pm 1.0$  %); доля полиплоидных клеток низкая и составляет  $2.4 \pm 0.7$  и  $1.5 \pm 0.5$  % соответственно.

Структурный кариотипический анализ показал, что обе линии имеют нормальный кариотип человека — 46, XX (MSCWJ-1); 46, XY (MSCWJ-2) (рис. 4). Тем не менее анализ 100 метафазных пластинок для каждой линии показал существенные различия между ними по кариотипической стабильности. Так, в линии MSCWJ-1 неклональные структурные перестройки выявлены в 3 из 100 кариотипированных клеток (рис. 4, а). В 3 клетках обнаружены делеции: в хромосоме 6 — del(6)(p22), в хромосоме 10 — del(10)(p11.2), в хромосоме 12 — del(12)(q13). Частота клеток с хромосомными аномалиями в этой линии составляет  $3.0 \pm 1.7$  %. В линии MSCWJ-2 обнаружена 1 клональная перестройка ко-

роткого плеча хромосомы 7 — der(7)(pter→p13::p?:p22→qter) (рис. 4, б). С целью уточнения полученных результатов по наличию клональной хромосомной перестройки на 6-м пассаже этой линии было проведено повторное кариотипирование 100 клеток, которое подтвердило присутствие структурной перестройки короткого плеча хромосомы 7. Средняя частота встречаемости клональной перестройки при анализе 200 клеток составляет  $28.0 \pm 3.2$  %. Следовательно, наибольшей кариотипической нестабильностью на 6-м пассаже обладает линия MSCWJ-2.

В настоящее время в большом количестве полученных разными исследователями линиях МСК показана кариотипическая стабильность. Но тем не менее накапливается экспериментальный материал, свидетельствующий о наличии кариотипической нестабильности в ряде клеточных линий МСК (Полянская, 2014). Исследования проводятся как на ранних пассажах, так и при длительном культивировании МСК. Есть данные, показывающие уменьшение частоты хромосомных aberrаций в МСК костного мозга в процессе культивирования, т. е. на 3-м пассаже их больше, чем на 5-м и 7-м (Stultz et al., 2016). Авторы предполагают, что это явление связано с адаптацией клеточной культуры к условиям *in vitro*. Напротив, есть данные, связывающие повышение уровня кариотипической изменчивости при длительном культивировании с процессами репликативного старения немортализированных клеточных популяций (Estrada et al., 2013). Известно также, что репликативное старение — это комплексный процесс, включающий в себя многие процессы — остановку пролиферации, морфологические изменения, увеличенную активность SA-β-галактозидазы, повышение уровня экспрессии туморсупрессорных генов и др. Показано, что этот процесс начинается от первых пассажей МСК и постепенно усиливается в процессе культивирования (Wagner et al., 2008; Estrada et al., 2013; Savickiene et al., 2016). В связи с этим представляется су-

пещественным в дальнейшем продолжить работу по изучению динамики кариотипической изменчивости при длительном культивировании и сопоставлению полученных результатов с процессами старения этих линий.

Надо подчеркнуть, что клетки линий MSCWJ-1 и MSCWJ-2 были выделены из Вартонова студня разными методами — ферментативным (MSCWJ-1) и механическим (MSCWJ-2). Есть точка зрения, согласно которой механический метод более оптимален для дальнейшей стабильности клеточных культур, в частности для кариотипической стабильности. Возможно, это связано с тем, что пересев единичных клеток при ферментативном способе может способствовать селективному преимуществу аномальных клеток, обладающих повышенной клоногенной активностью. Кроме этого, ферментативный метод оказывает на клетки более сильный стресс, чем механический, при переводе клеток в условия *in vitro* (Полянская, 2014; Hendijani et al., 2014; Oliver-Vila et al., 2015; Arutyunyan et al., 2016). Но в настоящем исследовании, несмотря на преимущества механического метода, именно в линии MSCWJ-2 обнаружена кариотипическая нестабильность. Возможно, что причиной межлинейных различий по кариотипической нестабильности являются различия между донорами, что предполагали и ранее при анализе хромосомных нарушений в линиях МСК костного мозга (Stultz et al., 2016).

Для подтверждения статуса МСК полученных линий MSCWJ-1 и MSCWJ-2 с помощью проточной цитофлуориметрии провели сравнительный анализ поверхностных маркеров, характерных для МСК. Анализ подтвердил наличие статуса МСК в обеих линиях и отсутствие существенных различий между ними по основным маркерам МСК (табл. 1). Из представленных результатов следует наличие экспрессии поверхностных антигенов, характерных для МСК человека: CD44, CD73, CD90, CD105 и виментин. Выявлено отсутствие или низкая частота экспрессии антигенов CD34, CD45 и HLA-DR. Таким образом, согласно требованиям Международного общества клеточной терапии, для полученных линий подтвержден статус МСК (Domonici, 2006; Sensebé et al., 2010). Эти данные совпадают с полученными нами ранее на МСК, выделенных из разных источников — эмбриональных стволовых клеток, костного мозга, зачатка конечности раннего эмбриона, крайней плоти 3-летнего ребенка, дермальных фибробластов взрослых доноров, а также данными других авторов (Halfon et al., 2011; Крылова и др., 2012, 2014, 2016; Somasundaram et al., 2015; Denu et al., 2016; Lim et al., 2016). Тем не менее следует отметить некоторые количественные межлинейные различия по основным маркерам МСК. Так, в линии MSCWJ-2 имеют место достоверное увеличение уровня экспрессии виментина и уменьшение экспрессии CD105 по сравнению с MSCWJ-1.

