

## ДИНАМИКА СВОЙСТВ ДВУХ ЛИНИЙ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ВАРТОНОВА СТУДНЯ ПУПОЧНОГО КАНАТИКА ЧЕЛОВЕКА, ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

*А. М. Кольцова,<sup>1</sup> Т. А. Крылова, 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: koltsova.am@mail.ru; poljansk@incras.ru*

Проведен сравнительный анализ характеристик двух линий мезенхимных стволовых клеток (МСК) человека, полученных из Вартонова студня пупочного канатика (MSCWJ-1 и MSCWJ-2), на раннем (6-м) и поздних (13-м и 28-м) пассажах. Получены следующие результаты. 1. При длительном культивировании изменяется морфология клеток у обеих линий, но в линии MSCWJ-2 клетки имеют более крупные размеры и большее количество дедбриса по сравнению с MSCWJ-1. 2. При длительном культивировании увеличивается среднее время удвоения клеточных популяций в обеих линиях, которое коррелирует с морфологическими изменениями клеток и постепенным увеличением активности β-галактозидазы, свидетельствующей о наступлении репликативного старения. Межлинейные различия связаны с уровнем пролиферативной активности, динамикой индекса пролиферации (ИП), временем вхождения в активную фазу старения, соответствующем 30 удвоениям клеточной популяции в линии MSCWJ-2 и 60 удвоениям в MSCWJ-1. Линия MSCWJ-2 имеет более высокую долю стареющих клеток (80 %) по сравнению с MSCWJ-1 (58 %). 3. Обе линии на ранних и поздних пассажах имеют нормальный кариотип 46, XX и 46, XY соответственно. Структурный кариотипический анализ выявил цитогенетическую гетерогенность, связанную в обеих линиях с появлением с низкой частотой случайных клональных и неклональных хромосомных нарушений, исчезающих в процессе длительного культивирования. В отличие от линии MSCWJ-1 в MSCWJ-2 на 6-м пассаже обнаружена 1 клональная перестройка короткого плеча 7-й хромосомы, встречающаяся с высокой частотой (39 %), но исчезающая на 13-м пассаже. 4. В обеих линиях выявлены (на 6, 13 и 28-м пассажах) экспрессия поверхностных антигенов, характерных для МСК человека (CD44, CD73, CD90, CD105, HLA-ABC и виментина), и отсутствие экспрессии CD34 и HLA-DR. 5. Снижается экспрессия поверхностного маркера недифференцированных эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) SSEA-4 и отсутствует экспрессия транскрипционного фактора SOX-2 в линии MSCWJ-2 на 13-м пассаже и в линии MSCWJ-1 на 28-м пассаже. 6. На поздних пассажах по сравнению с 6-м нарушается адгезионная способность клеток. Но способность дифференцироваться в остеогенном и адипогенном направлениях подтверждена. В линии MSCWJ-2 в отличие от MSCWJ-1 на позднем пассаже отсутствует хондрогенная дифференцировка. Таким образом, в линии MSCWJ-2 обнаружены корреляции между часто встречающейся клональной хромосомной перестройкой на раннем пассаже и ранним репликативным старением с большой долей стареющих клеток, значительным снижением ИП при длительном культивировании, уменьшением уровня экспрессии маркеров недифференцированных ЭСК, снижением дифференцировочного потенциала. Учитывая наличие метаболической кооперации между клетками, можно с осторожностью предположить, что изменения в MSCWJ-2 связаны с запуском клеточных процессов, которые продолжают уже в отсутствие часто встречающейся на раннем пассаже клональной хромосомной аберрации.

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

В настоящее время мезенхимные стволовые клетки (МСК) человека, выделенные из разных источников, широко используются для фундаментальных и прикладных биомедицинских исследований. По требованиям Международного общества клеточной терапии, основными характеристиками, определяющими статус МСК, являются следующие: активная пролиферация, экспрессия поверхностных маркеров CD105, CD90, CD73, CD44, HLA-ABC и отсутствие экспрессии маркеров CD34, CD45 и HLA-DR, способность к дифференцировке в остеогенном, хондро-

генном и адипогенном направлениях (Dominici et al., 2006; Sensebé et al., 2010).

Одной из важнейших характеристик МСК является геномная стабильность. Большинство линий МСК человека имеет нормальный кариотип. Тем не менее известно, что геномная нестабильность взрослых стволовых клеток существует, хотя и возникает гораздо реже, чем в эмбриональных стволовых клетках (ЭСК) и в индуцированных стволовых клетках человека (Gutierrez-Aranda et al., 2010; Laurent et al., 2011; Полянская, 2014).

В ряде работ проведен кариотипический анализ при длительном культивировании МСК. Полученные результаты противоречивы. Так, 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 немортализованных клеточных популяций (Borghesi et al., 2013; Estrada et al., 2013; Wang et al., 2013). Анализ МСК костного мозга нескольких здоровых доноров показал наличие ряда клональных хромосомных изменений, некоторые из которых устойчивы при длительном культивировании, а некоторые исчезают на поздних пассажах, возможно в связи с негативной селекцией (Redaelli et al., 2012). Таким образом, по-видимому, для понимания цитогенетических процессов в популяциях МСК человека необходимы исследования, анализирующие динамику кариотипических изменений в процессе длительного культивирования. Проблема оценки геномной стабильности важна для использования МСК в регенеративной медицине. С одной стороны, можно провести цитогенетический анализ на определенном пассаже и в дальнейшем использовать эти клетки для прикладных работ только на этом пассаже. С другой стороны, в связи с тем что клетки какое-то время могут находиться в условиях *in vivo*, встает вопрос о том, не будет ли усилена геномная нестабильность в процессе жизнедеятельности клеток, в частности при делениях в условиях *in vivo*.

На этот вопрос ответить сложно, но можно исследовать динамику цитогенетической изменчивости при длительном культивировании МСК *in vitro*. Предполагая возможную предрасположенность некоторых МСК к генетическим нарушениям, можно отбирать для использования в регенеративной медицине клеточные линии, не проявляющие усиления кариотипической изменчивости в процессе культивирования. Причем необходимо исследовать частоту возникновения как клональных, так и неклональных хромосомных aberrаций, в процессе культивирования. Такие исследования актуальны в связи с тем, что неясно, оказывают ли кариотипические изменения, находящиеся в клеточных популяциях ограниченный срок, влияние на свойства популяций МСК, т. е. не будут ли способствовать временно присутствующие aberrации запуску клеточных процессов, которые будут продолжаться уже в отсутствие этих aberrаций.

Следует подчеркнуть, что при кариотипическом анализе на разных пассажах необходимо соотносить сроки культивирования с появлением существенных признаков старения. Появление значительных признаков старения, безусловно, отвергает использование этих линий для прикладных задач, но расширяет возможности для фундаментальных исследований.

Известно, что репликативное старение — комплексный процесс. Есть ряд работ, в которых исследованы признаки и механизмы старения МСК человека. Репликативное старение МСК включает в себя многие процессы: остановку пролиферации, морфологические изменения, увеличенную активность SA-β-галактозидазы, повышение уровня экспрессии туморсупрессорных генов, укорочение теломер, уменьшение дифференцировочного потенциала, эпигенетические изменения и др. Показано, что

процесс клеточного старения в МСК может начинаться от первых пассажей и постепенно усиливаться в процессе культивирования (Wagner et al., 2008; Kuilman et al., 2010; Redaelli et al., 2012; Estrada et al., 2013; Savickiene et al., 2016). Тем не менее, несмотря на общие признаки репликативного старения в разных МСК, показано, что в процессе посттранскрипционной регуляции профиль микроРНК (miRNA) может различаться между МСК, полученными из разных источников (Meng et al., 2017). Важно подчеркнуть, что старение МСК может быть связано не только с репликативным старением, которое прослеживается при длительном пассировании МСК в условиях *in vitro*, но и с внешними по отношению к МСК факторами, т. е. с микроокружением.

Старение организма обусловлено несколькими механизмами, в частности укорочением теломер вследствие выключения теломеразы, что является основной репликативного старения; генетическими и митохондриальными повреждениями ДНК; увеличением содержания активных форм кислорода. Эти механизмы затрагивают как МСК, так и микроокружение. В связи с этим именно взаимодействие МСК и микроокружения обеспечивает возрастные характеристики МСК (Sethe et al., 2006). Показано, что репликативное старение *in vitro* и старение клеток *in vivo* имеют сходные механизмы (Wagner et al., 2008; Bork et al., 2010).

Сравнительный анализ характеристик, как определяющих статус МСК, так и ряда других, ответственных за важнейшие клеточные процессы, способствует углублению знаний о МСК человека, необходимых для понимания механизмов биологических процессов в клетке и для расширения возможностей для использования МСК в регенеративной медицине.

В предыдущем исследовании были получены и охарактеризованы две линии МСК, выделенные из Вартонова студня пупочного канатика от разных доноров, MSCWJ-1 и MSCWJ-2 на раннем (6-м) пассаже (Крылова и др., 2017). Были получены сходные кариотипические характеристики, свидетельствующие в целом о стабильности количественной структуры кариотипа обеих линий: 46, XX и 46, XY соответственно. Тем не менее обнаружены существенные межлинейные различия по структурной характеристике кариотипа. Так, в линии MSCWJ-2 обнаружена перестройка короткого плеча хромосомы 7 в 28 % исследованных клеток при анализе 200 метафаз в отличие от линии MSCWJ-1, у которой встречается незначительное количество неклональных хромосомных перестроек. Кроме того, качественный анализ активности фермента β-галактозидазы показал, что уже на 13-м пассаже значительно усиливается старение клеточной популяции MSCWJ-2 по сравнению с MSCWJ-1.

