

DOI: 10.1134/S0041377118120015

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИНИИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ ПУЛЬПЫ МОЛОЧНОГО ЗУБА ЧЕЛОВЕКА

© А. М. Кольцова, В. В. Зенин, В. И. Турилова, Т. К. Яковлева, Г. Г. Полянская*

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; 194064;

** электронный адрес: poljansk@incras.ru*

Получена и охарактеризована новая неиммортизованная клеточная линия из пульпы молочного зуба ребенка, названная MSC-DP. Анализ основных характеристик проводили на 6-м и 25-м пассажах. В процессе длительного культивирования постепенно увеличивается доля стареющих клеток согласно активности β -галактозидазы. На 25-м пассаже по сравнению с более ранними пассажами существенно увеличивается экспрессия маркера CD264, повышенный уровень которой также характеризует клетки, вступившие в активную фазу репликативного старения. Эффективность клонирования клеток MSC-DP существенно уменьшается в процессе длительного культивирования. Кривые роста свидетельствуют об активной пролиферации клеточной линии на 6-м пассаже и значительном снижении индекса пролиферации к 25-му пассажу. Кариотипический анализ на 6-м и 25-м пассажах показал наличие нормального кариотипа человека: 46, XX. Существенные различия в кариотипической структуре между пассажами 6 и 25 связаны с наличием значительного количества дицентрических хромосом по типу теломерных ассоциаций на позднем пассаже с преимущественным участием длинного плеча хромосомы 14. На 6-м и 25-м пассажах выявлены экспрессия поверхностных антигенов, характерных для мезенхимных стволовых клеток (МСК) человека (CD44, CD73, CD90, CD105 и HLA-ABC) и отсутствие экспрессии CD34, CD45 и HLA-DR. Маркер недифференцированных эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека — SSEA-4 — экспрессируется только на 6-м пассаже. Показано, что клетки линии MSC-DP обладают способностью дифференцироваться в остеогенном и хондрогенном направлениях. Способность к мультипотентной дифференцировке клеток MSC-DP подтверждается экспрессией гена нейрональной дифференцировки. В целом представленные результаты подтверждают статус МСК для полученной линии и свидетельствуют о существенных изменениях, происходящих в процессе репликативного старения.

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

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) обладают уникальными свойствами, позволяющими их использовать как для углубления фундаментальных знаний о процессах, протекающих в клетке, так и для расширения прикладных биомедицинских исследований. Клеточные линии МСК, являясь неиммортизованными, диплоидными, являются адекватной моделью для изучения биологических процессов в здоровом организме. Важность изучения характеристик МСК, полученных из разных источников, вытекает из особенностей взаимодействия МСК с их уникальным микроокружением (нишей), характерным для определенной ткани, которое регулирует пролиферацию, выживаемость, миграцию, старение, дифференцировочный потенциал и другие клеточные свойства посредством межклеточных взаимодействий и различных биоактивных молекул. Согласно требованиям Международного общества клеточной терапии, статус МСК разного происхождения определяется рядом определенных характеристик (Dominici et al., 2006; Sensebe et al., 2010). Несмотря на сохранение в целом общих свойств у МСК

разного происхождения, имеют место некоторые различия между ними по характеристикам, как определяющим статус МСК, так и по другим признакам, которые являются важнейшими для жизнедеятельности клеток, но отражающими конкретные свойства определенной линии. Так, обнаружены межлинейные различия по дифференцировочному потенциалу, ростовым характеристикам, характеру репликативного старения и по кариотипической нестабильности (Shih et al., 2005; Yan et al., 2013; Крылова и др., 2014; Полянская, 2018). В связи с этим, а также с учетом генетической уникальности каждой вновь полученной линии представляется важным расширение спектра линий МСК человека.

Многие МСК, полученные из взрослых и эмбриональных тканей, имеют ограниченное применение из-за инвазивного способа их получения, малого количества выделяемых клеток в связи с невысоким пролиферативным потенциалом или из-за этических проблем (Bongso, Fong, 2013). В связи с этим большое внимание уделяется выделению МСК из внезародышевых органов, которые фор-

мируются в первые недели беременности. Получение МСК из этих органов не связано с перечисленными ограничениями.

Наше внимание привлекли МСК, выделенные из зубной ткани человека. Получение МСК из пульпы зуба, так же как из внезародышевых тканей, не связано со специальными инвазивными способами получения клеток и с этическими проблемами, так как необходимая для выделения клеток зубная ткань отбрасывается как хирургический отход в процессе выполнения стандартной стоматологической операции. А в случае выпадения молочных зубов у ребенка стоматологическая процедура вообще отсутствует (Mortada et al., 2017; Ercal et al., 2018). К настоящему времени известен ряд работ по получению и характеристике МСК из разных участков зубной ткани человека (Gronthos et al., 2000; Huang et al., 2009; Estrela et al., 2011; Isobe et al., 2015; Aghajani et al., 2016; Wang et al., 2018). Пульпа как молочных, так и постоянных зубов является богатым источником МСК (Gronthos et al., 2000; Ren et al., 2016; Suchanek et al., 2017). Зубная ткань образуется из нервного гребня. В связи с этим МСК из пульпы зуба экспрессируют ряд нейрональных маркеров, т. е. имеют повышенный потенциал нейрональной дифференцировки. Поэтому эти МСК могут быть использованы для лечения нейродегенеративных заболеваний с большим успехом, чем МСК, выделенные из других тканей человека (Fatima et al., 2017; Kolar et al., 2017; Ullah et al., 2017; Gonmanee et al., 2018; Zhang N. et al., 2018). Тем не менее помимо дифференцировок в нейрональном направлении они могут дифференцироваться и в другие типы клеток (Chalisserry et al., 2017).

МСК из разных участков зубной ткани человека можно получать от доноров разного возраста. Известно, что старение организма обусловлено несколькими механизмами, затрагивающими как МСК, так и их микроокружение. Взаимодействие МСК и микроокружения обеспечивает ухудшение возрастных характеристик МСК (Sethe et al., 2006; Tobin, 2017). Проведены многочисленные исследования МСК человека, которые получены из разных источников, включая и МСК зубной ткани, подтверждающие зависимость характеристик МСК от возраста донора. В частности, показано снижение пролиферативной активности и дифференцировочного потенциала с увеличением возраста донора (Siegel et al., 2013; Kornicka et al., 2015; Крылова и др., 2016; Maredziak et al., 2016; Mohd et al., 2016; Yi et al., 2016; Zhang et al., 2018). По-видимому, во многих случаях возраст донора является важным фактором для использования этих МСК в регенеративной медицине.

В связи с этим в настоящей работе мы использовали зубную ткань молочного зуба, выпавшего у 6-летнего ребенка. Учитывая также важность микроокружения для функциональной активности стволовых клеток, следует подчеркнуть, что образование ниши стволовых клеток в пульпе молочных зубов начинается еще до рождения ребенка. Короткий период активного роста организма до замены молочных зубов на постоянные зубы характеризуется сохранением активных ниш, богатых стволовыми клетками, которые еще не сильно подвержены накопительному влиянию нежелательных генетических и внешних факторов. Таким образом, пульпа молочных зубов обеспечивает источник более здоровых стволовых клеток по сравнению с пульпой, изолированной от постоянных зубов взрослого организма (Kerkis, Caplan., 2012).

Известно, что неиммортизированные клеточные линии в процессе длительного культивирования в отличие

от иммортизированных линий подвергаются репликативному старению, которое представляет собой сложный комплексный процесс (Wagner et al., 2008; Kuilman et al., 2010; Redaelli et al., 2012; Estrada et al., 2013; Savickiene et al., 2016). Исследование репликативного старения диплоидных клеточных линий способствует расширению фундаментальных знаний о процессах, происходящих в клетках, а также вносит возрастные ограничения по использованию МСК в регенеративной медицине.

В работе поставлены следующие задачи: 1) выделение из пульпы зуба фибробластоподобных клеток; 2) анализ характеристик, подтверждающих статус МСК полученной линии на раннем, 6-м пассаже; 3) сравнительный количественный анализ активности фермента β -галактозидазы, характеризующей процесс репликативного старения и экспрессии маркера CD264, связанного с этим процессом, при длительном культивировании клеток; 4) анализ ростовых характеристик, кариотипической изменчивости, экспрессии маркеров недифференцированных эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) и дифференцировочного потенциала клеток при длительном культивировании.

Материал и методика

Использовали пульпу выпавшего естественным образом молочного зуба 6-летнего ребенка. Материал использовали с разрешения родственников ребенка и получения от них информированного согласия. Сразу после выпадения зуб помещали в пробирку с транспортной средой, содержащей DMEM/F12 (Биолот, Россия) и двойной набор антибиотиков и антимикотика (Antibiotic Antimycotic Solution, Sigma, Израиль). До начала работы с материалом пробирку хранили при 4 °С не более 24 ч.

Выделение клеток из пульпы зуба проводили механическим методом. Все содержимое пульпы зуба вычищали через корневой канал при помощи одноразовой стерильной инъекционной иглы (23G, Apexmed, Нидерланды). Затем канал многократно промывали ростовой средой, содержащей DMEM/F12 (Биолот, Россия), 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone, США) и двойной набор раствора антибиотиков и антимикотика (Antibiotic Antimycotic Solution, Sigma, Израиль). Выделенные из пульпы зуба фрагменты ткани культивировали при 37 °С и 5 % CO₂ в течение 2 нед. За время культивирования адгезировавшие к поверхности культурального пластика фибробластоподобные клетки образовали обширные зоны роста. Для пересева клеток на другую чашку использовали 0.25%-ный раствор Трипсин-ЭДТА (Gibco, Великобритания).