В наших предыдущих исследованиях, в которых характеризовали линии МСК, выделенные из разных источников, показаны количественные колебания в экспрессии поверхностных маркеров, подтверждающих статус МСК. Так, в линиях МСК, выделенных из ЭСК человека, наблюдали значительное снижение экспрессии CD90 по сравнению с линиями МСК из костного мозга эмбриона и крайней плоти ребенка (Крылова и др., 2012). В линии МСК, выделенной из мышцы конечности раннего эмбриона человека M-FetMSC, имело место значительное увеличение экспрессии виментина по сравнению с линией МСК из костного мозга (FetMSC) того же донора (Крыло-

Таблица 1

**Экспрессия (%) поверхностных маркеров в клетках линий MSCWJ-1 и MSCWJ-2**

Маркер	MSCWJ-1	MSCWJ-2
CD44	99.50 ± 0.30	99.60 ± 0.20
CD73	99.40 ± 0.20	99.00 ± 0.50
CD90	99.40 ± 0.04	92.70 ± 3.40
CD105	95.40 ± 3.00 <sup>a</sup>	78.40 ± 5.40 <sup>a</sup>
Виментин	30.50 ± 3.90 <sup>a</sup>	72.50 ± 3.25 <sup>a</sup>
CD34	0.07 ± 0.05	0.09 ± 0.06
CD45	0.32 ± 0.15	0.76 ± 0.50
HLA-ABC	92.60 ± 5.10	98.40 ± 0.48
HLA-DR	1.50 ± 1.30	5.17 ± 1.24
SSEA-4	6.40 ± 2.00 <sup>a</sup>	19.00 ± 4.40 <sup>a</sup>
SOX2	60.00 ± 15.00	22.70 ± 7.00

Примечание. Даны средние значения доли клеток (несущих маркер) и их ошибки из 3—5 экспериментов. <sup>a</sup> Достоверные различия между линиями.

ва и др., 2014). Показаны значительные количественные различия в экспрессии поверхностных маркеров CD90 и CD105 между монослойными культурами линий FetMSC и M-FetMSC и клеточными сфероидными, полученными из них (Крылова и др., 2015). Надо подчеркнуть, что функционально CD90 и CD105 связаны с важнейшими клеточными процессами, такими как межклеточные взаимодействия, миграция, клеточная пролиферация и дифференцировка (Maleki et al., 2014). Из данных литературы и собственных исследований следует, что уровень экспрессии поверхностных маркеров может зависеть от условий культивирования и от разного микроокружения, к которому адаптированы конкретные МСК (Frith et al., 2010; Nekanti et al., 2010; Крылова и др., 2012, 2014, 2015; Bongso, Fong, 2013; Alimperti et al., 2014; Maleki et al., 2014; Woo et al., 2016). Кроме того, ранее нами показано значительное снижение уровня экспрессии CD90 и CD105 в линии МСК, выделенной из ЭСК (SC6-MSC), по сравнению с другими линиями, полученными из ЭСК (SC5-MSC и SC3a-MSC).

Основываясь на этих результатах, а также на результатах настоящего исследования, можно предположить, что изменение уровня экспрессии основных поверхностных маркеров МСК могут носить не только возможный эпигенетический, но и генетический характер. Это следует из данных кариотипического анализа, свидетельствующего об устойчивом отсутствии одной X-хромосомы в кариотипе линии SC6-MSC (Кольцова и др., 2015) или о наличии кариотипической нестабильности, включая присутствие клональных хромосомных aberrаций, в линии MSCWJ-2, показанной в настоящем исследовании. Тем не менее в недавнем исследовании проведен протеомный анализ белков, связанных с дифференцировочным процессом МСК, выделенных из разных источников (Jeon et al., 2016). Авторы убедительно показали, что, несмотря на количественное сходство экспрессии характерных для МСК из разных источников поверхностных антигенов, имеют место различия между интенсивностью адипогенной, остеогенной и хондрогенной дифференцировки МСК. Обнаружены существенные молекулярные различия между МСК из разных источников. Эти результаты