В связи с этими данными встал вопрос о возможной связи между обнаруженной клональной хромосомной aberrацией и ранним старением клеточной популяции MSCWJ-2. Также существенно провести сравнительный анализ ряда других характеристик МСК, изменяющихся в процессе старения МСК. Поэтому в настоящей работе стояли следующие задачи. 1. Сравнительный количественный анализ активности фермента β-галактозидазы, характеризующей признаки репликативного старения клеточной популяции MSCWJ-1 и MSCWJ-2 в процессе длительного культивирования (6—28 пассажей). 2. Сравнительный анализ ростовых характеристик в процессе длительного культивирования (6, 13 и 28-й пассажи). 3. Количественный и структурный кариотипический ана-

лиз обеих линий на раннем и поздних пассажах (6, 13 и 28-й). 4. Анализ экспрессии поверхностных маркеров, определяющих статус МСК и маркеров недифференцированных ЭСК в обеих линиях на тех же пассажах. 5. Анализ дифференцировочного потенциала этих линий на этих же пассажах.

### Материал и методика

В работе использовали полученные и охарактеризованные согласно международному паспорту две новые неиммортиализованные клеточные линии МСК, выделенные из Вартонова студня пупочного канатика человека (Крылова и др., 2017) : MSCWJ-1 (помещенная в фонды Коллекции культур клеток позвоночных Института цитологии РАН) и MSCWJ-2.

Старение клеток определяли по активности фермента  $\beta$ -галактозидазы. Клетки линий MSCWJ-1 и MSCWJ-2 выращивали в 3.5-сантиметровых чашках Петри до образования конфлюэнта. Затем среду удаляли и окрашивали клетки с помощью набора реактивов Senescence  $\beta$ -galactosidase Staining Kit (Cell Signaling, США) при pH 6.0 согласно инструкции. Клетки, вступающие в фазу репликативного старения, имеют ярко-синюю окраску цитоплазмы. Количественный анализ активности  $\beta$ -галактозидазы проводили с помощью инвертированного микроскопа (NICON, Япония) на 6, 13, 20, 25 и 28-м пассажах для линии MSCWJ-1 и на 6, 9 и 13-м пассажах для линии MSCWJ-2. Определяли долю окрашенных клеток (%) при подсчете не менее 1000 клеток на одну временную точку в разных полях зрения.

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, 13 и 28-м пассажах для линии MSCWJ-1 и на 6-м и 13-м пассажах для линии MSCWJ-2.

Кариотипический анализ проводили на 6-м и 28-м пассажах для линии MSCWJ-1 и на 6-м и 13-м пассажах для линии MSCWJ-2. Для получения препаратов метафазных хромосом за 2 ч до фиксации в среду клеток вводили колцемид КагуоМАХ (0.1 мкг/мл, Gibco, США), клетки диссоциировали с помощью 0.25%-ного раствора 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). Препараты хромосом окрашивали красителем Гимза (1 : 50) (Sigma, США) на натрий-фосфатном буфере, pH 6.8. 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 метафазных пластинок 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) на 6-м и 28-м пассажах для линии MSCWJ-1 и на 6-м и 13-м пассажах для линии MSCWJ-2 по результатам 3—5 экспериментов для каждого маркера. Иммунофенотипирование проводили с помощью панели конъюгатов CD-маркерных моноклональных антител с флуорохромами. В работе использовали моноклональные антитела против CD44, CD73, CD105 (Beckman Coulter, США), CD90, CD31 (BD Pharmingen, США), CD34, HLA-ABC и HLA-DR (Caltac, 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 Трипсин—ЭДТА (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 и 0.05 % азида натрия).

Для иммунофлуоресцентного анализа экспрессии поверхностных маркеров, характерных для ЭСК человека, и экспрессии маркеров ранней дифференцировки ЭСК в производные трех зародышевых листков использовали антитела против поверхностного маркера SSEA-4 (Santa Cruz, США) и транскрипционного фактора SOX-2 (Sigma, Германия),  $\alpha$ -актинина (тест на мезодерму),  $\alpha$ -фетопротеина (тест на энтодерму) (Sigma, США) и нестина (тест на эктодерму) (Chemicon, США). Также исследовали экспрессию виментина, который характеризует статус МСК. 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 вторыми антителами. Визуализацию проводили с помощью микроскопа Zeiss LSM 5 Pascal (Германия). Анализ проводили на 6-м и 28-м пассажах для линии MSCWJ-1 и на 6-м и 13-м пассажах для линии MSCWJ-2.

Для подтверждения статуса МСК проводили индукцию остеогенной, адипогенной и хондрогенной дифференцировки по модифицированному методу (Reyes et al., 2001) на 6-м и 28-м пассажах для линии MSCWJ-1 и на 6-м и 13-м пассажах для линии MSCWJ-2. Клетки в концентрации 10 тыс./см<sup>2</sup> высевали в остеогенную и адипогенную дифференцировочные среды (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 3 нед. Среду меняли 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  $-20^{\circ}\text{C}$ , 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.

Для выявления адипогенной дифференцировки клетки промывали PBS без ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ , фиксировали в метаноле в течение 2 мин при  $-20^{\circ}\text{C}$ . 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.

Сульфатированные гликозаминогликаны при хондрогенной дифференцировке идентифицировали по окраске 1%-ным раствором толуидинового синего в 50%-ном изопропанол (MP Biomedicals, США); протеогликианы идентифицировали по окраске 0.1%-ным раствором сафранина O (Merck, Германия); кислые гликозаминогликаны идентифицировали по окраске 1.0%-ным раствором альцианового синего (pH 1.0) (Sigma, Германия) Время окраски составляло 30 мин при комнатной температуре.

Для выявления спонтанной эндотелиальной дифференцировки клетки линий MSCWJ-1 (6-й и 28-й пассажи) доводили до полного монослоя и исследовали морфологическую структуру клеток через 3—4 сут. С помощью проточной цитофлуориметрии была проведена проверка экспрессии маркера CD31, свидетельствующего о начале эндотелиальной дифференцировки.

Для манипуляций с клетками использовали одноразовую пластиковую посуду одной фирмы (Thermo Fisher Scientific Nunk, Дания). Результаты обрабатывали статистически с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при вероятности нулевой гипотезы  $P < 0.05$ .

## Результаты и обсуждение

Морфологический анализ обеих линий показал преимущественную однородность клеточных популяций, образованных фибробластоподобными клетками (рис. 1). Имеют место различия по размеру клеток на ранних и поздних пассажах. Следует разъяснить, что ранним является 6-й пассаж, на котором клетки находятся в активной фазе роста; к поздним пассажам относятся 28-й и 13-й пассажи, на которых клетки линий MSCWJ-1 и MSCWJ-2 соответственно находятся в фазе активного старения. Так, в линии MSCWJ-1 на 6-м пассаже преобладают средние по размерам клетки, которые укрупняются в процессе длительного культивирования. На 28-м пассаже клеточная популяция представлена крупными фибробластоподобными клетками с небольшим количеством дедбриса. В линии MSCWJ-2 на 6-м пассаже преобладают более крупные фибробластоподобные клетки по сравнению с линией MSCWJ-1, которые, подобно линии MSCWJ-1, значительно укрупняются в процессе длительного культивирования. На 13-м пассаже клеточная популяция представлена крупными фибробластоподобными клетками с большим количеством дедбриса. Эти клетки значительно крупнее, чем клетки MSCWJ-1 на 28-м пассаже.

Количественный анализ репликативного старения показал отсутствие этого процесса на 6-м пассаже в линии MSCWJ-1 и его начальную стадию в линии MSCWJ-2: доля окрашенных клеток MSCWJ-2 увеличилась по сравнению с MSCWJ-1 ( $P < 0.01$ ; табл. 1). Далее, по мере удлинения срока культивирования в обеих линиях наблюдается постепенный рост доли окрашенных клеток, т. е. усиление активности  $\beta$ -галактозидазы. На более поздних пассажах, как и на 6-м, обнаружены существ-

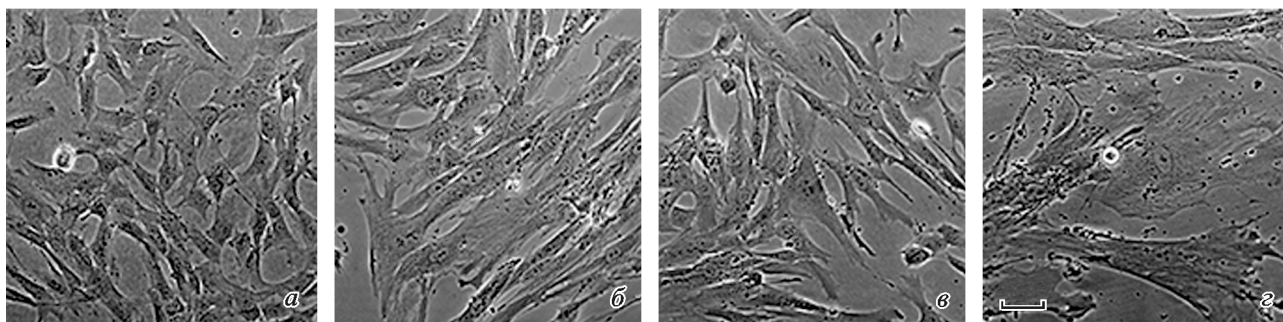


Рис. 1. Прижизненные фотографии клеток линий MSCWJ-1 (а, б) и MSCWJ-2 (в, з) при длительном культивировании. Клетки MSCWJ-1: пассажи 6 (а) и 28 (б); клетки MSCWJ-2: пассажи 6 (в) и 13 (з). Масштабный отрезок — 50 мкм.