На 3—4-м пассажах при отсутствии явных признаков контаминации бактериями и грибами в ростовую среду переставали добавлять раствор антибиотиков и антимикотика. Клетки длительно культивировали и получали основные характеристики на 6-м и 25-м пассажах. Кривоконсервировали клетки в кондиционированной среде, содержащей 10 % криопротектора диметилсульфоксида (Биолот, Россия). Микробиологический анализ, проведенный через 10 пассажей после снятия клеток с антибиотиков и антимикотика, подтвердил отсутствие бактериальной, грибковой и микоплазменной контаминации.

Получение клеточных сфероидов из монослойной культуры (2D) проводили методом висячей

капли. Готовили суспензию клеток в концентрации 30 тыс. кл./мл и раскапывали по 30 мкл по поверхности чашки Петри. Чашку переворачивали вверх дном и культивировали в условиях 5 % CO₂, 37 °C и 90 % влажности в течение 48 ч. В результате в каждой капле клетки образовывали по одному сфероиду (3D-культура).

Репликативное старение клеток оценивали по активности фермента β-галактозидазы. Клетки выращивали в чашках Петри (3.5 мм; Nunc, Дания) до образования конфлюэнта. Затем среду удаляли и окрашивали клетки с помощью набора реактивов (senescence β-galactosidase staining kit; Cell Signaling, США) согласно инструкции. У клеток, вступающих в фазу репликативного старения, цитоплазма имеет ярко-синюю окраску. Анализ проводили с помощью инвертированного микроскопа (NICON, Япония) на 6, 13 и 25-м пассажах. Долю окрашенных клеток (%) определяли путем подсчета не менее 1000 клеток в разных полях зрения на одну временную точку.

Анализ экспрессии поверхностного маркера CD264, повышенный уровень которого характеризует клетки, вступившие в активную фазу старения, исследован с помощью проточной цитофлуориметрии.

Эффективность клонирования клеточной линии определяли в чашках Петри в условиях редкого пассажа (3—4 кл./см²). Через 14 сут клетки окрашивали 1%-ным водным раствором кристалл-виолета и считали число колоний. Эффективность клонирования определяли в % по отношению числа выросших колоний (клонов) к числу посеянных клеток. Учитывали колонии, состоящие из не менее 20 клеток. Анализировали 5 экспериментов.

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 раза, ежедневно считали 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. Анализировали пассажи 6 и 25.

Кариотипический анализ проводили на 6-м и 25-м пассажах. Для получения препаратов метафазных хромосом за 2 ч до фиксации клеток в среду вводили КаргоМАХ (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 КС1 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 определяли при анализе 100 метафаз; долю полиплоидных клеток определяли при анализе 1000 (пассаж 6) или 500 (пассаж 25) метафазных пластинок.

Для структурного кариотипического анализа проводили дифференциальное G-окрашивание хромосом в соответствии с ранее описанной методикой (Ozkinay, Mitelman, 1979). Анализировали 100 метафаз на ранних и поздних пассажах. Кариотип линии 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 экспериментов для клеток, находящихся на 6-м и 25-м пассажах. 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 (Caltag, США), CD44, CD73, CD105 (Beckman Coulter, США) и CD90 (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 Трипсина-ЭДТА (Gibco, США) и отмывали от него раствором PBS, не содержащим ионов Ca²⁺ и Mg²⁺ (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) с помощью Stain Buffer (BD Pharmingen, США). Подготовку клеток для анализа экспрессии маркера CD264 на проточном цитофлуориметре осуществляли аналогичным методом.

Для иммунофлуоресцентного анализа экспрессии маркеров ранней дифференцировки ЭСК в производные трех зародышевых листков использовали антитела к α-актину (тест на мезодерму), α-фетопротейну (тест на энтодерму) (Sigma, США) и нестину (тест на эктодерму) (Chemicon, США). Для экспрессии маркера недифференцированных ЭСК использовали антитела против транскрипционного фактора Oct-4 (Santa Cruz, 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. Пермеабиллизацию проводили 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 пассаже.

Для количественной оценки маркеров недифференцированных ЭСК SSEA-4 (Santa Cruz, США), SOX2 (Sigma, Германия), а также виментина, используемого для подтверждения статуса МСК, применяли метод проточной цитофлуориметрии после проведения реакции иммунофлуоресценции в клеточной суспензии.

Для подтверждения статуса МСК проводили индукцию остеогенной, адипогенной и хондрогенной дифференцировки по модифицированному методу (Reyes et al., 2001). Клетки (10 тыс. кл./см²) высевали в остеогенную и адипогенную дифференцировочные среды (HyClone Thermo Scientific HyClone Product, США). Хондрогенную дифференцировку проводили в культуре микромасс в хондрогенной дифференцировочной среде (HyClone Thermo Scientific HyClone Product, США). Индукцию проводили в течение 3 нед, меняя среду каждые 3—4 сут.

Идентификацию хондрогенной дифференцировки проводили с помощью окрашивания 1%-ным раствором толуидинового синего в 50%-ном изопропанол (MP Bio-medicals, США), 0.1%-ным водным раствором сафранина О и 1%-ным раствором альцианового синего в 3%-ной уксусной кислоте. Время окраски составляло 30 мин при комнатной температуре для всех красителей.

Для идентификации остеогенной дифференцировки использовали реакцию Вон Косса. Для этого клетки фиксировали 2 мин в метаноле при -20°C и окрашивали 2%-ным раствором нитрата серебра (AgNO_3) (Вектон, Россия) в течение 1 ч под лампой мощностью 60 Вт. Окрашенные клетки промывали дистиллированной водой и помещали на 5 мин в 2.5%-ный раствор тиосульфата натрия. Затем клетки снова промывали водой и высушивали.

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

Для индукции нейрональной дифференцировки клетки высевали на чашки Петри и при достижении ими конfluence ростовую среду меняли на индукционную — DMEM (Биолот, Россия), содержащую 10 % фетальной бычьей сыворотки (HyClone, США), 1 мкмоль/л ретиноевой кислоты (Sigma-Aldrich, США), 20 мкг/л bFGF (Gibco, ThermoFisher, США) и 20 мкг/л hEGF (Sigma-Aldrich, США). Клетки культивировали в течение 4 сут, а затем анализировали экспрессию гена нейрональной дифференцировки с помощью метода ОТ-ПЦР.

Анализ экспрессии генов дифференцировки методом ОТ-ПЦР. Анализировали экспрессию двух маркеров — транспортера глюкозы 4 (GLUT4), специфичного для адипогенных клеток, и цитоплазматического белка нейроспецифической элоназы (NSE), специфичного для нейронов.

Для анализа генной экспрессии тотальную РНК из клеток выделяли при помощи TRIzol® Reagent (Invitrogen, США) по протоколу, рекомендованному фирмой-производителем. Все образцы обрабатывали ДНКазой (Fermentas, Thermo Scientific, Литва). Для синтеза к-ДНК использовали 0.5 мкг тотальной РНК на пробу, ревертазу RevertAid M-MuLV и случайные олигонуклеотидные последовательности (Fermentas, Thermo Scientific, Литва). Пробы для ПЦР готовили в соответствии с протоколом фирмы-производителя Taq ДНК-полимеразы (Fermentas, Thermo Scientific, Литва). Использовали специфические праймеры следующих последовательностей: для NSE прямой 5'-AAGGACAAATACGGCAAGGA-3' и обратный 5'-TGGACCAGGCAGCCCAATC-3'; для GLUT-4 прямой 5'-GGCATGTGTGGCTGTGCCATC-3' и обрат-

ный 5'-GGGTTTCACCTCCTGCTCTAA-3'; для β -актина прямой 5'-AATCTGGCACCACACCTTCTACA-3' и обратный 5'-GACGTAGCACAGTCTCTCCTTA-3'. Температура отжига праймеров была адаптирована к оптимальным условиям ПЦР для каждой используемой пары. ПЦР-анализ экспрессии генов проводили на амплификаторе T100 (BioRad, Сингапур). ПЦР-продукт разделяли методом электрофореза на 2% -ном агарозном геле. Результаты обрабатывали статистически с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при вероятности нулевой гипотезы, $P < 0.01$.

Результаты и обсуждение

В результате культивирования в течение 6 пассажей получена линия фибробластоподобных клеток, которую назвали согласно источнику получения из пульпы молочного зуба MSC-DP. Морфологический анализ этой линии показал однородность клеточных популяций со средними по размеру вытянутыми фибробластоподобными клетками (рис. 1).

Анализ репликативного старения клеток линии MSC-DP по активности β -галактозидазы показал наличие этого процесса при длительном культивировании до 25-го пассажа (табл. 1). Так, на 6-м пассаже старение незначительно, тогда как уже на 13-м увеличивается доля стареющих клеток, которая значительно возрастает к 25-му пассажу ($P < 0.01$). Кроме усиления активности β -галактозидазы к 25-му пассажу существенно изменяется и морфология клеток, выражающаяся в увеличении размеров и степени их распластанности, что также свидетельствует о наступлении репликативного старения (рис. 1).