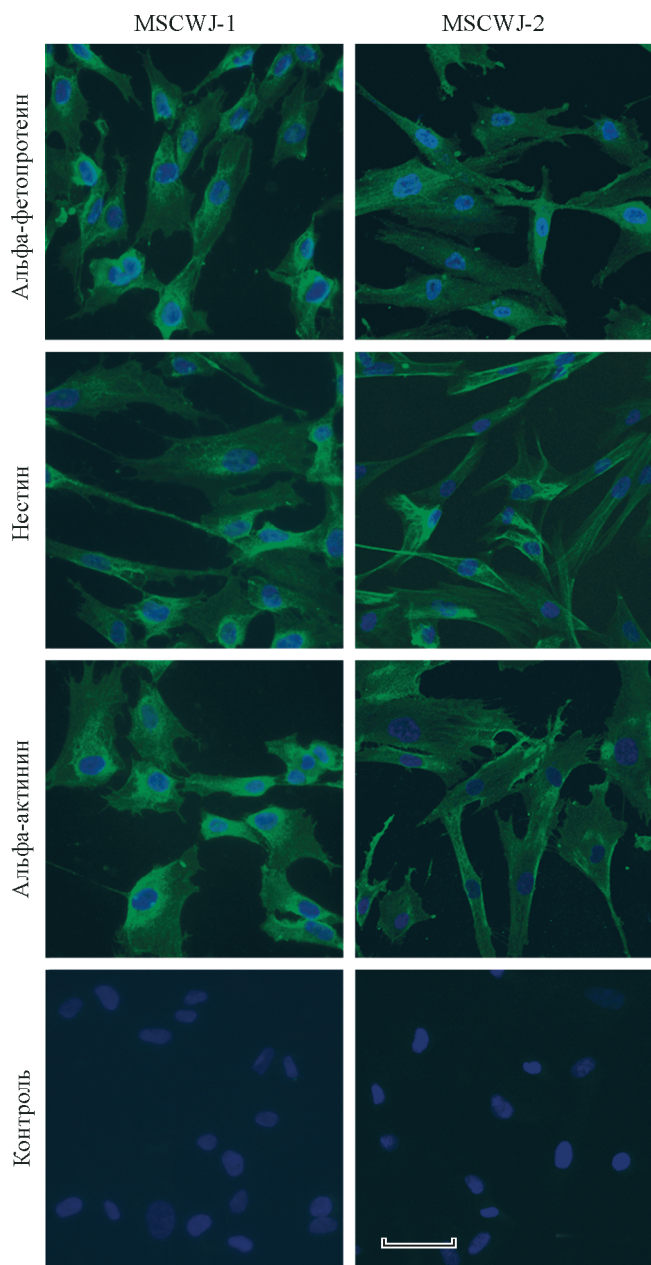


Рис. 5. Идентификация маркеров ранней дифференцировки эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) в клетках линий MSCWJ-1 и MSCWJ-2. Флуоресценция соответствующих моноклональных антител.

Показаны маркеры ранней дифференцировки ЭСК: альфа-фетопрогеина (маркера эндодермы), нестина (маркера эктодермы) и альфа-актинина (маркера мезодермы). Масштабный отрезок — 50 мкм.

крайне важны как для дальнейшего изучения биологии МСК человека, так и для клинических результатов при использовании разных МСК в биомедицинских технологиях.

Экспрессия маркеров недифференцированных ЭСК неодинакова в клетках двух линий. Так, несмотря на то что экспрессия SSEA-4 и SOX2 обнаружена в обеих линиях, имеют место межлинейные различия по уровню экспрессии. Так, в линии MSCWJ-2 уровень экспрессии SSEA-4 выше, чем в MSCWJ-1 ( $P < 0.05$ ). Экспрессия SOX2 выше в линии MSCWJ-1 по сравнению с MSCWJ-2, но наблюдается большой разброс по экспрессии этого маркера между клеточными популяциями,

поэтому различия при анализе 3 экспериментов в каждой линии не выявили достоверных различий (табл. 1). В обеих линиях обнаружено отсутствие экспрессии другого поверхностного маркера ЭСК — TRA-1-60 — и транскрипционного фактора Oct-4, что показано с помощью иммунофлуоресцентного анализа (данные не представлены, так как соответствуют контролю со вторыми антителами; рис. 5).

В настоящее время получено много экспериментальных данных, подтверждающих наличие экспрессии мар-