Таблица 1

**Динамика активности  $\beta$ -галактозидазы  
в процессе старения клеточных популяций  
линий MSCWJ-1 и MSCWJ-2**

Пассаж	MSCWJ-1		MSCWJ-2	
	число клеток	доля окрашенных клеток, %	число клеток	доля окрашенных клеток, %
6	1000	0.0 $\pm$ 0.1	1814	9.0 $\pm$ 0.7
9	—	—	2196	22.5 $\pm$ 0.9
13	1604	15.0 $\pm$ 0.9	1618	80.6 $\pm$ 1.0
20	1500	39.0 $\pm$ 1.2	—	—
25	1730	36.0 $\pm$ 1.2	—	—
28	1255	58.1 $\pm$ 1.4	—	—

Примечание. Даны средние значения и их ошибки при подсчете не менее 1000 клеток на одну временную точку. Разница между ранним и поздним пассажами для обеих линий достоверна ( $P < 0.05$ ).

венные различия между линиями. В линии MSCWJ-1 при культивировании в течение 13, 20, 25 и 28 пассажей доля окрашенных клеток постепенно увеличивается с 15 (пассаж 13) до 58.1% (пассаж 28) ( $P < 0.01$ ). В линии MSCWJ-2 клетки с признаками старения появляются гораздо раньше, чем в MSCWJ-1, на 6-м пассаже и постепенно достигают значительно более высокого показателя на 13-м пассаже (80.6%), чем в линии MSCWJ-1 на 28-м (58.1%). Таким образом, в обеих линиях имеет место феномен репликативного старения в процессе длительного культивирования, но по временным и количественным характеристикам этот процесс имеет межлинейные различия. Следует подчеркнуть, что обнаруженные существенные морфологические различия между линиями, связанные с большими размерами клеток и количеством дебриса в линии MSCWJ-2 по сравнению с линией MSCWJ-1 (рис. 1), коррелируют с более интенсивным старением клеток MSCWJ-2 по сравнению с MSCWJ-1 (табл. 1).

Ростовые характеристики определяли по анализу кривых роста с определением среднего времени удвоения клеточных популяций. Плотность начального посева клеток составляла  $5.0 \cdot 10^4$  клеток на чашку Петри диаметром 35 мм. Показано, что на 6-м пассаже клетки MSCWJ-1 и MSCWJ-2 активно делятся. 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. 2). В обеих клеточных линиях 6-й пассаж соответствует 16—17 удвоениям клеточных популяций. На 13-м пассаже кривая роста линии MSCWJ-1 свидетельствует об активной пролиферации с логарифмической фазой роста, равной 96 ч. Среднее время удвоения клеточной популяции увеличивается по сравнению с пассажем 6 и составляет  $33.9 \pm 0.2$  ч ( $P < 0.05$ ).

Анализ кривых роста на поздних пассажах, где имеют место активные процессы репликативного старения (пассаж 28 для MSCWJ-1 и 13 для MSCWJ-2), показал снижение пролиферативной активности: время логарифмической фазы роста клеток MSCWJ-1 и MSCWJ-2 составило 96 и 72 ч соответственно (рис. 2). Среднее время удвоения клеточных популяций увеличивается в обеих линиях по сравнению с предыдущими сроками и состав-

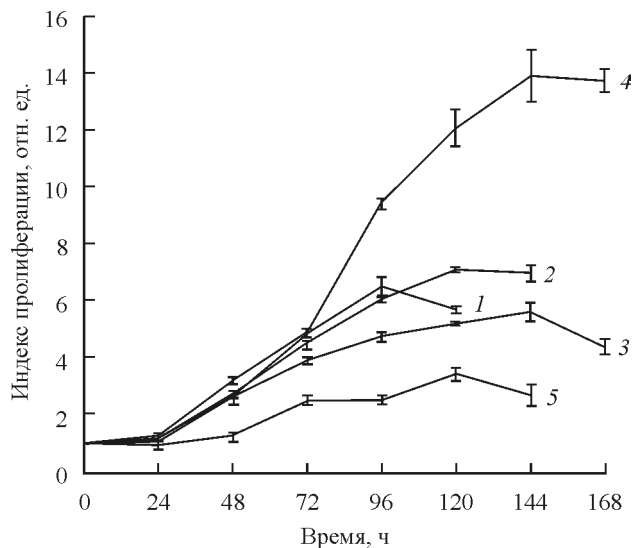


Рис. 2. Кривые роста клеток линий MSCWJ-1 и MSCWJ-2 на разных пассажах.

Кривые 1—3 — соответственно пассажи 6, 13 и 28 для линии MSCWJ-1; кривые 4, 5 — соответственно пассажи 6 и 13 для линии MSCWJ-2.

ляет  $40.3 \pm 0.1$  ч (MSCWJ-1) и  $41.0 \pm 2.3$  ч (MSCWJ-2) ( $P < 0.05$ ). Результаты свидетельствуют о том, что при длительном культивировании происходит увеличение среднего времени удвоения клеточных популяций в обеих линиях, что коррелирует с постепенным увеличением активности  $\beta$ -галактозидазы, свидетельствующей о наступлении репликативного старения (табл. 1), и морфологическими изменениями клеточных популяций (рис. 1). Анализ кривых роста на ранних и поздних пассажах показал, что имеют место межлинейные различия по уровню пролиферативной активности и динамики ИП. Так, на 6-м пассаже в клетках MSCWJ-2 ИП существенно увеличивается через 96 и 120 ч по сравнению с линией MSCWJ-1 ( $P < 0.05$ ). В линии MSCWJ-1 как на 13-м пассаже со средним уровнем старения, так и на 28-м пассаже с активной фазой старения на всех исследуемых сроках от 48 до 144 ч ИП выше, чем у клеток MSCWJ-2 на 13-м пассаже ( $P < 0.05$ ). Таким образом, в линиях MSCWJ-1 и MSCWJ-2 на ранних и поздних пассажах наблюдается обратная картина по величине ИП. На 6-м пассаже у линии MSCWJ-1 ИП в целом ниже, чем у линии MSCWJ-2, тогда как на 28-м пассаже у линии MSCWJ-1 ИП значительно выше, чем у линии MSCWJ-2 на 13-м пассаже (рис. 3). Следовательно, линия MSCWJ-2, стареющая раньше, в начале культивирования имеет более активную пролиферацию, чем линия MSCWJ-1, стареющая позже. А при наступлении ранней активной фазы старения (пассаж 13) линия MSCWJ-2 имеет более низкую пролиферативную активность, чем линия MSCWJ-1, стареющая значительно позже (пассаж 28). Кроме того, в линии MSCWJ-2 (пассаж 13) по сравнению с MSCWJ-1 (пассаж 28) имеет место неравномерный рост клеточной популяции, проявляющийся в «разорванности» логарифмической фазы роста: отсутствие увеличения ИП в период 72—96 ч с последующим всплеском пролиферативной активности к 120 ч. Основываясь на сравнительном анализе ростовых характеристик линий в процессе старения, необходимо подчеркнуть, что время вхождения клеток MSCWJ-2 и MSCWJ-1 в фазу активного старения соответствует 30 и 60 удвоениям клеточной популяции соот-