Помимо сравнения уровня β -галактозидазы, являющегося общепризнанным маркером стареющих клеток, сравнивали экспрессию маркера CD264. Ранее было убедительно показано на МСК костного мозга человека, что CD264 также является маркером репликативного старения. Увеличение уровня экспрессии CD264 коррелирует с уменьшением пролиферативной активности и дифференцировочного потенциала клеток в процессе репликативного старения, а также связано с усилением экспрессии туморсупрессорных генов (Madsen et al., 2017). Результаты табл. 2 показывают увеличение уровня экспрессии этого маркера на пассаже 25 по сравнению с пассажами 6 и 13 ($P < 0.01$). Таким образом, экспрессия обоих маркеров существенно увеличивается в процессе длительного культивирования. Тем не менее характер изменения количественных значений экспрессии этих маркеров различается. Так, активность CD264 существенно выше активности β -галактозидазы на 6-м пассаже. Ранее было показано, что уровень экспрессии CD264, составляющий 20—35 %, не свидетельствует об изменении ростовых характеристик и дифференцировочного потенциала, связанных с процессом репликативного старения, т. е. характеризует функциональный статус нормальных, нестареющих клеток. Активный процесс репликативного старения отражает значительно более высокий уровень экспрессии этого антигена (Madsen et al., 2017). Количественные различия между экспрессией этих двух маркеров старения в процессе длительного культивирования, возможно, связаны с разными клеточными механизмами, способствующими изменению экспрессии этих маркеров.

Ростовые характеристики. Эффективность клонирования клеток MSC-DP на 6-м пассаже составила

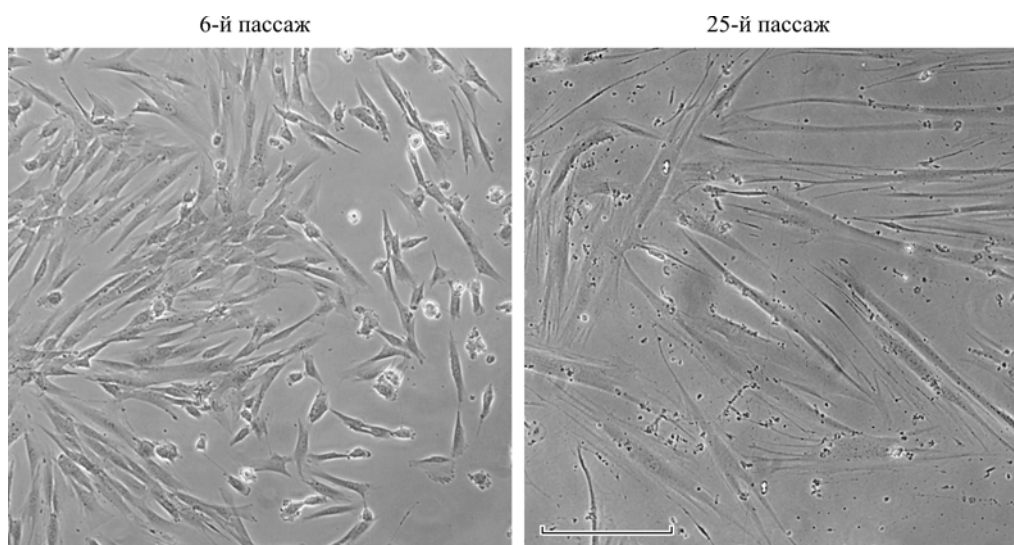


Рис. 1. Прижизненные фотографии клеток линии MSC-DP на 6- и 25-м пассажах. Инвертированный микроскоп NICON (Япония). Масштабный отрезок — 200 мкм.

$32.8 \pm 6.2 \%$. На 25-м пассаже она значительно снижалась и составляла $10.0 \pm 2.1 \%$ ($P < 0.01$). Снижение клоногенной активности в процессе культивирования показано в ряде работ (Lo Surdo et al., 2013; Крылова и др., 2016, 2017, 2018; Szepesi et al., 2016). Необходимо отметить, что при сравнительном анализе эффективности клонирования разных клеточных популяций необходимо учитывать первоначальную плотность посева клеток на культуральный сосуд, возможное влияние метаболитических продуктов, секретлируемых клетками, а также клеточную миграцию. 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; Kim et al., 2017).

Характеристика пролиферативной активности в процессе длительного культивирования свидетельствует об активном делении клеток на 6-м пассаже и значительном снижении ИП к 25-му пассажу (рис. 2). Анализ кривой роста показал, что время логарифмической фазы роста для клеток линии MSC-DP на 6-м пассаже составляет 96 ч. Среднее время удвоения клеточной популяции составляет 32.4 ± 0.6 ч.

На позднем 25-м пассаже, когда идут процессы активного репликативного старения, время логарифмической фазы существенно сокращается и составляет 48 ч, причем более активная пролиферация имеет место в период от 24 до 48 ч. При последующем культивировании в течение 4 сут величина ИП не меняется, кривая роста выходит на плато (рис. 2). Обращает на себя внимание тот факт, что время удвоения клеточной популяции не изменяется по сравнению с 6-м пассажем и составляет 29.7 ± 1.9 ч. Исходя из формулы расчета среднего времени удвоения клеточной популяции можно сказать, что при-

Т а б л и ц а 1

Динамика активности β -галактозидазы (β -гал) в процессе культивирования клеток линии MSC-DP

Пассажа	Число клеток	Доля окрашенных на β -гал, %
6	1002	6.8 ± 0.8
13	1169	20.0 ± 1.2
25	1405	71.0 ± 1.2

Примечание. Здесь и в табл. 1—3: даны средние значения и их ошибки при подсчете не менее 1000 клеток в разных полях зрения на одну временную точку (табл. 1) или из 3—4 экспериментов (табл. 2, 3).

Т а б л и ц а 2

Экспрессия поверхностного маркера CD264 в процессе культивирования клеточных популяций линии MSC-DP

Пассажа	Доля клеток, экспрессирующих CD264, %
6	22.33 ± 4.19
13	21.00 ± 3.00
25	79.29 ± 1.69^a

Примечание. ^a Достоверные различия с более ранними пассажами.

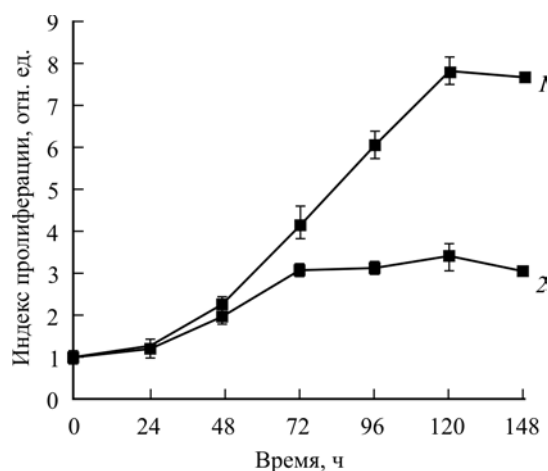


Рис. 2. Кривые роста клеток на 6-м (кривая 1) и 25-м (кривая 2) пассажах.