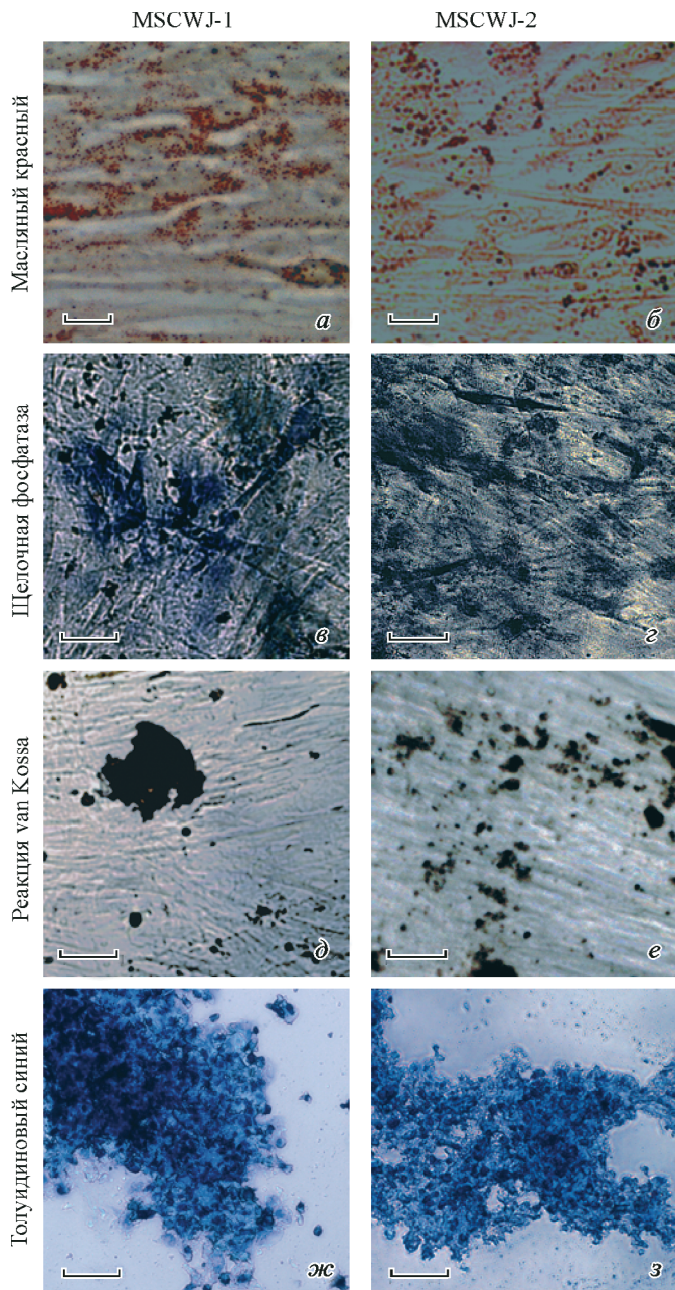


Рис. 6. Дифференцировка клеток линий MSCWJ-1 и MSCWJ-2 в адипогенном (а, б), остеогенном (в–е) и хондрогенном (ж, з) направлениях.

а, б — окрашивание жировых включений масляным красным; в, г — окрашивание на щелочную фосфатазу; д, е — реакция van Kossa, выявляющая нерастворимые соли кальция в межклеточном пространстве; ж, з — окраска толуидиновым синим.

Масштабные отрезки — 20 (а, б) и 50 (в–з) мкм.



Т а б л и ц а 2

## Экспрессия (%) поверхностного маркера CD31 в клетках линий MSCWJ-1, MSCWJ-2 и FetMSC

Клетки	MSCWJ-1	MSCWJ-2	FetMSC
Недифференцированные	1.17 ± 0.47 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.35	0.26 ± 0.01
Спонтанно дифференцированные	6.24 ± 1.10 <sup>a</sup>	1.01 ± 0.18	0.22 ± 0.10

Пр и м е ч а н и е. Даны средние значения доли клеток (несущих маркер) и их ошибки из 4–5 экспериментов. <sup>a</sup> Достоверные различия между клетками.

керов ЭСК в разных линиях МСК. Но пока эти исследования находятся на этапе накопления экспериментальных результатов без серьезных попыток обобщения их роли в функционировании МСК. Не выявлено зависимости наличия экспрессии этих маркеров от стадии онтогенеза, в которой находится источник получения линии МСК. Тем не менее при изучении сигнальных путей в клетке показано, что фактор SOX2 активно участвует в процессах пролиферации и дифференцировки МСК, выделенных как из эмбриональных, так и из взрослых тканей (Park et al., 2012).

Экспрессии в ЭСК фактора Oct-4 не было обнаружено ни в одной из полученных нами линий МСК. Небольшой уровень экспрессии этого фактора был обнаружен в сфероиде, полученных из линий FetMSC, M-FetMSC (Крылова и др., 2015). Тем не менее экспрессия Oct-4 обнаружена во многих МСК, выделенных из разных источников, но по уровню экспрессии линии МСК разного происхождения могут существенно различаться (Fong et al., 2007; Roubelakis et al., 2007; Riekstina et al., 2009; Guo et al., 2014; Aghajani et al., 2016; Lim et al., 2016). Есть данные о том, что экспрессия Oct-4 имеет место не только в недифференцированных МСК, но и в процессе остеогенной дифференцировки (Matic et al., 2016). Таким образом, возможно, что функциональная роль Oct-4 связана, подобно SOX2, как с пролиферацией, так и с дифференцировкой. Кроме того, есть ряд данных, свидетельствующих об отсутствии связи между стадией онтогенеза и экспрессией Oct-4. Так, увеличение уровня его экспрессии при образовании сфероидов показано не только в нашей работе, но и в сфероиде, полученных из МСК плаценты человека, что обусловлено эпигенетическими изменениями при образовании сфероидов, стимулирующими экспрессию Oct-4 (Guo et al., 2014).

В полученных нами линиях МСК маркер SSEA-4 с разным уровнем экспрессии обнаружен в линиях SC5-MSC, FetMSC, M-FetMSC и FRSN (фибробласты крайней плоти), DF-1, DF-2 и DF-3 (дермальные фибробласты из кожи век взрослых доноров), в гиподиплоидной линии SC6-MSC (Крылова и др., 2012, 2014, 2015, 2016; Кольцова и др., 2015). Из этих данных следует, что стадия онтогенеза не является определяющей в экспрессии этого маркера. Также это следует из результатов работы, где показан разный уровень экспрессии SSEA-4 в зависимости от места изоляции МСК на протяжении одного пупочного канатика. Именно SSEA-4 и TRA-1-60 экспрессируются только в материнской и эмбриональной частях канатика, а в средней части экспрессия отсутствует (Lim et al., 2016). Используемая нами область пупочного канатика относится к материнской части. Присутствие SSEA-4 на поверхности мультипотентных МСК ассоциируется со «стволовостью» разных клеточных популяций и предполагает перекрытие специализированных мета-

болических путей между плюрипотентными ЭСК человека и мультипотентными МСК. Показано, что МСК, выделенные из костного мозга и экспрессирующие SSEA-4, имеют более высокую пролиферативную активность, чем МСК, не экспрессирующие этого маркера (Gang et al., 2007). Таким образом, спектр данных о функциональных характеристиках маркеров недифференцированных ЭСК в МСК расширяется, так же как и увеличивается число методов, призванных решать эту важнейшую проблему.