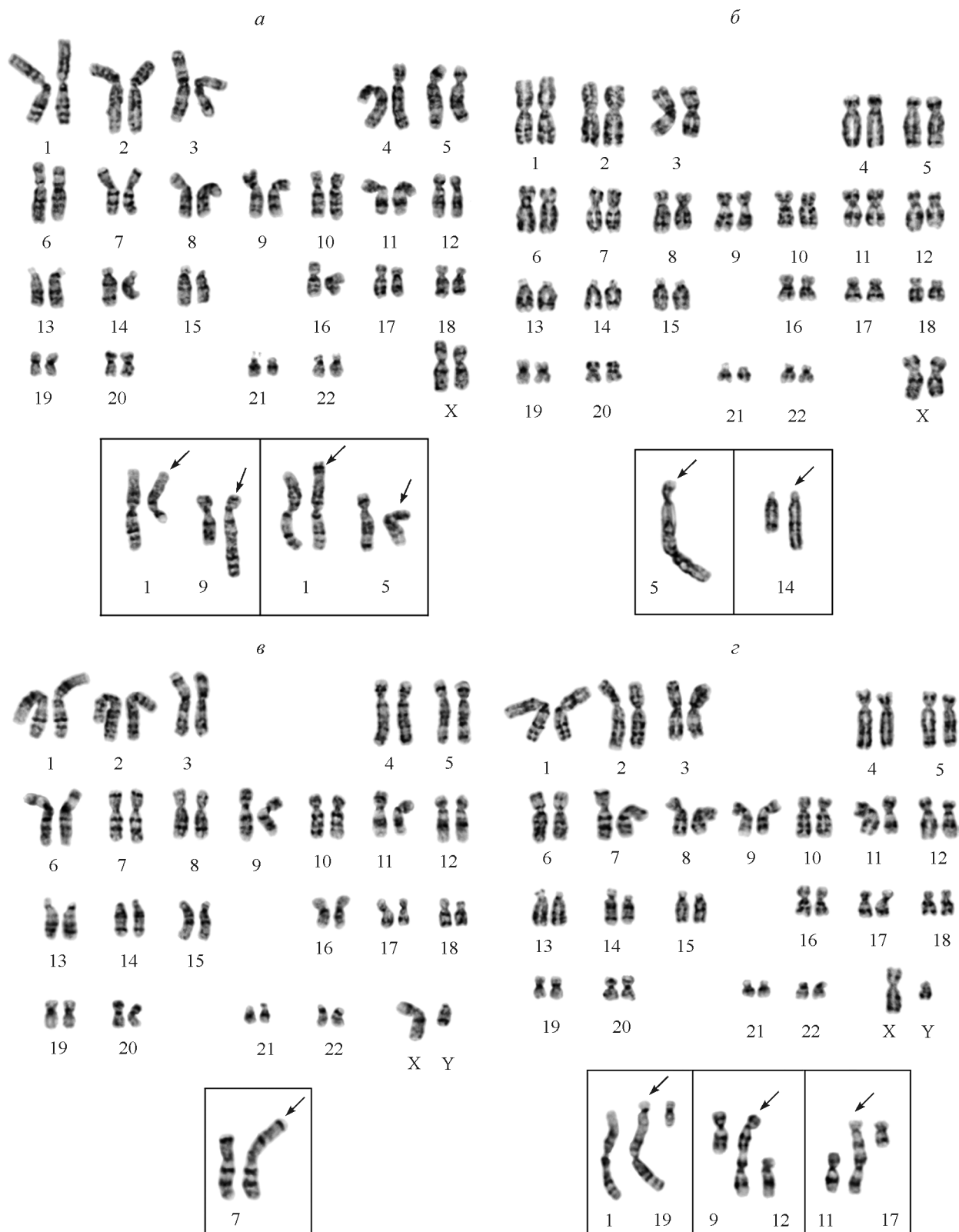


Рис. 3. Кариотипы (КТ) клеток MSCWJ-1 на 6-м (а) и 28-м (б) пассажах и клеток MSCWJ-2 на 6-м (в) и 13-м (з) пассажах. а — КТ: 46, XX, *врезка* показывает клональную структурную перестройку — реципрокную транслокацию хромосом 1 и 9,  $t(1;9)(q12;q33)$  и неклональную перестройку с участием хромосом 1 и 5; дериваты хромосом 1 и 9  $der(1)(1pter \rightarrow 1q12::9q33 \rightarrow 9qter)$  и  $der(9)(9pter \rightarrow 9q33::1q12 \rightarrow 1qter)$ , а также хромосом 1 и 5  $der(1)(5qter \rightarrow 5q31::1p22 \rightarrow 1qter)$  и  $der(5)(5pter \rightarrow 5q13::1p34 \rightarrow 1pter)$  показаны *стрелками*. б — КТ: 46, XX, *врезка* — структурно перестроенные хромосомы (*стрелки*), обнаруженные в отдельных клетках:  $dic(5;5)(5pter \rightarrow 5q35::5p15.3 \rightarrow 5qter)$ ,  $add(14)(q32)$ . в — КТ: 46, XY, *врезка* — клональная структурная перестройка хромосомы 7 (*стрелка*):  $der(7)(pter \rightarrow p13::p22 \rightarrow qter)$ . з — КТ: 46, XY, *врезка* — дигцентрические хромосомы (*стрелки*), обнаруженные в отдельных клетках:  $dic(1;19)(19pter \rightarrow 19q13.4::1p37.5 \rightarrow 1qter)$ ,  $dic(9;12)(9pter \rightarrow 9q34::12p13 \rightarrow 12qter)$ ,  $dic(11;17)(17pter \rightarrow 17q25::11p15 \rightarrow 11qter)$ .

ветственно. Известно, старение представляет собой комплексный процесс. Репликативное старение включает в себя многие характеристики (Estrada et al., 2013; Turinetto et al., 2016; De Witte et al., 2017) и, в частности, исследованные в настоящей работе (морфологические, активность  $\beta$ -галактозидазы, ростовые). Все исследованные параметры подтверждают наличие процесса репликативного старения в обеих линиях.

Сравнительный количественный кариотипический анализ показал, что на 6-м пассаже линии MSCWJ-1 и MSCWJ-2 характеризуются одинаково высокой частотой клеток с модальным числом хромосом, равным 46 ( $100.0 \pm 1.0\%$ ); доля полиплоидных клеток низкая и составляет  $1.2 \pm 0.4$  и  $0.4 \pm 0.2\%$  соответственно. На поздних пассажах, когда имеет место активный процесс клеточного старения, обе линии также характеризуются высокой частотой клеток с модальным числом хромосом. На 28-м пассаже в линии MSCWJ-1 частота клеток с модальным числом хромосом, равным 46, составляет  $99.0 \pm 1.0$ , а в клетках MSCWJ-2 на 13-м пассаже —  $97.0 \pm 1.7\%$ . Доля полиплоидных клеток в MSCWJ-1 на 28-м пассаже составляет  $0.8 \pm 0.3\%$ , а в клетках MSCWJ-2 доля полиплоидов незначительно повышается на 13-м пассаже и составляет  $3.8 \pm 0.8\%$  ( $P < 0.01$ ).

Сравнительный структурный кариотипический анализ на ранних и поздних пассажах показал, что обе линии имеют нормальный кариотип человека — 46, XX (MSCWJ-1); 46, XY (MSCWJ-2). Тем не менее анализ 100 метафазных пластинок для каждой линии выявил существенные различия между ними по кариотипической стабильности. В линии MSCWJ-1 на 6-м пассаже в 4 клетках обнаружена 1 клональная транслокация хромосом 1 и 9,  $t(1;9)(q12;q33)$ , а также 1 неклональная перестройка с участием 1-й и 5-й хромосом (рис. 3, а). При продолжении культивирования до 28-го пассажа клональная и неклональная перестройки исчезают, но появляются 2 новые неклональные перестройки: дицентрическая хромосома (теломерная ассоциация)  $dic(5;5)(q35;p15.3)$  и структурная перестройка хромосомы 14,  $add(14)(q32)$  (рис. 3, б). Необходимо подчеркнуть, что при использовании МСК в регенеративной медицине для клеточных линий есть допустимый критерий клональных хромосомных перестроек. 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 методом дифференциального G-окрашивания хромосом (Meisner, Johnson, 2008; Shaffer et al., 2009; Barkholt et al., 2013). В нашем случае уровень хромосомных aberrаций не превышает 10% от проанализированных 100 метафазных пластинок. Случайность появления описанных хромосомных нарушений косвенно подтверждается предыдущим анализом клеточной популяции этой линии, проведенном также на 100 метафазных пластинках на 6-м пассаже (Крылова и др., 2017). В этой работе кариотипический анализ не выявил клональной хромосомной aberrации, но обнаружил несколько неклональных нарушений, отличных от нарушений, представленных в предыдущей работе. Другая картина наблюдается при анализе линии MSCWJ-2. На 6-м пассаже обнаружена устойчивая клональная хромосомная перестройка, затрагивающая короткое плечо хромосомы 7:  $der(7)(pter \rightarrow p13 : p?::p22 \rightarrow qter)$  (рис. 3, в), при этом район 7p13—p22 дублирован. Частота встречаемости этой перестройки составляет 39% на 100 про-

анализированных метафаз, что сопоставимо с результатами предыдущего анализа этой линии (Крылова и др., 2017).

Высокая частота встречаемости этого хромосомного нарушения в клеточной популяции MSCWJ-2 коррелирует с наступлением ее раннего репликативного старения (табл. 1), а также с существенным увеличением ИП по сравнению с линией MSCWJ-1 (рис. 2). Последнее может быть связано с увеличенной дозой локализованного в коротком плече гена EGFR, способствующего усилению пролиферативной активности (Sareen et al., 2009). Но тем не менее к 13-му пассажу эта клональная перестройка также исчезает, несмотря на высокую частоту встречаемости на 6-м пассаже. По-видимому, она тоже, как и клональная перестройка в линии MSCWJ-1, имеет случайный характер, является адаптивно невыгодной для данных клеточных популяций и не поддерживается отбором.

Есть данные, подтверждающие цитогенетическую гетерогенность МСК. Причем судьба этих цитогенетических нарушений разная: число некоторых нарушений при увеличении числа пассажей увеличивается, а некоторых — уменьшается или исчезает совсем. Хромосома 7 часто оказывается участвующей в количественных и структурных перестройках (Kim et al., 2015). Встречаются, как и в нашем исследовании, клональные и неклональные перестройки. Следует специально отметить, что на 13-м пассаже в клетках MSCWJ-2 зафиксировано только 3% неклональных перестроек, но все они представляют собой дицентрические хромосомы разного типа, с потерей хромосомного материала ( $dic(1;19)(p3?5;q13.4)$ ) и без потери (теломерные ассоциации) —  $dic(9;12)(q34;p13)$  и  $dic(11;17)(q25;p13)$  (рис. 3, з). Явление, обнаруженное в линии MSCWJ-2, представляется нестандартным и требует некоторых рассуждений.