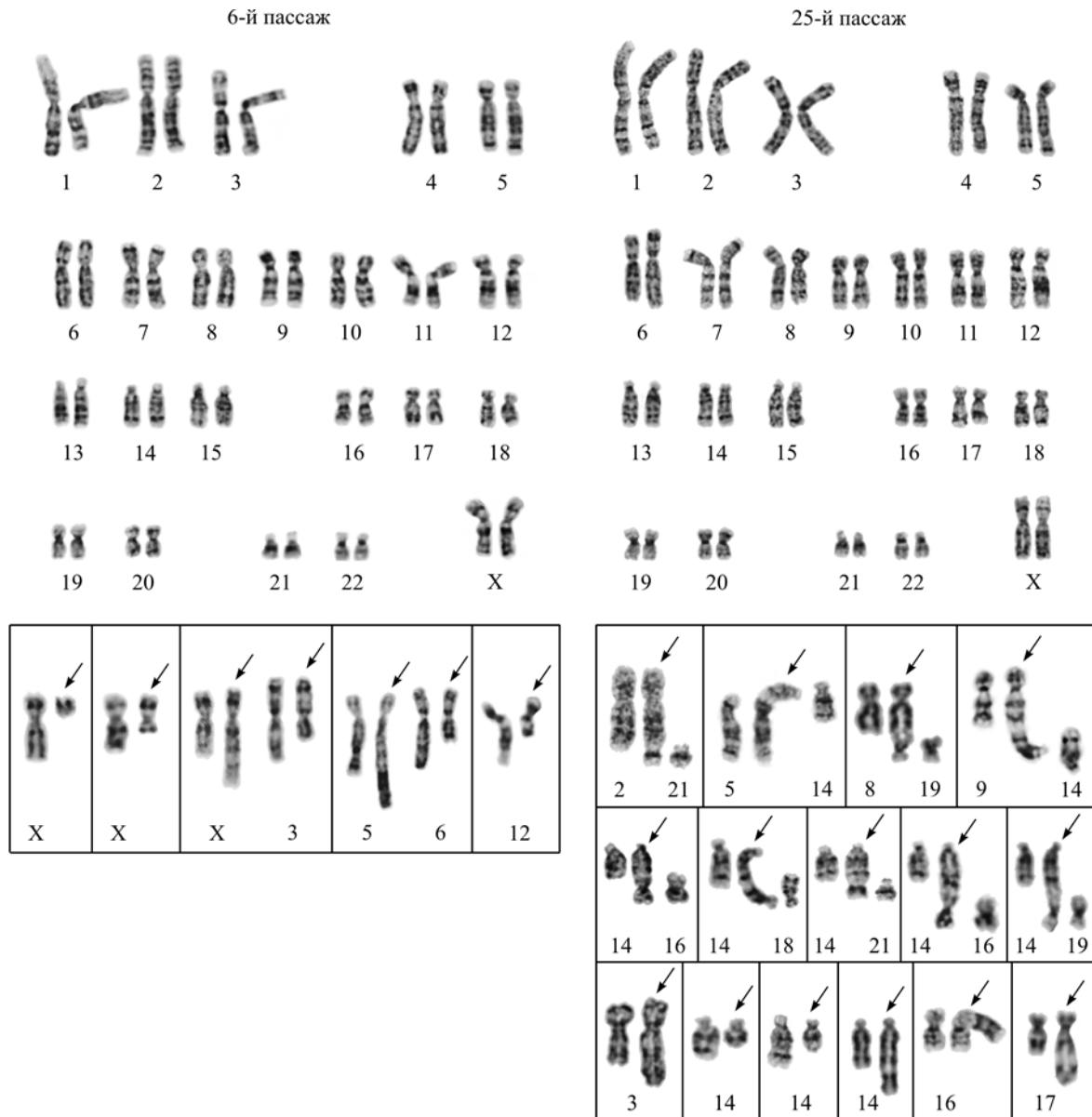


Рис. 3. Кариотипы клеточной линии MSC-DP и структурно перестроенные хромосомы (стрелки), обнаруженные в отдельных клетках на 6-м и 25-м пассажах.

Врезки: *пассаж 6* — фрагмент короткого плеча хромосомы X в клетке с кариотипом 45,X,—X; del(X) (pter→q21:); der(X)(Xpter→Xq24::3q13.2→3qter) и der(3)(3pter→q13.2::Xq24→Xqter); add(5)(pter→q13::?) и add(6) (pter→q13::?); add(12)(pter→q15::?); *пассаж 25:* в *верхнем* и *среднем* рядах — дигентрические хромосомы dic(2;21) (2pter→2q37::21p13→21qter); dic(5;14) (14pter→14q32::5p15.3→5qter); dic(8;19)(8pter→8q24.3::19q13.4→19pter); dic(9;14)(9pter→9q34::14q32→14pter); dic(14;16)(14pter→14q32::16p13.3→16qter); dic(14;18)(14pter→14q32::18q23→18pter) (3 клетки); dic(14;21)(14pter→14q32::21p13→21qter); der(14;16)(14pter→14q32::?:16p13.3→16qter); der(14;19)(14pter→14q32::?:19q13.4→19pter); в *нижнем* ряду — add(3)(pter→q29::?); del(14)(pter→q22:); del(14)(pter→q23:); add(14)(pter→q32::?) (2 клетки); der(16)(9q34→9q12::16p13.3→16qter); add(17)(pter→q25::?).

чиной отсутствия различий является несоответствие длительности логарифмической фазы и величины ИП. Для увеличения времени удвоения при данной длительности логарифмической фазы ИП должен быть еще ниже по сравнению с тем, который показан на рис. 2. По-видимому, полученные результаты свидетельствуют о том, что среднее время удвоения клеточной популяции не является обязательным признаком репликативного старения, хотя во многих работах и показано увеличение этого параметра в процессе длительного культивирования МСК (Garcia et al., 2016; Кольцова и др., 2017; De Witte et al., 2017; Крылова и др., 2018). Необходимо подчеркнуть, что

репликативное старение в целом представляет собой комплексный процесс, включающий в себя много параметров, и вклад каждого из них может быть разным в зависимости, в частности, от источника получения МСК. Наше исследование показывает, что присутствуют явные признаки старения клеточной популяции (табл. 1, 2), а также существенно увеличиваются размер клеток и их расплывчатость, появляется дебрис (рис. 1), существенно снижается пролиферативная активность с последующей остановкой клеток и уменьшается клоногенная активность. В целом полученные результаты подтверждают ограниченный срок жизни клеток линии MSC-DP, харак-

терный для неиммортизированных клеточных популяций (Hayflick, 1965; Matsumura et al., 1979; Vonab et al., 2006).

Количественный кариотипический анализ линии MSC-DP показал, что она характеризуется высокой частотой клеток с модальным числом хромосом, равным 46, на 6-м и 25-м пассажах. Тем не менее на пассаже 25 наблюдается снижение частоты клеток с 46 хромосомами (99.0 ± 1.0 и 89.0 ± 3.1 % соответственно, $P < 0.01$). Доля полиплоидных клеток составляет 7.83 ± 0.85 % на пассаже 6 и значительно снижается на пассаже 25 (3.20 ± 0.79 %, $P < 0.01$). Этот результат может свидетельствовать о том, что уровень полиплоидов не является маркером стареющих клеток, что показано нами ранее и на других линиях (Кольцова и др., 2017).

Структурный кариотипический анализ показал, что линия имеет нормальный кариотип человека: 46, XX (рис. 3). Тем не менее анализ 100 метафазных пластинок выявил ряд количественных и структурных хромосомных перестроек, частота которых существенно увеличивается в процессе длительного культивирования от 6-го до 25-го пассажа. Так, на пассаже 6 в единственной анеуплоидной клетке отсутствовала X-хромосома (45,X,-X). Еще в одной клетке, несмотря на присутствие 46 хромосом, обнаружены отсутствие хромосомы 12 и трисомия по хромосоме 5. Неклональные структурные хромосомные перестройки на пассаже 6 выявлены в 4 клетках: делеция хромосомы X — $\text{del}(X)(q21)$; транслокация хромосом X и 3 — $\text{t}(X;3)(q24;q13.2)$; перестройки хромосом 5 и 6 — $\text{add}(5)(q13)$ и $\text{add}(6)(q13)$; перестройка хромосомы 12 — $\text{add}(12)(q15)$. Таким образом, частота хромосомных перестроек при анализе 100 клеток равна 4.0 ± 2.0 %.

Структурные изменения хромосом на пассаже 25 обнаружены в 8 клетках с числом хромосом, равным 46: $\text{del}(14)(q22)$ (2 клетки), $\text{del}(14)(q23)$ и $\text{add}(14)(q32)$ (2 клетки). В остальных 3 клетках обнаружены соответственно перестройки хромосом 3 — $\text{add}(3)(q29)$, 16 — $\text{der}(16)\text{t}(9;16)(q12;p13.3)$ и 17 — $\text{add}(17)(q25)$. Таким образом, частота хромосомных перестроек при анализе 100 клеток равна 8.0 ± 2.7 %, что достоверно не отличается от раннего пассажа. Тем не менее необходимо подчеркнуть появление 2 клональных перестроек, а также преимущественное участие в структурных перестройках хромосомы 14, но с разрывами в разных локусах.

Существенно, что на пассаже 25 в отличие от пассажа 6, в клетках появляются дицентрические хромосомы по типу теломерных ассоциаций: $\text{dic}(2;21)(q37;p13)$; $\text{dic}(5;14)(p15.3;q32)$; $\text{dic}(8;19)(q24.3;q13.4)$; $\text{dic}(9;14)(q34;q32)$; $\text{dic}(14;16)(q32;p13.3)$; $\text{dic}(14;18)(q32;q23)$ (3 клетки); $\text{dic}(14;21)(q32;p13)$. В 2 клетках между терминальными локусами хромосом, участвующих в образовании дицентриков $\text{der}(14;16)$ и $\text{der}(14;19)$, наблюдали дополнительный неидентифицированный материал. Тем не менее вовлечение в образование этих перестроек терминальных локусов хромосом позволяет их условно отнести к дицентрикам по типу теломерных ассоциаций, причем в большинстве таких дицентрических хромосом — в 9 из 11 — задействовано длинное плечо хромосомы 14. Частота встречаемости теломерных ассоциаций составляет 11 %.

Таким образом, следует отметить случайный характер перестроек хромосом на 6-м пассаже, тогда как на 25-м наблюдалось появление неслучайных клональных хромосомных перестроек, включающих в себя как хромосомные перестройки, так и теломерные ассоциации. Ана-

Таблица 3

Экспрессия (%) поверхностных маркеров, определяющих статус МСК, в процессе культивирования клеточных популяций линии MSC-DP

Маркер	MSC-DP, пассаж	
	6	25
CD44	99.37 ± 0.48	99.67 ± 0.09
CD73	98.56 ± 0.68	99.51 ± 0.23
CD90	98.93 ± 0.53	98.09 ± 0.37
CD105	98.51 ± 0.79	95.75 ± 4.14
Виментин	71.65 ± 6.00	66.84 ± 2.73
CD34	0.35 ± 0.28	0.19 ± 0.05
CD45	1.08 ± 0.96	1.04 ± 0.10
HLA-ABC	99.40 ± 0.28	99.70 ± 0.21
HLA-DR	0.04 ± 0.01	0.11 ± 0.01
SSEA-4	13.84 ± 2.18^a	1.53 ± 0.70^a
SOX2	1.01 ± 0.35	1.04 ± 0.10

Примечание. ^a Достоверные различия между ранним и поздним пассажами.

лиз всех 19 клеток с аномальными кариотипами свидетельствует о преимущественном вовлечении хромосомы 14 (74 %) в нарушения разных типов.