Экспрессия маркеров ранней дифференцировки ЭСК в производные трех зародышевых листков показана с помощью иммунофлуоресцентного анализа (рис. 5). 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 разными методами также показана экспрессия этих маркеров в МСК, различных по происхождению (Riekstina et al., 2009; Huang et al., 2010; Antonucci et al., 2011; Mamidi et al., 2011). Механизмы взаимосвязи маркеров ранней дифференцировки с функциональной деятельностью МСК пока неизвестны. Есть разные предположения, имеющие противоположный характер: либо связь этих маркеров с дифференцировочной пластичностью МСК, либо связь этих маркеров исключительно с эмбриональным происхождением МСК (Riekstina et al., 2009; Sensebé et al., 2010).

Проведенная индукция остеогенной, хондрогенной и адипогенной дифференцировки в линиях MSCWJ-1 и MSCWJ-2 выявила способность клеток формировать костную, хрящевую и жировую ткани (рис. 6), что соответствует статусу МСК (Dominici et al., 2006; Sensebé et al., 2010). 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. 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 интенсивности этих дифференцировок не отмечено.

Привлекают внимание различия, наблюдаемые при спонтанной эндотелиальной дифференцировке полученных линий. Так, в отличие от ранее полученных нами линий МСК из разных источников в процессе культивирования линий MSCWJ-1 и MSCWJ-2 образование полного монослоя является критической точкой, в которой клетки линии MSCWJ-1 начинают претерпевать мор-

фологические изменения, отражающие начало эндотелиальной дифференцировки, и которые четко видны через 3—4 сут после образования монослоя. В клетках линии MSCWJ-2 и линии FetMSC этого не наблюдается. Одновременно была проведена проверка экспрессии маркера CD31, свидетельствующего о начале этой дифференцировки, которая показала достоверное увеличение уровня его экспрессии по сравнению с недифференцированными и контрольными (FetMSC) клетками  $P < 0.05$  (табл. 2). Ранее при проведении транскриптомного анализа было показано, что МСК, выделенные из Вартонова студня, имеют более высокий эндотелиальный дифференцировочный потенциал, чем МСК костного мозга (Hsieh et al., 2010). Возможно, что отсутствие признаков спонтанной эндотелиальной дифференцировки в линии MSCWJ-2 связано с ее кариотипической нестабильностью.

Таким образом, полученные 2 линии соответствуют по основным характеристикам статусу МСК согласно требованиям Международного общества клеточной терапии. Тем не менее линия MSCWJ-2, согласно проведенному кариотипическому анализу на 6-м пассаже, не может быть использована для прикладных исследований в регенеративной медицине, так как имеет высокую частоту встречаемости клональной хромосомной aberrации. Но эта линия является хорошей моделью для фундаментальных цитогенетических исследований, которые будут проводиться в дальнейшем.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФАНО по государственному заданию № 0124-2016-0007.

### Список литературы

- 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., Кольцова А. М., Крощачева И. В., Турилова В. И., Яковлева Т. К., Полянская Г. Г. 2016. Получение и характеристика неиммortalизованных клеточных линий дермальных фибробластов человека, выделенных из кожи век взрослых доноров разного возраста. Цитология. 58 (11): 850—864. (Krylova T. A., Musorina A. S., Zenin V. V., Koltsova A. M., Kropacheva I. V., Turilova V. I., Yakovleva T. K., Poljanskaya G. G. 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. Tsitologiya. 58 (11): 850—864.)
- Крылова Т. А., Мусорина А. С., Зенин В. В., Полянская Г. Г. 2015. Характеристика клеточных сфероидов, полученных из линий мезенхимных стволовых клеток, выделенных из костного мозга и зачатка конечности раннего эмбриона человека. Цитология. 57 (7): 480—490. (Krylova T. A., Musorina A. S., Zenin V. V., Poljanskaya G. G. 2015. Characteristic of the cellular spheroids, derived from mesenchymal stem cell lines from bone marrow and muscle of limb of early human embryo. Tsitologiya. 57 (7): 480—490.)
- 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. 2014. Проблема нестабильности генома культивируемых стволовых клеток человека. Цитология. 56 (10): 697—707. (Poljanskaya G. G. 2014. The problem of genomic instability of cultivated human stem cells. Tsitologiya. 56 (10): 697—707.)
- Седова Г. П. 2008. Количественные аспекты злокачественного роста. Математическая морфология. Электронный математ. и медико-биол. журн. 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 Mathemat. and Medicobiologic J. 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.
- Ali H., Al-Yatama M. K., Abu-Farha M., Behbehani K., Al Madhoun A. 2015. Multi-lineage differentiation of human umbilical cord Wharton's Jelly Mesenchymal Stromal Cells mediates changes in the expression profile of stemness markers. PLoS ONE. 10 (4): e0122465. Doi: 10.1371/journal.pone.0122465. eCollectio 2015.
- Alimperti S., Lei P., Wen Y., Tian J., Campbell A. M., Andreadis S. T. 2014. Serum-free spheroid suspension culture maintains mesenchymal stem cell proliferation and differentiation potential. Biotechnol. Prog. 30: 974—983.
- Ando Y., Matsubara K., Ishikawa J., Fujio M., Shohara R., Hibi H., Ueda M., Yamamoto A. 2014. Stem cell-conditioned medium accelerates distraction osteogenesis through multiple regenerative mechanisms. Bone. 61: 82—90.
- 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.
- Arutyunyan I., Elchaninov A., Makarov A., Fatkhudinov T. 2016. Umbilical cord as prospective source for mesenchymal stem cell-based therapy. Stem Cells Int. 2016: 6901286. Doi: 10.1155/2016/6901286.
- Balasubramanian S., Thej C., Venugopal P., Priya N., Zakaria Z., Sundarraj S., Majumdar A. S. 2013. Higher propensity of Wharton's jelly derived mesenchymal stromal cells towards neuronal lineage in comparison to those derived from adipose and bone marrow. Cell Biol. Int. 37: 507—515.
- 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. Doi:10.1186/1471-2121-7-14.
- Bongso A., Fong C. Y. 2013. The therapeutic potential, challenges and future clinical directions of stem cells from the Wharton's jelly of the human umbilical cord. Stem Cell Rev. 9: 226—240.
- Carvalho M. M., Teixeira F. G., Reis R. L., Sousa N., Salgado A. J. 2011. Mesenchymal stem cells in the umbilical cord: phenotypic characterization, secretome and applications in central nervous system regenerative medicine. Curr. Stem Cell Res. Ther. 6: 221—228.
- Conconi M. T., Di Liddo R., Tommasini M., Calore C., Parnigotto P. P. 2011. Phenotype and differentiation potential of stromal populations obtained from various zones of human umbilical cord:

an overview. The Open Tissue Engineering and Regenerative Medicine J. 4 : 6—20.

Danieli P., Malpasso G., Ciuffreda M. C., Gneccchi M. 2016. Testing the paracrine properties of human mesenchymal stem cells using conditioned medium. Methods Mol. Biol. 1416 : 445—456.

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.

Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop Dj., Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytother. 8 : 315—317.

Estrada J. C., Torres Y., Benguria A., Dopazo A., Roche E., Carrera-Quintanar L., Pérez R. A., Enriquez J. A., Torres R., Ramírez J. C., Samper E., Bernad A. 2013. Human mesenchymal stem cell-replicative senescence and oxidative stress are closely linked to aneuploidy. Cell Death Dis. 4 : e691. Doi: 10.1038/cddis.2013.211.

Fong C. Y., Chak L. L., Biswas A., Tan J. H., Gauthaman K., Chan W. K., Bongso A. 2011. Human Wharton's jelly stem cells have unique transcriptome profiles compared to human embryonic stem cells and other mesenchymal stem cells. Stem Cell Rev. 7 : 1—16.

Fong C. Y., Richards M., Manasi N., Biswas A., Bongso A. 2007. Comparative growth behaviour and characterization of stem cells from human Wharton's jelly. Reprod. Biomed. Online. 15 : 708—718.

Frith J. E., Thomson B., Genever P. G. 2010. Dynamic three-dimensional culture methods enhance mesenchymal stem cell properties and increase therapeutic potential. Tissue Eng. (C) Methods. 16 : 735—749.

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.

Gauthaman K., Fong C. Y., Suganya C. A., Subramanian A., Biswas A., Choolani M., Bongso A. 2012. Extra-embryonic human Wharton's jelly stem cells do not induce tumorigenesis, unlike human embryonic stem cells. Reprod. Biomed. Online. 24 : 235—246.

Gruenloh W., Kambal A., Sondergaard C., McGee J., Nacey C., Kalomoiris S., Pepper K., Olson S., Fierro F., Nolte J. A. 2011. Characterization and *in vivo* testing of mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cells. Tissue Eng. (A). 17 : 1517—1525.

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

Guo L., Zhou Y., Wang S., Wu Y. 2014. Epigenetic changes of mesenchymal stem cells in three-dimensional (3D) spheroids. J. Cell Mol. Med. 18 : 2009—2019.

Gutierrez-Aranda I., Ramos-Mejia V., Bueno C., Munoz-Lopez M., Real P. J., Mácia A., Sanchez L., Ligeró G., Garcia-Perez J. L., Menendez P. 2010. Human induced pluripotent stem cells develop teratoma more efficiently and faster than human embryonic stem cells regardless the site of injection. Stem Cells. 28 : 1568—1570.

Halfon S., Abramov N., Grinblat B., Ginis I. 2011. Markers distinguishing mesenchymal stem cells from fibroblasts are down-regulated with passaging. Stem Cells Develop. 20 : 53—66.

Hayflick L. 1965. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. Exp. Cell Res. 37 : 614—636.

Hendijani F., Javanmard Sh. H., Rafiee L., Sadeghi-Aliabadi H. 2015a. Effect of human Wharton's jelly mesenchymal stem cell secretome on proliferation, apoptosis and drug resistance of lung cancer cells. Res. Pharm. Sci. 10 : 134—142.

Hendijani F., Javanmard S.H., Sadeghi-Aliabadi H. 2015b. Human Wharton's jelly mesenchymal stem cell secretome display antiproliferative effect on leukemia cell line and produce additive cytotoxic effect in combination with doxorubicin. Tissue Cell. 47 : 229—234.