Известно, что клеточные популяции *in vitro* представляют собой автономную биологическую систему, функционирующую в большой степени за счет взаимодействия клеток в культуре. Основными типами клеточного взаимодействия в культуре становятся физические контакты между самими клетками и клетками и субстратом, а также химическая взаимосвязь через метаболиты в ростовой среде. Межклеточные контакты являются как структурными, так и функциональными связями между клетками. Важным типом межклеточных соединений являются щелевые контакты, которые составляют основу «метаболической кооперации» (Cox et al., 1972; Ноорег, Subak-Sharpe, 1981; Шаровская и др., 2009). Возможно, благодаря цитогенетическому нарушению, затрагивающему большое число клеток, уже на ранних пассажах запускается процесс старения, который продолжается и в отсутствие данной перестройки. Обращает внимание появление теломерных ассоциаций, хотя и в небольшом количестве, в обеих линиях в фазе активного старения (28-й и 13-й пассажи), которые не были обнаружены при анализе кариотипической структуры МСК разного происхождения на ранних пассажах. Появление теломерных ассоциаций было ранее показано в «безмаркерных» иммортализованных и неиммортализованных диплоидных линиях при стрессовых ситуациях и при старении, которое также можно считать стрессом, так как оно сопровождается рядом нежелательных для организма или для клеточной культуры явлениями. На основании анализа большого количества клеточных линий и разных стрессовых факторов были выявлены определенные характерные черты дицентриков, позволившие выдвинуть гипотезу о том, что роль дицентриков (теломерных ассоциаций) в

перечисленных случаях состоит в создании генетических структур, обеспечивающих систему адаптации клеточной популяции как целостной системы к неблагоприятным условиям (Benn, 1976; Полянская, 2000; Poljanskaja, Vakhtin, 2003). В данном конкретном случае из-за низкой частоты встречаемости теломерных ассоциаций можно пока только констатировать факт их появления в фазе активного старения.

Необходимо подчеркнуть, что указанная выше рекомендация Международного общества клеточной терапии об исключении клеточных культур, имеющих 10 % и более клональных хромосомных нарушений, из использования для регенеративной медицины в нашем исследовании косвенно подтверждается следующим фактом. Несмотря на то что клональная хромосомная перестройка, встречающаяся с высокой частотой на ранних пассажах в линии MSCWJ-2, позже исчезает, вред клеточной культуре она, по-видимому, наносит, запуская процесс раннего репликативного старения. Следует также подчеркнуть, что наши данные не подтверждают ранее полученные результаты о корреляции между репликативным старением и анеуплоидией по ряду хромосом, выявленной на клеточных популяциях МСК, выделенных из жировой ткани человека (Estrada et al., 2013).

Сравнительный анализ экспрессии поверхностных маркеров, определяющих статус МСК на ранних и поздних пассажах линий MSCWJ-1 и MSCWJ-2, показал, что существенного изменения уровня экспрессии маркеров в процессе длительного культивирования не происходит (табл. 2). Так, из представленных результатов следует наличие экспрессии поверхностных антигенов, характерных для МСК человека, — CD44, CD73, CD90 и CD105. Иммунофлуоресцентный анализ показал экспрессию виментина (рис. 4). Выявлено отсутствие экспрессии антигенов CD34 и HLA-DR. Таким образом, согласно требованиям Международного общества клеточной терапии к получению линий, на ранних и поздних пассажах подтвержден статус МСК для обеих линий (Domonici et al., 2006; Sensebé et al., 2010).

Тем не менее следует отметить некоторые количественные различия по основным маркерам МСК. Так, в линии MSCWJ-1 снижается уровень экспрессии CD90 и CD105 на 28-м пассаже по отношению к 6-му пассажиру. Кроме того, есть межлинейные различия по уровню экспрессии CD105. В линии MSCWJ-2 на 6-м пассаже он ниже, чем в линии MSCWJ-1. На 13-м пассаже линии

MSCWJ-2 он снижается по сравнению с 6-м пассажем. Но в связи с большим разбросом данных в исследуемых популяциях эти различия не носят достоверного характера.

Данные литературы по экспрессии этих маркеров на ранних и поздних пассажах противоречивы. В одних исследованиях показано снижение уровня поверхностных маркеров в стареющих клетках, а в других — отсутствие различий в их экспрессии на ранних и поздних пассажах (Savickiene et al., 2016; Danisovic et al., 2017). Возможно, эти различия связаны с разными источниками получения МСК. 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). Ранее были показаны колебания уровня экспрессии этих маркеров между линиями, полученными из разных источников, при культивировании в разных условиях, а также в линии с кариотипической нестабильностью (Frith et al., 2010; Кольцова и др., 2012, 2015; Крылова и др., 2012, 2015). 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 поверхностных антигенов, характерных для МСК из разных источников, имеют место различия между интенсивностью адипогенной, остеогенной и хондрогенной дифференцировок МСК. Поэтому пока сложно установить коррелятивные отношения между уровнем экспрессии поверхностных маркеров и другими характеристиками МСК.

Сравнительный иммунофлуоресцентный анализ экспрессии маркеров недифференцированных ЭСК на ранних и поздних пассажах представлен на рис. 4. Ранее для линий MSCWJ-1 и MSCWJ-2 было показано отсутствие экспрессии поверхностного маркера ЭСК — TRA-1-60 и транскрипционного фактора Oct-4 и присутствие экспрессии SSEA-4 и SOX-2 на 6-м пассаже (Крылова и др., 2017). В связи с этим в настоящей работе сравнительно проанализировали экспрессию поверхностного маркера SSEA-4 и SOX-2 на ранних и поздних пассажах обеих линий. Линии различаются по экспрессии этих факторов. Так, в клетках MSCWJ-1 экспрессируется SSEA-4 и SOX-2 на 6-м и 28-м пассажах. В клетках MSCWJ-2 на 6-м пассаже эти маркеры экспрессируются, а на 13-м экспрессия SSEA-4 уже очень низкая

Таблица 2

Экспрессия (%) поверхностных маркеров в процессе старения клеточных популяций линий MSCWJ-1 и MSCWJ-2

Маркер	MSCWJ-1		MSCWJ-2	
	6-й пассаж	28-й пассаж	6-й пассаж	28-й пассаж
CD44	99.50 ± 0.30	99.33 ± 0.30	99.60 ± 0.20	99.47 ± 0.38
CD73	98.40 ± 0.20	93.14 ± 2.90	99.00 ± 0.50	99.04 ± 0.49
CD90	99.40 ± 0.04 <sup>a</sup>	83.34 ± 5.78 <sup>a</sup>	92.70 ± 3.40	87.82 ± 0.79
CD105	99.75 ± 0.13 <sup>a</sup>	81.36 ± 5.00 <sup>a</sup>	78.40 ± 5.40	69.25 ± 12.82
CD34	0.07 ± 0.05	0.19 ± 0.05	0.09 ± 0.06	0.31 ± 0.13
HLA-ABC	92.60 ± 5.10	99.94 ± 0.03	98.40 ± 0.48	99.62 ± 0.15
HLA-DR	1.50 ± 1.30	0.03 ± 0.02	1.10 ± 0.90	0.03 ± 0.02

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



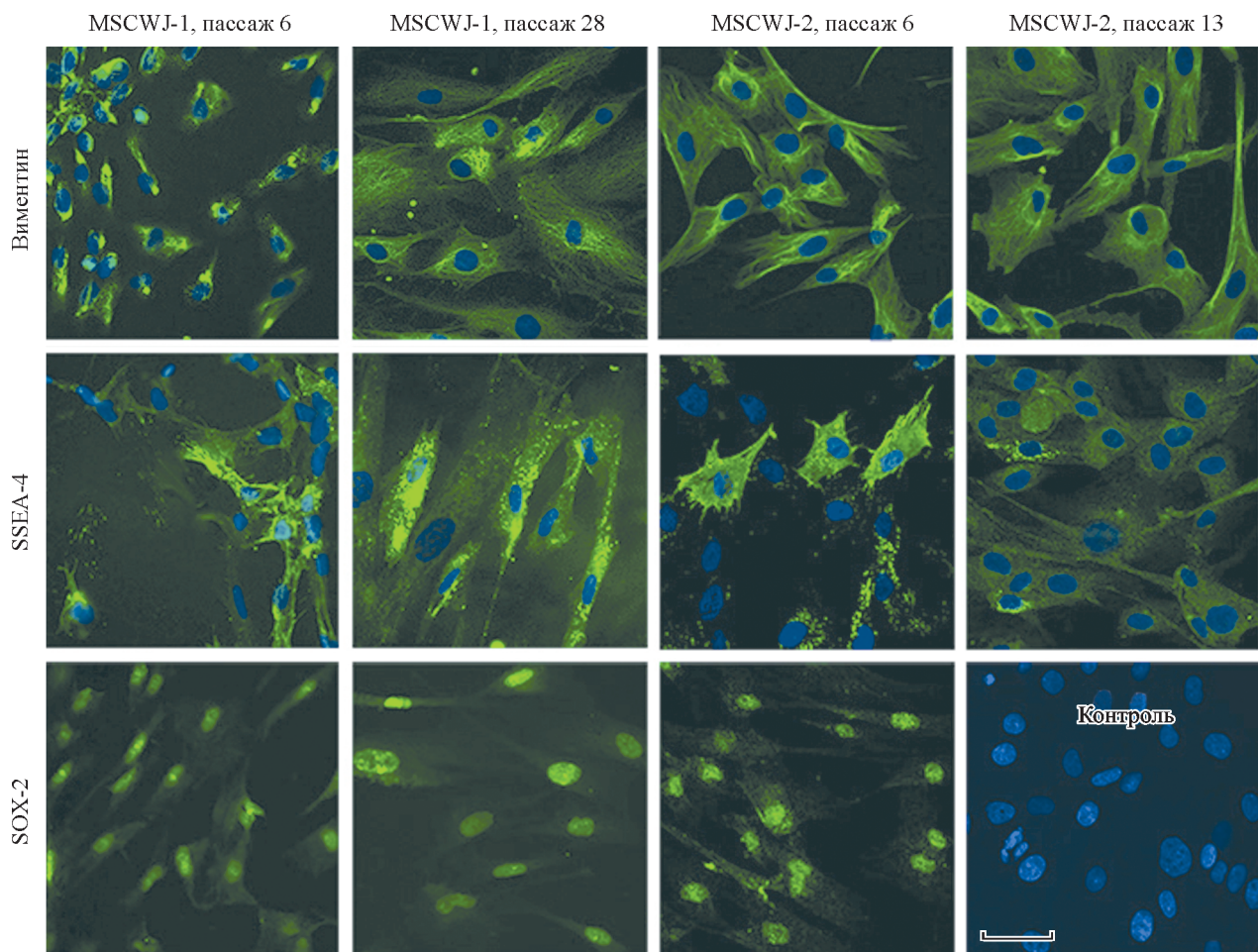


Рис. 4. Идентификация виментина, подтверждающего статус МСК, поверхностного маркера SSEA-4 недифференцированных ЭСК человека и транскрипционного фактора SOX-2 в клетках линий MSCWJ-1 и MSCWJ-2 при длительном культивировании по флуоресценции соответствующих моноклональных антител.