Проведенный нами структурный кариотипический анализ при длительном культивировании показал появление теломерных ассоциаций в процессе активного репликативного старения. Причем если в линиях, полученных из Вартонова студия пупочного канатика человека (MSCWJ-1 и MSCWJ-2), в процессе репликативного старения были обнаружены теломерные ассоциации с низкой частотой (Кольцова и др., 2017), то в линии MSC-DP наблюдается высокая частота теломерных ассоциаций на позднем пассаже. Более того, обнаружено преимущественное участие в образовании теломерных ассоциаций длинного плеча хромосомы 14. Появление теломерных ассоциаций было ранее показано в разных «безмаркерных» иммортизированных и неиммортизированных диплоидных линиях при стрессовых ситуациях и при старении, которое также можно условно считать стрессом, так как оно сопровождается рядом нежелательных для организма или для клеточной культуры явлений (Benn, 1976; Полянская, 2000; Poljanskaya, Vakhtin, 2003). Анализ характерных черт теломерных ассоциаций, включая и преимущественное участие определенных хромосом в их образовании, проведенный на большом «безмаркерном» клеточном материале, позволил сделать вывод о том, что образование теломерных ассоциаций в таких клеточных линиях носит универсальный характер. По-видимому, их роль состоит не в создании кариотипической нестабильности, что связано с обычными хромосомными aberrациями, а в образовании генетических структур, обеспечивающих систему адаптации клеточной популяции к неблагоприятным факторам (Полянская, 2000; Poljanskaya, Vakhtin, 2003).

Подводя итог проведенному кариотипическому анализу, надо подчеркнуть, что Международное общество клеточной терапии и Рабочая группа по клеточным продуктам рекомендуют исключать клеточные культуры, имеющие 10 % и более клональных хромосомных нару-

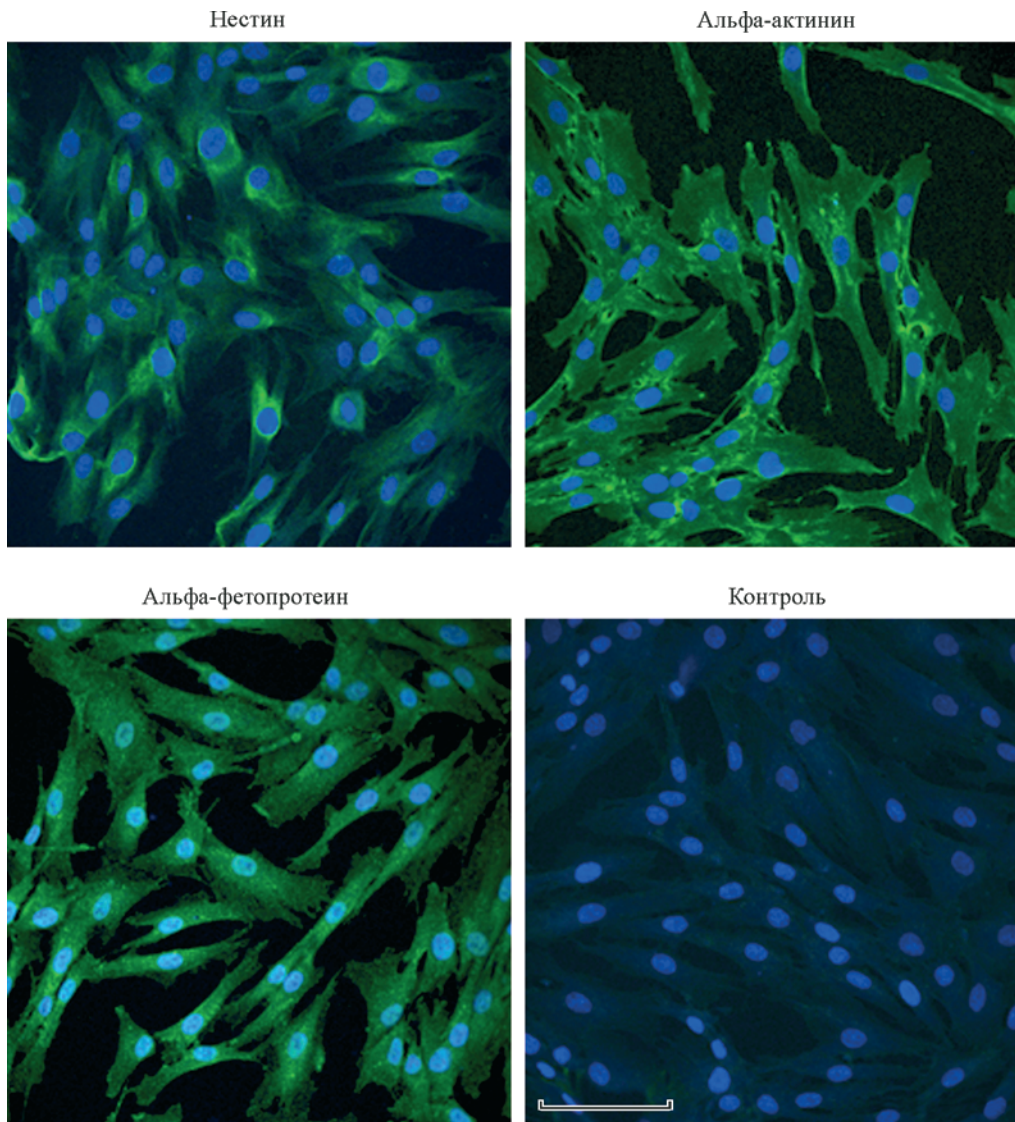


Рис. 4. Идентификация маркеров ранней дифференцировки эмбриональных стволовых клеток в клетках линии MSC-DP на 6-м пассаже по флуоресценции соответствующих моноклональных антител.

Показаны маркеры эктодермы (нестин), мезодермы (альфа-актинин) и энтодермы (альфа-фетопротеин). Масштабный отрезок — 50 мкм.

шений при анализе минимум 20 клеток, используя метод дифференциального G-окрашивания хромосом (Meisner, Johnson, 2008; Shaffer et al., 2009; Barkholt et al., 2013). В данном случае линия MSC-DP как на ранних, так и на поздних пассажах по уровню хромосомной нестабильности не превышает указанного барьера. Но повышенный уровень теломерных ассоциаций на 25-м пассаже является, по-видимому, показателем, дополнительным к активности галактозидазы, маркера CD264, ростовых и морфологических характеристик, свидетельствующих о неблагоприятном состоянии клеточной культуры.

Для подтверждения статуса МСК полученной линии MSC-DP анализировали поверхностные маркеры, характерные для МСК, с помощью проточной цитофлуориметрии. Анализ подтвердил наличие статуса МСК для этой линии (табл. 3). Из представленных результатов следует наличие экспрессии поверхностных антигенов, характерных для МСК человека: CD44, CD73, CD90, CD105, виментина и HLA-ABC. Выявлено отсут-

ствие или низкая частота экспрессии антигенов CD34, CD45 и HLA-DR. Таким образом, согласно требованиям Международного общества клеточной терапии (Domonici, 2006; Sensebe et al., 2010), для линии MSC-DP подтвержден статус МСК. Этот статус сохраняется и на позднем 25-м пассаже (табл. 3). С помощью иммунофлуоресцентного анализа не выявлено экспрессии транскрипционного фактора Oct-4 (данные не представлены). На пассаже 6 показаны экспрессия маркера ранней дифференцировки ЭСК — SSEA-4 — и отсутствие экспрессии SOX2. На пассаже 25 экспрессия обоих маркеров отсутствует (табл. 2).

К настоящему времени получено много экспериментальных данных, включая и наши собственные результаты, подтверждающих наличие экспрессии маркеров недифференцированных ЭСК в разных линиях МСК. Тем не менее не выявлено зависимости наличия экспрессии этих маркеров от стадии онтогенеза, в которой находится источник получения МСК, или от возраста донора. Есть