Hendijani F., Sadeghi-Aliabadi H., Haghjooy Javanmard S. 2014. Comparison of human mesenchymal stem cells isolated by explant culture method from entire umbilical cord and Wharton's jelly matrix. Cell Tissue Bank. 15 : 555—565.

Hsieh J. Y., Fu Y. S., Chang S. J., Tsuang Y. H., Wang H. W. 2010. Functional module analysis reveals differential osteogenic and stemness potentials in human mesenchymal stem cells from bone marrow and Wharton's jelly of umbilical cord. Stem Cells Develop. 19 : 1895—1910.

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.

Huang Y. C., Leung V. Y., Lu W. W., Luk K. D. 2013. The effects of microenvironment in mesenchymal stem cell-based regeneration of intervertebral disc. Spine J. 13 : 352—362.

Jeon Y. J., Kim J., Cho J. H., Chung H. M., Chae J. I. 2016. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, placenta, and adipose tissue as sources of cell therapy. J. Cell. Biochem. 117 : 1112—1125.

Julianto I., Rindastuti Y. 2016. Topical delivery of mesenchymal stem cells «secretomes» in wound repair. Acta Med. Indones. 48 : 217—220.

Karaoz E., Cetinalp Demircan P., Erman G., Güngörürler E., Eker Sariboyaci A. 2016. Comparative analyses of immune-suppressive characteristics of bone-marrow, Wharton's jelly and adipose-tissue derived human MSCs. Turk J. Haematol. Doi: 10.4274/tjh.2016.0171.

Kita K., Gauglitz G. G., Phan T. T., Herndon D. N., Jeschke M. G. 2010. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the sub-amniotic human umbilical cord lining membrane. Stem Cells Develop. 19 : 491—502.

Laurent L. C., Ulitsky I., Slavin I., Tran H., Schork A., Morey R., Lynch C., Harness J. V., Lee S., Barrero M. J., Ku S., Martynova M., Semechkin R., Galat V., Gottesfeld J., Izipisua Belmonte J. C., Murry C., Keirstead H. S., Park H. S., Schmidt U., Laslett A. L., Muller F. J., Nievergelt C. M., Shamir R., Loring J. F. 2011. Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. Cell Stem Cell. 8 : 106—118.

Lian J., Lv S., Liu C., Liu Y., Wang S., Guo X., Nan F., Yu H., He X., Sun G., Ma X. 2016. Effects of serial passage on the characteristics and cardiac and neural differentiation of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. Stem Cells Int. 2016:9291013. Doi: 10.1155/2016/9291013. 12 p.

Lim J., Razi Z. R., Law J., Nawi A. M., Idrus R. B., Ng M. H. 2016. MSCs can be differentially isolated from maternal, middle and fetal segments of the human umbilical cord. Cytotherapy. 18 : 1493—1502.

Luo J., Zhao X., Tan Z., Su Z., Meng F., Zhang M. 2013. Mesenchymal-like progenitors derived from human embryonic stem cells promote recovery from acute kidney injury via paracrine actions. Cytotherapy. 15 : 649—662.

Maleki M., Ghanbarvand F., Reza Behvarz M., Ejtemaei M., Ghadirkhomi E. 2014. Comparison of mesenchymal stem cell markers in multiple human adult stem cells. Int. J. Stem Cells. 7 : 118—126.

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.

Matic I., Antunovic M., Brkic S., Josipovic P., Mihalic K. C., Karlak I., Ivkovic A., Marijanovic I. 2016. Expression of OCT-4 and SOX-2 in bone marrow-derived human mesenchymal stem

cells during osteogenic differentiation. Open Access Maced J. Med. Sci. 4 : 9—16.

Matsumura T., Zerrudo Z., Hayflick L. 1979. Senescent human diploid cells in culture: survival, DNA synthesis and morphology. J. Gerontol. 34 : 328—334.

Mihu C. M., Rus Ciucă D., Soritău O., Suşman S., Mihu D. 2009. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the amniotic membrane. Rom. J. Morphol. Embryol. 50 : 73—77.

Nekanti U., Rao V. B., Bahirvani A. G., Jan M., Totey S., Ta M. 2010. Long-term expansion and pluripotent marker array analysis of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. Stem Cells Develop. 19 : 117—130.

Oliver-Vila I., Coca M. I., Grau-Vorster M., Pujals-Fonts N., Caminal M., Casamayor-Genescà A., Ortega I., Reales L., Pla A., Blanco M., García J., Vives J. 2016. Evaluation of a cell-banking strategy for the production of clinical grade mesenchymal stromal cells from Wharton's jelly. Cytotherapy. 18 : 25—35.

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

Park S. B., Seo K. W., So A. Y., Seo M. S., Yu K. R., Kang S. K., Kang K. S. 2012. SOX2 has a crucial role in the lineage determination and proliferation of mesenchymal stem cells through Dickkopf-1 and c-MYC. Cell Death Differ. 19 : 534—545.

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

Reyes M., Lund T., Lenvik T., Aguiar D., Koodie L., Verfaillie 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.

Sarugaser R., Hanoun L., Keating A., Stanford W. L., Davies J. E. 2009. Human mesenchymal stem cells self-renew and differentiate according to a deterministic hierarchy. PLoS ONE. 4 (8) : e6498. DOI: 10.1371/journal.pone.0006498.