Ядра докрашены красителем DAPI (синий цвет), контроль — окрашивание вторыми антителами. Масштабный отрезок — 50 мкм.

(интенсивность сигнала крайне слабая при анализе нескольких повторностей). Экспрессия SOX-2 также обнаружена на 6-м пассаже, тогда как на 13-м соответствующая окраска отсутствует. Возможно, эти результаты связаны с интенсивностью процесса репликативного старения линий. Частота клеток MSCWJ-2, подвергшихся активному старению, значительно выше, чем MSCWJ-1 (80.1 против 58.1 %; табл. 1). ИФ в целом в линии MSCWJ-1 на 28-м пассаже значительно выше, чем в линии MSCWJ-2 на 13-м пассаже (рис. 2). Разными методами показано, что оба маркера участвуют в процессе пролиферации МСК, выделенных как из эмбриональных, так и из взрослых тканей (Gang et al., 2007; Park et al., 2012).

Сравнительный анализ экспрессии маркеров ранней дифференцировки ЭСК на ранних и поздних пассажах в производные трех зародышевых листков (рис. 5) показал полное совпадение результатов для клеток MSCWJ-1 и MSCWJ-2 на 6-м пассаже с полученными ранее (Крылова и др., 2017). Наличие экспрессии этих маркеров показано также и на 28-м пассаже для линии MSCWJ-1 и на 13-м пассаже для линии MSCWJ-2. Подобное явление на ранних пассажах было показано нами ранее на линиях МСК, полученных из других источников (Крылова и др., 2012, 2014, 2016; Кольцова и др., 2015). Другими авторами разными методами

тоже показана экспрессия этих маркеров в МСК разного происхождения (Riekstina et al., 2009; Huang et al., 2010; Antonucci et al., 2011; Mamidi et al., 2011). Механизмы взаимосвязи маркеров ранней дифференцировки ЭСК с функциональной деятельностью МСК пока неизвестны. Есть разные предположения противоположного характера. Одно связано с дифференцировочной пластичностью МСК, а другое — с эмбриональным происхождением МСК (Riekstina et al., 2009; Sensebé et al., 2010). Полученные нами данные, свидетельствующие об активной экспрессии этих маркеров, не различающейся на поздних и ранних пассажах, говорят, скорее, в пользу второго предположения, так как дифференцировочная пластичность стареющих МСК снижена, что будет показано ниже.

Индукция остеогенной, хондрогенной и адипогенной дифференцировки в линиях MSCWJ-1 и MSCWJ-2 проведена на ранних и поздних пассажах (рис. 6). На 6-м пассаже клетки обеих линий способны формировать костную, жировую и хрящевую ткани, что было показано нами ранее (Крылова и др., 2017) и что соответствует статусу МСК (Dominici et al., 2006; Sensebé et al., 2010). Культивирование клеток в остеогенной среде способствовало формированию минеральных комплексов при использовании реакции Von Kossa, позволяющей выявить нерастворимые соли кальция в межклеточном про-

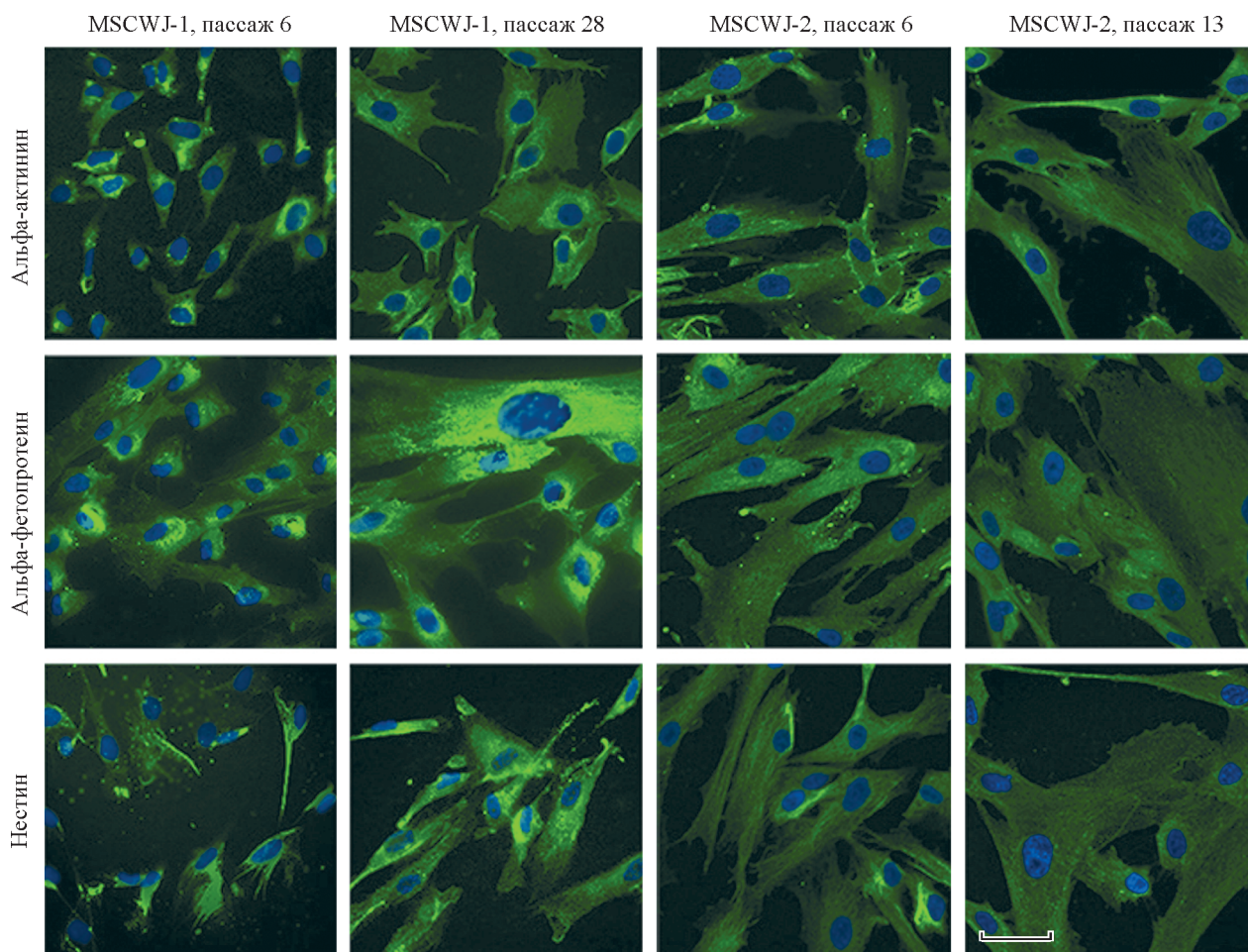


Рис. 5. Идентификация маркеров ранней дифференцировки ЭСК в клетках линий MSCWJ-1 и MSCWJ-2 при длительном культивировании по флуоресценции соответствующих моноклональных антител.

Показаны маркеры ранней дифференцировки ЭСК: альфа-актинина (маркера мезодермы), альфа-фетопротеина (маркера энтодермы) и нестина (маркера эктодермы); ядра докрашены красителем DAPI. Масштабный отрезок — 50 мкм.

странстве. Культивирование клеток в адипогенной среде способствовало образованию кластеров адипоцитов, показанных с помощью окрашивания красителем масляным красным (Oil Red O). Культивирование клеток в хондрогенной среде приводило к образованию структур, которые выявляются с помощью окрашивания толуидиновым синим (идентификация сульфатированных гликозаминогликанов), сафранином (идентификация протеогликанов) и альциановым синим (идентификация кислых гликозаминогликанов). Индукция дифференцировок на поздних пассажах отличается от результатов 6-го пассажа. Кроме того, есть различия между линиями.

Прежде всего надо отметить, что в процессе индукции остеогенной и адипогенной дифференцировок клетки обеих линий начинают открепляться от субстрата, т. е. нарушается их адгезионная способность. Клетки, индуцированные в хондрогенном направлении, находятся в культуре микромасс, т. е. в 3D-условиях, поэтому данное явление не показано. Обнаруженное явление свидетельствует о том, что процесс дифференцировки нарушен. Тем не менее, несмотря на присутствие деградируемых открепленных клеток, в линии MSCWJ-1 на 28-м пассаже и в линии MSCWJ-2 на 13-м выявляются нерастворимые соли кальция в межклеточном пространстве и кластеры адипоцитов соответственно при остеогенной и адипо-

генной индукции. Межлинейные различия относятся к хондрогенной дифференцировке. Так, культивирование клеток в хондрогенной среде в линии MSCWJ-1 на 28-м пассаже, так же как и на 6-м, привело к образованию структур, которые выявляются окрашиванием толуидиновым синим, сафранином и альциановым синим.