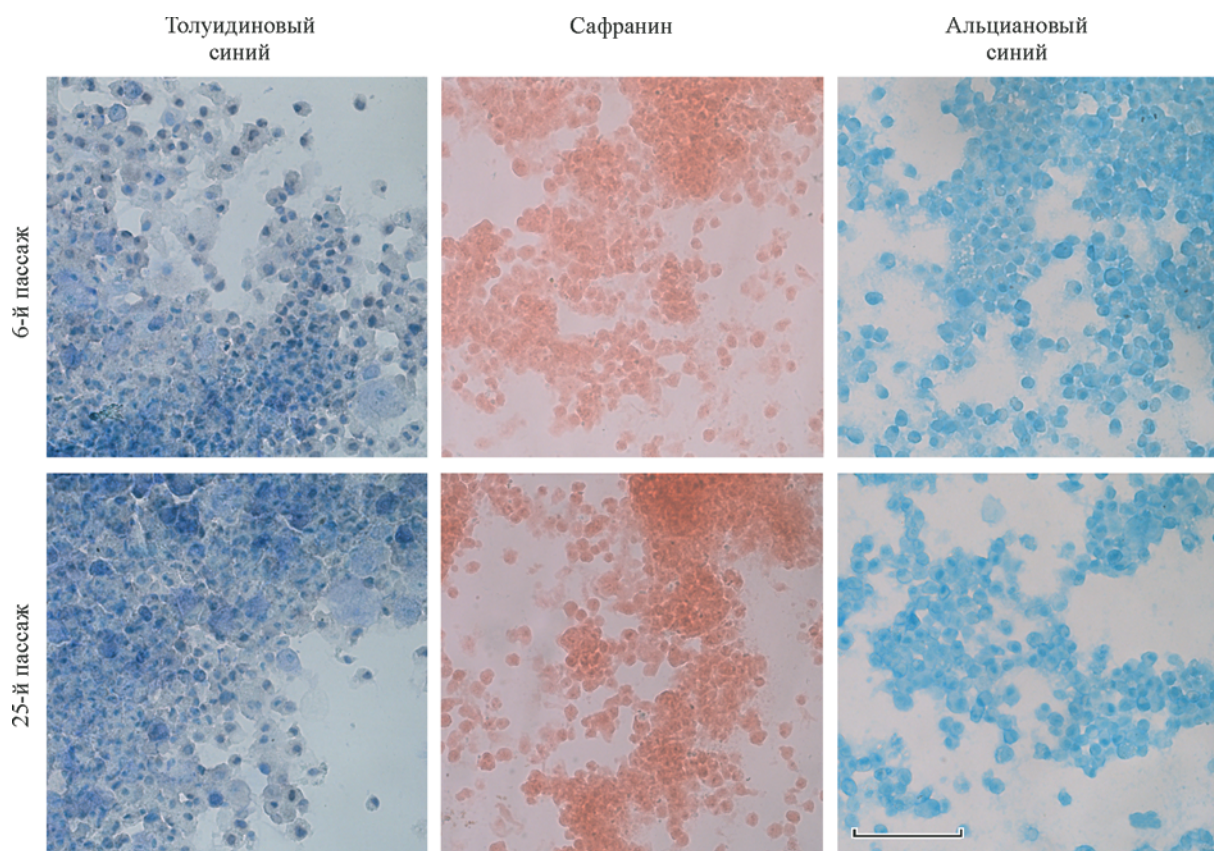


Рис. 5. Идентификация дифференцировки клеток линии MSC-DP в хондрогенном направлении (окрашивание толуидиновым синим для идентификации сульфатированных гликозаминогликанов; окрашивание сафранином O для идентификации протеогликанов; окрашивание альциановым синим для идентификации кислых гликозаминогликанов)

Масштабный отрезок — 100 мкм.

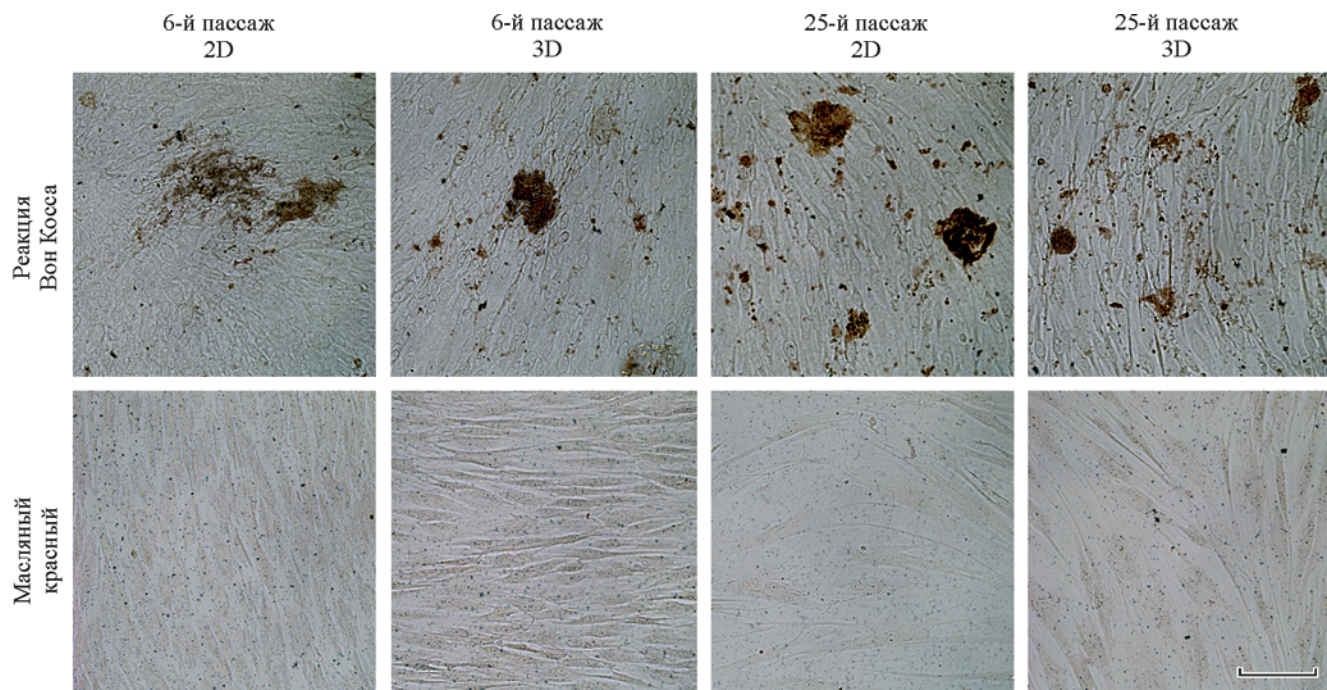


Рис. 6. Идентификация дифференцировки клеток линий MSC-DP в остеогенном направлении (реакция Вон Косса, выявляющая нерастворимые соли кальция в межклеточном пространстве) и в адипогенном направлении (окрашивание жировых включений масляным красным) в монослойной культуре (2D) и в клеточных сфероидсах (3D).

Масштабный отрезок — 100 мкм.

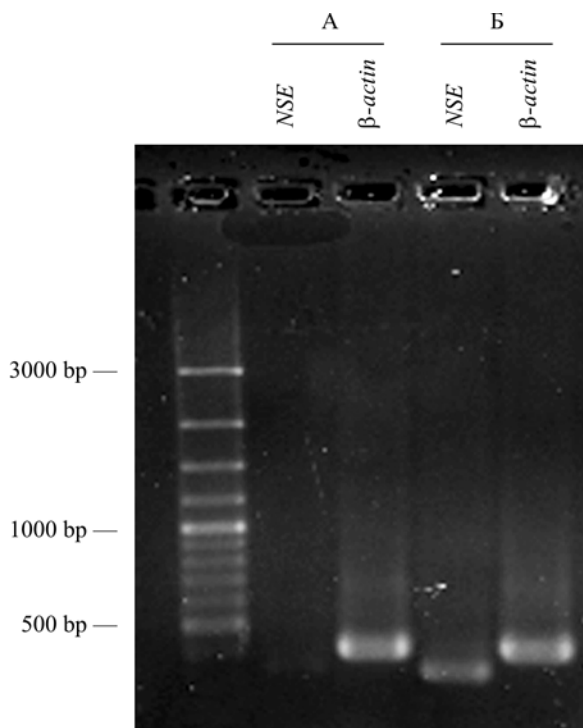


Рис. 7. Анализ экспрессии гена *NSE* в недифференцированных клетках MSC-DP (А) и после индукции нейрональной дифференцировки (Б).

β-actin — контрольный ген общего метаболизма.

расхождения по экспрессии этих маркеров в процессе длительного культивирования. Тем не менее полученные экспериментальные данные позволяют предположить, что МСК, экспрессирующие эти маркеры, имеют более высокую пролиферативную активность и повышенный дифференцировочный потенциал (Gang et al., 2007; Park et al., 2012; Wu et al., 2013; Aghajani et al., 2016; Matic et al., 2016).

Экспрессия маркеров ранней дифференцировки ЭСК в производные трех зародышевых листков показана с помощью иммунофлуоресцентного анализа (рис. 4). Идентифицированы следующие маркеры — альфа-актинин (маркер мезодермы), альфа-фетопrotein (маркер энтодермы) и нестин (маркер эктодермы). Эти результаты совпадают с более ранними данными, полученными разными методами, о наличии экспрессии этих маркеров в МСК разного происхождения (Riekstina et al., 2009; Huang et al., 2010; Antonucci et al., 2011; Mamidi et al., 2011; Крылова и др., 2012, 2014, 2017, 2018; Кольцова и др., 2015). Есть разные предположения противоположного характера о функциональной роли этих маркеров: либо эти маркеры связаны с дифференцировочной пластичностью МСК, либо они связаны исключительно с эмбриональным происхождением МСК (Riekstina et al., 2009; Sensebé et al., 2010).

Индукция остеогенной, хондрогенной и адипогенной дифференцировки клеток линии MSC-DP выявила их способность формировать хрящевую и костную ткани. Культивирование клеток в хондрогенной среде приводило к образованию структур, которые выявляются с помощью окрашивания толудиновым синим (идентификация сульфатированных гликозаминогликанов), сафранином (идентификация протеогликанов)

и альциановым синим (идентификация кислых гликозаминогликанов). Культивирование клеток в остеогенной среде способствовало формированию минеральных комплексов при использовании реакции Вон Косса, позволяющей выявить нерастворимые соли кальция в межклеточном пространстве. Но культивирование клеток в адипогенной среде не способствовало образованию кластеров адипоцитов, выявляемых с помощью окрашивания красителем масляным красным (рис. 5, 6). Не было выявлено различий по интенсивности хондрогенной и остеогенной дифференцировок между 6-м и 25-м пассажами, а также на обоих пассажах показано отсутствие адипогенной дифференцировки. Тем не менее в литературе есть данные, показывающие зависимость уровня дифференцировки МСК, полученных из разных источников, от длительности культивирования (Bonab et al., 2006; Lo Surdo et al., 2013; Кольцова и др., 2017, Bianchi et al., 2017; Крылова и др., 2018). Данные по наличию адипогенной дифференцировки в МСК, выделенных из зубной ткани, противоречивы. Есть результаты, свидетельствующие о наличии этой дифференцировки (Huang et al., 2009; Kerkis, Caplan, 2012; Ren et al., 2016; Dastgurdi et al., 2018). Но есть работы, свидетельствующие об отсутствии адипогенной дифференцировки в стволовых клетках, выделенных из разных отделов зубной ткани, выявляемой с помощью окрашивания масляным красным (Zhang et al., 2006; Sonoyama et al., 2008). В настоящее время развиваются исследования по изучению баланса между адипогенной и остеогенной дифференцировкой в МСК. Есть данные об отрицательной корреляции между наличием адипогенной и остеогенной дифференцировки. Показано, что внешние факторы и сигнальные клеточные процессы, контролируемые транскрипционные события, включающие в себя гены адипогенной и остеогенной дифференцировки, могут влиять на адипо-остеогенный баланс (Chen et al., 2016; Dastgurdi et al., 2018). Возможно, что в МСК зубной ткани при активной дифференцировке в остеогенном направлении, включая активный одонтогенез, адипогенная дифференцировка подавлена.