Savickienė J., Baronaitė S., Zentelytė A., Treigytė G., Navakasuskienė R. 2016. Senescence-associated molecular and epigenetic alterations in mesenchymal stem cell cultures from amniotic fluid of normal and fetus-affected pregnancy. Stem Cells Int. 2016 : 2019498.

Sensebé L., Krampera M., Schrezenmeier H., Bourin P., Giordano R. 2010. Mesenchymal stem cells for clinical application. Vox Sang. 98 : 93—107.

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

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.

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.

Teixeira F. G., Carvalho M. M., Panchalingam K. M., Rodrigues A. J., Mendes-Pinheiro B., Anjo S., Manadas B., Behie L. A., Sousa N., Salgado A. J. 2016. Impact of the secretome of human mesenchymal stem cells on brain structure and animal behavior in a rat model of Parkinson's disease. Stem Cells Transl. Med. pii: sctm.2016-0071.

Trubiani O., Zalzal S. F., Paganelli R., Marchisio M., Giancola R., Pizzicannella J., Bühring H. J., Piattelli M., Caputi S., Nanci A. 2010. Expression profile of the embryonic markers nanog, OCT-4, SSEA-1, SSEA-4, and frizzled-9 receptor in human periodontal ligament mesenchymal stem cells. J. Cell. Physiol. 225 : 123—131.

Volcano F., Milazzo L., Ciccarelli C., Eramo A., Sette G., Mauro A., Macioco G., Martinelli A., La Torre R., Casalbore P., Hassan H. J., Giampaolo A. 2016. Wharton's jelly mesenchymal stromal cells have contrasting effects on proliferation and phenotype of cancer stem cells from different subtypes of lung cancer. Exp. Cell Res. 345 : 190—198.

Wagner W., Horn P., Castoldi M., Diehlmann A., Bork S., Saffrich R., Benes V., Blake J., Pfister S., Eckstein V., Ho A. D. 2008. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. PLoS ONE. 3 (5) : e2213. Doi: 10.1371/journal.pone.0002213.

Wang Q., Yang Q., Wang Z., Tong H., Ma L., Zhang Y., Shan F., Meng Y., Yuan Z. 2016. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from fetal-bone marrow, adipose tissue, and Wharton's jelly as sources of cell immunomodulatory therapy. Hum. Vaccin. Immunother. 12 : 85—96.

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.

Yen B. L., Huang H. I., Chien C. C., Jui H. Y., Ko B. S., Yao M., Shun C. T., Yen M. L., Lee M. C., Chen Y. C. 2005. Isolation of multipotent cells from human term placenta. Stem Cells. 23 : 3—9.

Zachar L., Bačenkova D., Rosocha J. 2016. Activation, homing, and role of the mesenchymal stem cells in the inflammatory environment. J. Inflamm. Res. 9 : 231—240.

Поступила 10 II 2017

#### DERIVATION AND CHARACTERISTIC OF TWO LINES OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS, GENERATED FROM THE WHARTON'S JELLY OF THE HUMAN UMBILICAL CORD

T. A. Krylova, A. M. Koltsova, A. S. Musorina, V. V. Zenin, 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

Two new non-immortalized human cell lines were generated from the Wharton's Jelly of the human umbilical cord of two donors called MSCWJ-1 and MSCWJ-2. Analysis of growth characteristics and differentiation potential of these cell lines has been studied and their status as mesenchymal stem cells confirmed. The main

characteristics were determined at the 6<sup>th</sup> passage. The average population doubling time determined for both lines is 26.8 h. The growth curves show that all the lines proliferate actively but have the differences in duration of active growth phase. The plating efficiency is low and similar for two cell lines. There are significant differences observed at the time of entry in phase of the replicative senescence. The cell line MSCWJ-2 enters a phase of active senescence much earlier (P13) than the cell line MSCWJ (P20—25). Morphological analysis shows typical aging phase changes associated with an increase in the size and extent of the spreading cells. Numerical karyotypic analysis show that the lines have normal karyotype of 46, XX and 46, XY. The structural karyotypic analysis show significant interline changes. The line MSCWJ-2 has clonal chromosomal rearrangement of the short arm of chromosome 7 at 28 % of the investigated cells in contrast to the line MSCWJ-1, which shows a small number of nonclonal chromosomal rearrangements. To determine status of these cell lines, comparative analysis of the surface markers was performed using flow cytometry. According to this analysis, all the lines showed expression of surface antigens being characteristic of human MSC: CD44, CD73, CD90, CD105, HLA-ABC, vimentin and did not express CD34, CD34 and HLA-DR. Flow cytometry analysis showed the presence of non-differentiated ESC-SSEA-4 and SOX2 in both lines. In both lines, expression of markers of early differentiation was shown in the derivatives of 3 germ layers. Capability of these cell lines to differentiate to osteogenic, chondrogenic and adipogenic directions is shown, that confirms the status of MSC. Unlike MSCWJ-2 line, spontaneous endothelial differentiation occurs in MSCWJ-1 line. The observed interline differences in some characteristics require further studies of the dynamics of karyotypic variability in long-term cultivation and comparing-the results obtained with the processes of aging of these lines, as well as a comparative analysis of a number of other characteristics of MSCs in the early and late passages.

**Key words:** human mesenchymal stem cells, proliferation, replicative senescence, surface cell markers, karyotype, differentiation.

---