Другая картина наблюдается при индукции хондрогенной дифференцировки на 13-м пассаже в линии MSCWJ-2 : отсутствует окраска толуидиновым синим и сафранином. А окраска альциановым синим носит неспецифический характер. В связи с отсутствием структур, свойственных хондрогенной дифференцировке, окрашиваются недифференцированные клетки. Следовательно, хондрогенной дифференцировки нет. Суммируя полученные результаты по индукции дифференцировок, можно сделать вывод о том, что в целом дифференцировочный процесс нарушен в обеих линиях. Но в линии MSCWJ-2 он нарушен больше, так как имеет место уменьшение дифференцировочного потенциала. Это явление в процессе клеточного старения было показано и другими авторами. В частности, в МСК костного мозга обнаружен сниженный дифференцировочный потенциал на поздних пассажах, причем адипогенный потенциал уменьшен значительно больше, чем остеогенный (Bonab et al., 2006). Существенное уменьшение адипогенного потенциала по-

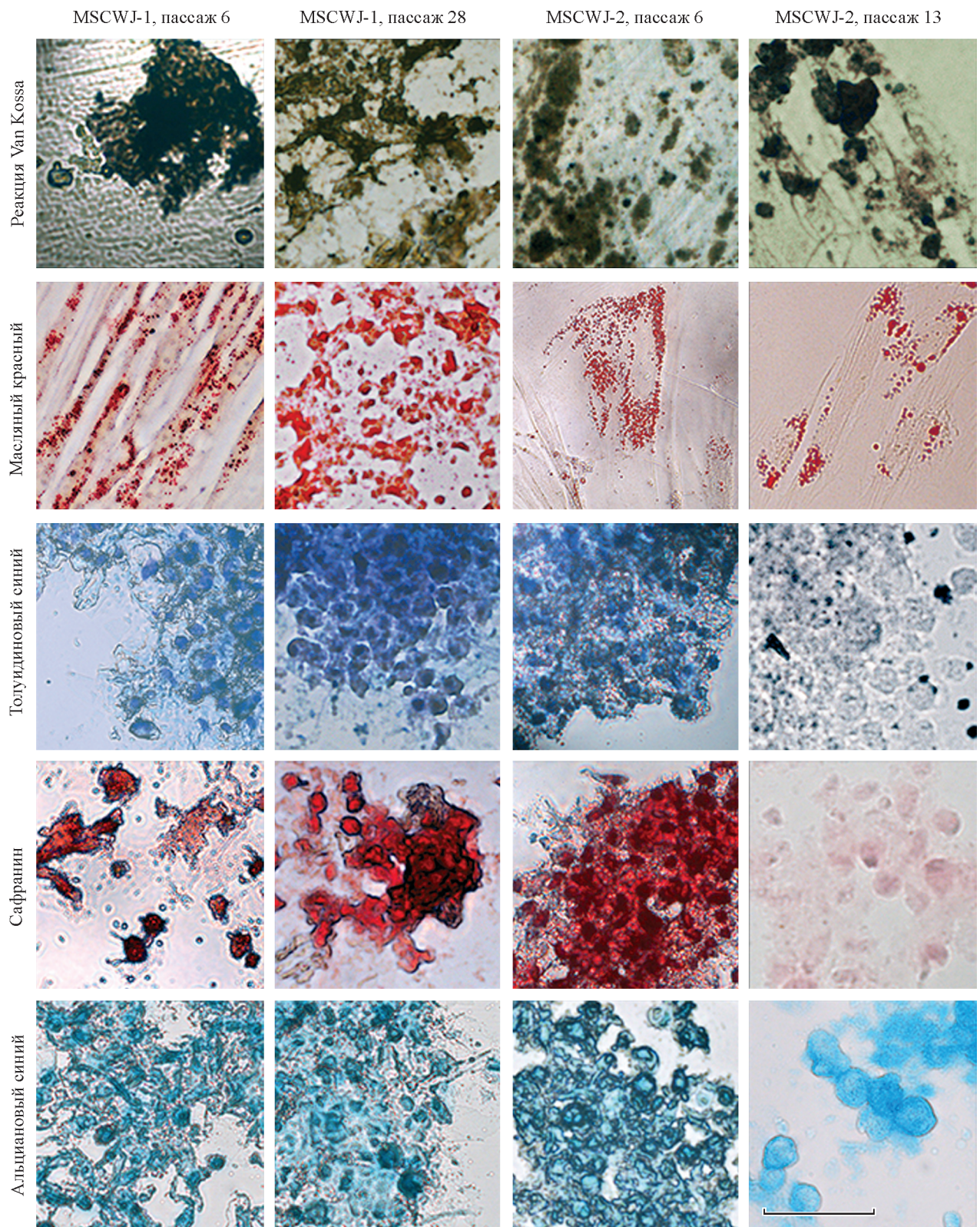


Рис. 6. Дифференцировка клеток линий MSCWJ-1 и MSCWJ-2 в остеогенном направлении (реакция Von Kossa, выявляющая нерастворимые соли кальция в межклеточном пространстве), адипогенном (окрашивание жировых включений масляным красным) и хондрогенном (окрашивание толуидиновым синим, сафранином и альциановым синим) при длительном культивировании.

Масштабный отрезок — 50 мкм.

казано и в другой работе (Park et al., 2005). По-видимому, клеточное старение может способствовать снижению разных дифференцировочных процессов.

В предыдущей работе нами показано, что образование полного монослоя является критической точкой, в которой клетки линии MSCWJ-1 начинают претерпевать морфологические изменения, отражающие начало эндотелиальной дифференцировки и которые четко видны через 3—4 сут после образования монослоя. Анализ экспрессии маркера CD31 на 6-м пассаже, свидетельствующего о начале этой дифференцировки, показал увеличение уровня его экспрессии по сравнению с недифференцированными и контрольными клетками (FetMSC) (Крылова и др., 2017). Аналогичный анализ 28-го пассажа не выявил изменения морфологии клеток, сопутствующих эндотелиальной дифференцировке. Уровень экспрессии маркера CD31 (1.17%) соответствует недифференцированным клеткам. Эти данные могут свидетельствовать о сужении дифференцировочного потенциала линии MSCWJ-1 на поздних пассажах.

В заключение можно сделать основной вывод, вытекающий из настоящей работы. Обе линии претерпевают репликативное старение и связанные с ним изменения ряда клеточных свойств. Особое внимание следует обратить на характер изменений в линии MSCWJ-2 по сравнению MSCWJ-1. Обнаружена корреляция между часто встречающейся клональной хромосомной перестройкой на раннем пассаже и ранним репликативным старением с высоким уровнем стареющих клеток в популяции, значительным снижением ИП в процессе длительного культивирования, уменьшением или исчезновением экспрессии маркеров недифференцированных ЭСК — SSEA-4 и SOX-2, сниженным дифференцировочным потенциалом. Учитывая метаболическую кооперацию между клетками, можно с осторожностью предположить, что обнаруженная на раннем пассаже часто встречающаяся клональная перестройка короткого плеча хромосомы 7 связана с запуском клеточных процессов, которые продолжают уже в отсутствие этой хромосомной aberrации.

Авторы выражают благодарность Н. Н. Мамаеву и Т. Л. Гиндиной (С.-Петербургский медицинский университет им. И. П. Павлова) за возможность использования системы автоматического кариотипирования Ikaros 4 Karyotyping System (MetaSystems, Германия) и А. А. Яковлевой за помощь в техническом оформлении рисунков.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФАНО по государственному заданию № 0124-2016-0007 и дополнительному государственному заданию на период 01.07.2017—31.12.2017 (рег. ЦИТиС № АААА-А17-117072510077-0).

#### 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 бесфицерной 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., Кольцова А. М., Мусорина А. С., Зенин В. В., Турилова В. И., Яковлева Т. К., Полянская Г. Г. 2017. Характеристика двух линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из Вартонова студня пупочного канатика человека. Цитология. 59 (5) : 315—327. (Krylova T. A., Koltsova A. M., Musorina A. S., Zenin V. V., Turilova V. I., Yakovleva T. K., Poljanskaya G. G. 2017. Derivation and characteristic of two lines of human mesenchymal stem cells, generated from the Wharton's jelly of the human umbilical cord. Tsitologiya. 59 (5) : 315—327.)

Крылова Т. А., Мусорина А. С., Зенин В. В., Кольцова А. М., Кропачева 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. 2000. Закономерности кариотипической изменчивости в клеточных культурах при длительном культивировании в разных условиях (обзор). Успехи соврем. биол. 120 (6) : 529—539. (Poljanskaya G. G. 2000. Regularities of karyotypic variability in cell cultures in long-term cultivation under various conditions. Uspekhi sovremennoi biology. 120 (6) : 529—539.)

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 математический и медико-биологический журнал. 7 (2). URL: <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 Math. Medicobiol. J. 7 (2).

URL: <http://www.smolensk.ru/user/sgma/mmorph/n-18-html/cont.htm>.)

Шаровская Ю. Ю., Лагарькова М. А., Киселев С. Л., Чайлахян Л. М. 2009. Исследование диффузионной связи через шелевые контакты в эмбриональных стволовых клетках человека в процессе спонтанной дифференцировки. Докл. РАН. 427 (3) : 407—410. (Sharovskaya Ju. Ju., Lagar'kova M. A., Kiselev S. L., Chajlakhyan L. M. 2009. The study of the diffusion coupling through gap junctions in embryonic stem cells during spontaneous differentiation. Dokl. Russ. Akad. Nauk. 427 (3) : 407—410.)