В связи с отсутствием адипогенной дифференцировки на 6-м и 25-м пассажах в монослойной (2D) культуре на этих же пассажах нами был исследован адипогенный дифференцировочный потенциал в полученных из этой культуры клеточных сфероидов (3D-культура). Интерес к проведению этого исследования связан с тем, что клетки в сфероидов находятся ближе к физиологическим условиям тканей в организме, чем монослойные культуры. Ранее было показано, что клеточные сфероиды МСК обладают повышенным антивоспалительным действием, увеличенным дифференцировочным потенциалом, усиленной экспрессией ряда цитокинов и плюрипотентных генов (Alimperti et al., 2014; Bogdanova-Jatniece et al., 2014; Guo et al., 2014; Xiao et al., 2014; Li et al., 2015; Di Stefano et al., 2018). Настоящая работа подтверждает как наличие остеогенной дифференцировки в обоих вариантах культур (2D и 3D), так и отсутствие адипогенной дифференцировки в этих же вариантах (рис. 6). Таким образом, изменение условий культивирования не способствовало проявлению адипогенной дифференцировки, выявляемой с помощью окрашивания Oil Red O. Кроме того, проведение ОТ-ПЦР на 21-е сут дифференцировки показало отсутствие транскрипционной активности гена транспортера глюкозы 4 *GLUT4*, участвующего в адипогенезе (данные не показаны). Следовательно, полученная линия имеет уменьшенный дифференцировочный потен-

циал в мезодермальном направлении. С учетом данных литературы о существовании в МСК зубной ткани повышенного потенциала к нейрональной дифференцировке, что связано с онтогенетическим происхождением этой ткани и соответственно с ее изначальным микроокружением, нами получены данные, подтверждающие наличие этого потенциала. Так, с помощью ОТ-ПЦР-анализа показано наличие экспрессии гена *NSE*, участвующего в нейрональной дифференцировке (рис. 7).

Таким образом, в целом линия MSC-DP согласно полученным характеристикам, включая мультипотентный дифференцировочный потенциал, охватывающий мезодермальное и эктодермальное направления, соответствует статусу МСК.

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.)
- Кольцова А. М., Крылова Т. А., Мусорина А. С., Зенин В. В., Турилова В. И., Яковлева Т. К., Полянская Г. Г. 2017. Динамика свойств двух линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из Вартонова студия пупочного канатика человека, при длительном культивировании. Цитология. 59 (9): 574—587. (Koltsova A. M., Krylova T. A., Musorina A. S., Zenin V. V., Turilova V. I., Yakovleva T. K., Poljanskaya G. G. 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. Tsitologiya. 59 (9): 574—587.)
- 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 студия 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., Крощева 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., 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.)
- Крылова Т. А., Мусорина А. С., Кольцова А. М., Зенин В. В., Турилова В. И., Яковлева Т. К., Полянская Г. Г. 2018. Получение и сравнительная характеристика линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из крайней плоти двух доноров одного возраста. Цитология. 60 (4): 262—272. (Krylova T. A., Musorina A. S., Koltsova A. M., Zenin V. V., Turilova V. I., Yakovleva T. K., Poljanskaya G. G. 2018. The derivation and comparative characterization of mesenchymal stem cell lines isolated from foreskin of two donors of the same age. Tsitologiya. 60 (4): 262—272.)
- 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 Biol. 120 (6): 529—539.)
- Полянская Г. Г. 2018. Сравнительный анализ характеристик линий мезенхимных стволовых клеток человека, полученных в коллекции культур клеток позвоночных (обзор). В кн.: Клеточные культуры. Вып. 34: 3—18. (Poljanskaya G. G. 2018. Comparative analysis of the lines of human mesenchymal stem cells derived in the collection of cell cultures of vertebrates (review). Collection «Cell cultures». Issue 34: 3—18.)
- Седова Г. П. 2008. Количественные аспекты злокачественного роста. Математическая морфология. Электронный математический и медико-биологический журн. 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>.)
- 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 (6): 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: e0122465. Doi: 10.1371/journal.pone.0122465.
- 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.
- 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.
- Barkholt L., Flory E., Jekerle V., Lucas-Samuel S., Ahnert P., Bisset L., Buscher D., Fibbe W., Foussat A., Kwa M., Lantz O., Maciulaitis R., Palomaki T., Schneider C. K., Sensebe 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.
- Bianchi M. V., Awaja F., Altankov G. 2017. Dynamic adhesive environment alters the differentiation potential of young and ageing mesenchymal stem cells. Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl. 78: 467—474.
- Bogdanova-Jatniece A., Berzins U., Kozlovskaya T. 2014. Growth properties and pluripotency marker expression of sponta-

- neously formed three-dimensional aggregates of human adipose-derived stem cells. *Int. J. Stem Cells.* 7 : 143—152.
- 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.
- Chalisserry E. P., Nam S. Y., Park S. H., Anil S. 2017. Therapeutic potential of dental stem cells. *J. Tissue Eng.* 8 : 2041731417702531. Doi: 10.1177/2041731417702531.
- Chen Q., Shou P., Zheng C., Jiang M., Cao G., Yang Q., Cao J., Xie N., Velletri T., Zhang X., Xu C., Zhang L., Yang H., Hou J., Wang Y., Shi Y. 2016. Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? *Cell Death Differ.* 23 (7) : 1128—1139.
- Dastgardi E. M., Ejeian F., Nematollahi M., Motaghi A., Nasr-Esfahani M. H. 2018. Comparison of two digestion strategies on characteristics and differentiation potential of human dental pulp stem cells. 93 : 74—79.
- 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., Hoogdrijn M. J. 2017. Aging of bone marrow- and umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells during expansion. *Cytotherapy.* 19 : 798—807.
- Di Stefano A. B., Grisafi F., Castiglia M., Perez A., Montesano L., Gulino A., Toia F., Fanale D., Russo A., Moschella F., Leto Barone A. A., Cordova A. 2018. Spheroids from adipose-derived stem cells exhibit an miRNA profile of highly undifferentiated cells. *J. Cell Physiol.* Doi: 10.1002/jcp.26785.
- 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.
- Ercal P., Pekozer G. G., Kose G. T. 2018. Dental stem cells in bone tissue engineering: current overview and challenges. *Adv. Exp. Med. Biol.* Doi: 10.1007/5584_2018_171.
- Estrada J. C., Torres Y., Benguria A., Dopazo A., Roche E., Carrera-Quintanar L., Perez 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.
- Estrela C., Alencar A. H., Kitten G. T., Vencio E. F., Gava E. 2011. Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. *Braz. Dent. J.* 22 : 91—98.
- Fatima N., Khan A. A., Vishwakarma S. K. 2017. Immunophenotypic and molecular analysis of human dental pulp stem cells potential for neurogenic differentiation. *Contemp. Clin. Dent.* 8 : 81—89.
- 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.
- Garcia J., Wright K., Roberts S., Kuiper J. H., Mangham C., Richardson J., Mennan C. 2016. Characterisation of synovial fluid and infrapatellar fat pad derived mesenchymal stromal cells: the influence of tissue source and inflammatory stimulus. *Sci. Rep.* 6 : 24295. Doi: 10.1038/srep24295.
- Gonmanee T., Thonabulsombat C., Vongsavan K., Sritanaudomchai H. 2018. Differentiation of stem cells from human deciduous and permanent teeth into spiral ganglion neuron-like cells. *Arch. Oral Biol.* 88 : 34—41.
- Gronthos S., Mankani M., Brahimi J., Robey P. G., Shi S. 2000. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 97 : 13 625—13 630.
- 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.
- Hayflick L. 1965. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 37 : 614—636.
- Huang G. T., Gronthos S., Shi S. 2009. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J. Dent. Res.* 88 : 792—806. Review.
- 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.
- Isobe Y., Koyama N., Nakao K., Osawa K., Ikeno M., Yamanaoka S., Okubo Y., Fujimura K., Bessho K. 2016. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovial fluid, adult dental pulp, and exfoliated deciduous tooth pulp. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 45 : 124—131.
- Kerkis I., Caplan A. I. 2012. Stem cells in dental pulp of deciduous teeth. *Tissue Eng. Part B Rev.* 18 : 129—138.
- Kim D. S., Lee M. W., Lee T. H., Sung K. W., Koo H. H., Yoo K. H. 2017. Cell culture density affects the stemness gene expression of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Biomed. Rep.* 6 : 300—306.
- Kolar M. K., Itte V. N., Kingham P. J., Novikov L. N., Wi-berg M., Kelk P. 2017. The neurotrophic effects of different human dental mesenchymal stem cells. *Sci. Rep.* 7(1) : 12605. Doi: 10.1038/s41598-017-12969-1.
- Kornicka K., Marycz K., Tomaszewski K. A., Maredziak M., Smieszek A. 2015. The effect of age on osteogenic and adipogenic differentiation potential of human adipose derived stromal stem cells (hASCs) and the impact of stress factors in the course of the differentiation process. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2015 : 309169. Doi: 10.1155/2015/309169.
- Kuilman T., Michaloglou C., Mooi W. J., Peeper D. S. 2010. The essence of senescence. *Genes Develop.* 24 : 2463—2479.
- Li Y., Guo G., Li L., Chen F., Bao J., Shi Y. J., Bu H. 2015. Three-dimensional spheroid culture of human umbilical cord mesenchymal stem cells promotes cell yield and stemness maintenance. *Cell Tissue Res.* 360 : 297—307.
- Lo Surdo J. L., Millis B. A., Bauer S. R. 2013. Automated microscopy as a quantitative method to measure differences in adipogenic differentiation in preparations of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* 15 : 1527—1540.
- Madsen S. D., Russell K. C., Tucker H. A., Glowacki J., Bunnell B. A., O'Connor K. C. 2017. Decoy TRAIL receptor CD264 : a cell surface marker of cellular aging for human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* 8 : 201—214.
- 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., Bhone R. 2011. Co-culture of mesenchymal-like stromal cells derived from human foreskin permits long term propagation and differentiation of human embryonic stem cells. *J. Cell. Biochem.* 112 : 1353—1363.
- Maredziak M., Marycz K., Tomaszewski K. A., Kornicka K., Henry B. M. 2016. The influence of aging on the regenerative potential of human adipose derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Int.* 2016 : 2152435. Doi: 10.1155/2016/2152435.
- 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.
- Meisner L. F., Johnson J. A. 2008. Protocols for cytogenetics studies of human embryonic stem cells. *Methods.* 45 : 133—141.
- Mohd Ali N., Boo L., Yeap S. K., Ky H., Satharasinghe D. A., Liew W. C., Ong H. K., Cheong S. K., Kamarul T. 2016. Probable impact of age and hypoxia on proliferation and microRNA expression profile of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Peer J.* 4 : e1536. Doi: 10.7717/peerj.1536. eCollection 2016.
- Mortada I., Mortada R., Al Bazzal M. 2017. Dental pulp stem cells and neurogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* Doi: 10.1007/5584_2017_71.

- 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.
- 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., Dalpra 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—63.
- Ren H., Sang Y., Zhang F., Liu Z., Qi N., Chen Y. 2016. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from umbilical cord, dental pulp, and menstrual blood as sources for cell therapy. *Stem Cells Int.* Doi: 10.1155/2016/3516574.
- 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.
- 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 : e6498. Doi: 10.1371/journal.pone.0006498.
- Savickiene J., Baronaite S., Zentelyte A., Treigyte G., Navakaskiene 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.
- Shih D. T., Lee D. C., Chen S. C., Tsai R. Y., Huang C. T., Tsai C. C., Shen E. Y., Chiu W. T. 2005. Isolation and characterization of neurogenic mesenchymal stem cells in human scalp tissue. *Stem Cells*. 23 : 1012—1020.
- Siegel G., Kluba T., Hermanutz-Klein U., Bieback K., Northoff H., Schafer R. 2013. Phenotype, donor age and gender affect function of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Med.* 11 : 146. Doi: 10.1186/1741-7015-11-146.
- Sonoyama W., Liu Y., Yamaza T., Tuan R. S., Wang S., Shi S., Huang G. T. 2008. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J. Endod.* 34 : 166—171.
- Suchanek J., Nasry S. A., Soukup T. 2017. The differentiation potential of human natal dental pulp stem cells into insulin-producing cells. *Folia Biol. (Praha)*. 63 : 132—138.
- Szepesi Á., Matula Z., Szigeti A., Várady G., Szalma J., Szabó G., Uher F., Sarkadi B., Németh K. 2016. *In vitro* characterization of human mesenchymal stem cells isolated from different tissues with a potential to promote complex bone regeneration. *Stem Cells Int.* 2016 : 3595941. Doi: 10.1155/2016/3595941.
- Tobin D. J. 2017. Introduction to skin aging. *J. Tissue Viability*. 26 : 37—46.
- Ullah I., Park J. M., Kang Y. H., Byun J. H., Kim D. G., Kim J. H., Kang D. H., Rho G. J., Park B. W. 2017. Transplantation of human dental pulp-derived stem cells or differentiated neuronal cells from human dental pulp-derived stem cells identically enhances regeneration of the injured peripheral nerve. *Stem Cells Develop.* 26 : 1247—1257.
- 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 : e2213. Doi: 10.1371/journal.pone.0002213.
- Wang H., Zhong Q., Yang T., Qi Y., Fu M., Yang X., Qiao L., Ling Q., Liu S., Zhao Y. 2018. Comparative characterization of SHED and DPSCs during extended cultivation *in vitro*. *Mol. Med. Rep.* 17 : 6551—6559.
- Wu R., Gu B., Zhao X., Tan Z., Chen L., Zhu J., Zhang M. 2013. Derivation of multipotent nestin(+)/CD271(-)/STRO-1(-) mesenchymal-like precursors from human embryonic stem cells in chemically defined conditions. *Hum. Cell*. 26 : 19—27.
- Xiao L., Kumazawa Y., Okamura H. 2014. Cell death, cavitation and spontaneous multi-differentiation of dental pulp stem cells-derived spheroids *in vitro*: a journey to survival and organogenesis. *Biol. Cell*. 106 : 405—419.
- Yan Z. J., Hu Y. Q., Zhang H. T., Zhang P., Xiao Z. Y., Sun X. L., Cai Y. Q., Hu C. C., Xu R. X. 2013. Comparison of the neural differentiation potential of human mesenchymal stem cells from amniotic fluid and adult bone marrow. *Cell Mol. Neurobiol.* 33 : 465—475.
- Yi Q., Liu O., Yan F., Lin X., Diao S., Wang L., Jin L., Wang S., Lu Y., Fan Z. 2017. Analysis of senescence-related differentiation potentials and gene expression profiles in human dental pulp stem cells. *Cells Tissues Organs*. 203 : 1—11.
- Zhang M., Wang Z., Zhao Y., Zhang L., Xu L., Cao L., He W. 2018. The effect of age on the regenerative potential of human eyelid adipose-derived stem cells. *Stem Cells Int.* 2018 : 5654917. Doi: 10.1155/2018/5654917.
- Zhang N., Lu X., Wu S., Li X., Duan J., Chen C., Wang W., Song H., Tong J., Li S., Liu Y., Kang X., Wang X., Han F. 2018. Intra-atrial transplantation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth reduces motor defects in Parkinsonian rats. *Cytherapy*. pii: S1465-3249(18)30407-9. Doi: 10.1016/j.jcyt.2018.02.371.
- Zhang W., Walboomers X. F., Shi S., Fan M., Jansen J. A. 2006. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Eng.* 12 : 2813—2823.

Поступила 5 VI 2018

THE DERIVATION AND CHARACTERIZATION OF MESENCHYMAL STEM CELL LINE,
ISOLATED FROM HUMAN PULP OF A DECIDUOUS TOOTH

A. M. Koltsova, V. V. Zenin, V. I. Turilova, T. K. Yakovleva, G. G. Poljanskaya*

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;

* e-mail: poljansk@incras.ru

The derived and characterized the new non-immortalized human mesenchymal stem cell lines isolated from pulp of a deciduous tooth of a child, named MSC-DP. The analysis of the main characteristics was carried out on 6th and 25th passages. In the process of long-term cultivation gradually increases the proportion of senes-

cence cells according to the activity of β -galactosidase. The 25th passage significantly increases the expression of the CD264 marker in comparison with the earlier passages, the increased level of which also characterizes cells that have entered the active phase of replicative senescence. The plating efficiency of cells of MSC-DP significantly decreases during long-term cultivation. Growth curves indicate active cell line proliferation on the 6th passage and a significant decrease in the proliferation index on the 25th passage. Karyotypic analysis carried out on the 6th and 25th passages showed the presence of normal human karyotype, 46, XX. Significant differences in karyotypic structure between 6th and 25th passage associated with the presence of a significant number dicentric chromosome-type telomere associations in the later passage. The predominant participation in the formation of telomeric associations of the long arm of the chromosome 14 was found. On the 6th and 25th passages the expression of surface antigens typical for human MSCs (CD44, CD73, CD90, CD105, HLA-ABC) and the absence of expression of CD34, CD45, HLA-DR were revealed. The marker of undifferentiated human embryonic stem cells (ESC) — SSEA-4 is expressed only on the 6th passage. The expression of markers of early differentiation ESC in the derivatives of the 3 germ layers was shown for cells of MSC-DP line. Cells of the MSC-DP line have the ability to differentiate in the osteogenic and chondrogenic directions. Expression of the neuronal differentiation gene is shown in confirmation of the ability of the MSC-DP line to multipotent differentiation. Overall, the presented results confirm the status of MSCs for the derived line and indicate significant changes occurring in the process of replicative senescence.

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