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 transplantati-on therapy. Cell Transplant. 20 : 789—795.

Barkholt L., Flory E., Jekerle V., Lucas-Samuel S., Ahnert P., Bisset L., Büscher D., Fibbe W., Foussat A., Kwa M., Lantz O., Mačulaitis 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. Cytotherapy. 15 : 753—759.

Benn P. A. 1976. Specific chromosome aberrations in senescent fibroblast cell lines derived from human embryos. Amer. J. Hum. Genet. 28 : 465—473.

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.

Borghesi A., Avanzini M. A., Novara F., Mantelli M., Lenta E., Achille V., Cerbo R. M., Tzialla C., Longo S., De Silvestri A., Zimmermann L. J., Manzoni P., Zecca M., Spinillo A., Maccario R., Zuffardi O., Stronati M. 2013. Genomic alterations in human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells call for stringent quality control before any possible therapeutic approach. Cytotherapy. 15 : 1362—1373.

Bork S., Pfister S., Witt H., Horn P., Korn B., Ho A. D., Wagner W. 2010. DNA methylation pattern changes upon long-term culture and aging of human mesenchymal stromal cells. Aging Cell. 9 : 54—63.

Cox R. P., Krauss M. R., Balis M. E., Dancis J. 1972. Communication between normal and enzyme-deficient cells in tissue culture. Exp. Cell Res. 74 : 251—268.

Danilovic L., Oravcova L., Krajciová L., Varchulova Novakova Z., Bohac M., Varga I., Vojtassak J. 2017. Effect of long-term culture on the biological and morphological characteristics of human adipose tissue-derived stem cells. J. Physiol. Pharmacol. 68 (1) : 149—158.

De Witte S. F. H., Lambert E. E., Merino A., Strini T., Douben H. J. C. W., O'Flynn L., Elliman S. J., de Klein A. J. E. M. M., Newsome P. N., Baan C. C., Hoogduijn M. J. 2017. Aging of bone marrow- and umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells during expansion. Cytotherapy. 19 (7) : 798—807.

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. Int. Soc. Cell. Ther. 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., Ramirez 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.

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.

Gutierrez-Aranda I., Ramos-Mejia V., Bueno C., Munoz-Lopez M., Real P. J., Mácia A., Sanchez L., Ligeró G., Garcia-Parez 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.

Hooper M. L., Subak-Sharpe J. H. 1981. Metabolic cooperation between cells. Int. Rev. Cytol. 69 : 45—104.

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.

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.

Kim J. A., Im K. O., Park S. N., Kwon J. S., Kim S. Y., Oh K., Lee D. S., Kim M. K., Kim S. W., Jang M., Lee G., Oh Y. M., Lee S. D., Lee D. S. 2015. Cytogenetic heterogeneity and their serial dynamic changes during acquisition of cytogenetic aberrations in cultured mesenchymal stem cells. Mutat. Res. 777 : 60—68. Doi: 10.1016/j.mrfmmm.2015.04.003.

Kulman T., Michaloglou C., Mooi W. J., Peeper D. S. 2010. The essence of senescence. Genes Develop. 24 : 2463—2479.

Laurent L. C., Ulitsky I., Slavin I., Tran H., Schork A., Morrey R., Lynch C., Harness J. V., Lee S., Barrero M. J., Ku S., Martynova M., Semechkin R., Galat V., Gottesfeld J., Izipisa Belmonte J. C., Murry C., Keirstead H. S., Park H. S., Schmidt U., Lallet 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.

Maleki M., Ghanbarvand F., Reza Behvarz M., Ejtamei 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.

Meisner L. F., Johnson J. A. 2008. Protocols for cytogenetics studies of human embryonic stem cells. Methods. 45 : 133—141.

Meng X., Xue M., Xu P., Hu F., Sun B., Xiao Z. 2017. MicroRNA profiling analysis revealed different cellular senescence mechanisms in human mesenchymal stem cells derived from different origin. Genomics. pii: S0888-7543(17)30009-5. Doi: 10.1016/j.ygeno.2017.02.003.

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

Park J. S., Kim H. Y., Kim H. W., Chae G. N., Oh H. T., Park J. Y., Shim H., Seo M., Shin E. Y., Kim E. G., Park S. C., Kwak S. J. 2005. Increased caveolin-1, a cause for the declined adipogenic potential of senescent human mesenchymal stem cells. Mech. Ageing Develop. 126 : 551—559.

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.

Poljanskaya G. G., Vakhtin Y. B. 2003. The karyotypic structure of cell populations *in vitro* as integral system. Tsitologiya. 45 (2) : 115 — 131.

Redaelli S., Bentivegna A., Foudah D., Miloso M., Redondo J., Riva G., Baronchelli S., Dalprà L., Tredici G. 2012. From cytogenomic to epigenomic profiles: monitoring the biologic behavior of *in vitro* cultured human bone marrow mesenchymal stem cells. Stem Cell Res. Ther. 3 : 47. Doi: 10.1186/scrt138.

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.

Sareen D., McMillan E., Ebert A. D., Shelley B. C., Johnson J. A., Meisner L. F., Svendsen C. N. 2009. Chromosome 7 and 19 trisomy in cultured human neural progenitor cells. *PLoS ONE.* 4 (10) : e7630. Doi: 10.1371/journal.pone.0007630.

Savickienė J., Baronaitė S., Zentelytė A., Treigytė G., Navakasienė 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.

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.

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.

Turinetto V., Vitale E., Giachino C. 2016. Senescence in human mesenchymal stem cells: functional changes and implications in stem cell-based therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 17. pii: E1164. Doi: 10.3390/ijms17071164.

Wagner W., Horn P., Castoldi M., Diehlmann A., Bork S., Safirich 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 : e2213. Doi: 10.1371/journal.pone.0002213.

Wang Y., Zhang Z., Chi Y., Zhang Q., Xu F., Yang Z., Meng L., Yang S., Yan S., Mao A., Zhang J., Yang Y., Wang S., Cui J., Liang L., Ji Y., Han Z. B., Fang X., Han Z. C. 2013. Long-term cultured mesenchymal stem cells frequently develop genomic mutations but do not undergo malignant transformation. *Cell Death Dis.* 4 : e950. Doi: 10.1038/cddis.2013.480.

Поступила 8 VI 2017

#### DYNAMICS PROPERTIES OF TWO LINES OF MESENCHYMAL STEM CELLS, DERIVED FROM THE WHARTON'S JELLY OF THE HUMAN UMBILICAL CORD, DURING LONG-TERM CULTIVATION

A. M. Koltsova,<sup>1</sup> T. A. Krylova, 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: koltsova.am@mail.ru; poljanskaya@incras.ru

The comparative analysis of characteristics of two lines MSC (MSCWJ-1 and MSCWJ-2), generated from Wharton's Jelly of human umbilical cord was done at 6, 13 and 28 passages. The next results were obtained. 1. Morphological analysis showed, that during long-term cultivation morphological changes took place in both lines, but in line MSCWJ-2 the cells were larger and the greater number of debris was observed compared with MSCWJ-1. 2. The analysis of growth characteristics showed, that during long-term cultivation significantly increases of the average population doubling time in both cell lines, which correlates with morphological changes of cells, and with the gradual increase of activity  $\beta$ -galactosidase, indicating the occurrence of replicative senescence. The interline changes are associated with the level of proliferative activity, with the dynamics of the index of proliferation, with the time of intering in phase of active senescence, corresponding to 30 population doublings in line MSCWJ-2 and to 60 population doublings in line MSCWJ-1 with a higher percentage of senescent cells (80 %) in line MSCWJ-2 compared with MSCWJ-1 (58 %). 3. Numerical karyotypic analysis showed that the both lines at early and late passages have normal karyotype of 46, XX and 46, XY, respectively. The structural karyotypic analysis showed cytogenetic heterogeneity, associated in both lines with the emergence with low frequency of random clonal and non-clonal chromosomal rearrangements, disappearing during long-term cultivation. Unlike line MSCWJ-1 in MSCWJ-2 at 6th passage one detected clonal chromosomal rearrangement of the short arm of chromosome 7, occurring with high frequency at 39 % of the investigated cells, but disappearing on the 13th passage. 4. To determine status of these cell lines at 6, 13 and 28th passages, comparative analysis of the surface markers was performed. By this analysis, all the lines expressed the surface antigens characteristic human MSC: CD44, CD73, CD90, CD105, HLA-ABC, vimentin and did not express CD34, and HLA-DR. 5. The analysis of expression of markers of non-differentiated hESC in both lines showed a decrease in expression level surface marker SSEA-4 and the lack of expression of the transcription factor SOX-2 in line MSCWJ-2 at 13th passage compared with MSCWJ-1 at 28 passage. 6. Induction of osteogenic and adipogenic differentiation in both lines at later passages showed disruption of adhesion to the cells compared to the 6 passage. But the ability to differentiate in these directions at later passages is confirmed. The lack of chondrogenic differentiation in line MSCWJ-2 are showed at late passage in comparison with line MSCWJ-1. Thus, in line MSCWJ-2 discovered the correlation between frequently occurring clonal chromosomal rearrangement identified at an early passage, early replicative senescence with a large proportion of senescent cells, a significant decrease index proliferation during long-term cultivation, decrease or disappearance of the expression of markers non-differentiated ESCs, decreased differentiation potential. Given the metabolic cooperation between the cells, we can cautiously assume that is detected at an early passage clonal chromosomal rearrangement of the short arm of chromosome 7, occurring with high frequency, is associated with activation of cellular processes which proceed in the absence of this chromosomal aberration.

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