

**ПОЛУЧЕНИЕ И СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИНИЙ
МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК,
ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КРАЙНЕЙ ПЛОТИ ДВУХ ДОНОРОВ
ОДНОГО ВОЗРАСТА**

© Т. А. Крылова, А. С. Мусорина, 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*

Получены две новые неиммортизированные линии из крайней плоти доноров одного возраста (2.5 года), названные FRSN-1 и FRSN-2. На 6-м пассаже проведен анализ ростовых характеристик и дифференцировочного потенциала этих линий и подтвержден для них статус мезенхимных стволовых клеток (МСК). Ряд характеристик анализировали в процессе длительного культивирования до 26-го пассажа. Время начала и динамика процесса репликативного старения, определенного по активности β-галактозидазы, различается между линиями. Но к 26-му пассажу процесс репликативного старения одинаково усиливается в обеих линиях. Эффективность клонирования на 6-м пассаже различается между линиями: в FRSN-1 она значительно выше, чем в линии FRSN-2. На 26-м пассаже эффективность клонирования значительно снижается в FRSN-1, а в FRSN-2 клетки теряют эту способность. Кривые роста, полученные на 6-м пассаже, свидетельствуют об активной пролиферации обеих линий. Среднее время удвоения клеточных популяций у линий на 6-м пассаже не различается и составляет 36.9 ± 0.2 и 39.0 ± 0.8 ч соответственно. Пролиферативная активность в обеих линиях на 26-м пассаже снижается, среднее время удвоения клеточной популяции увеличивается, причем в клетках FRSN-2 оно значительно больше, чем в FRSN-1. Характер кривых роста линий существенно различается. Морфологический анализ показывает типичные для фазы старения изменения, связанные с увеличением размера и степенью распластанности клеток. Количественный и структурный кариотипический анализ, проведенный на 6-м пассаже, показал, что обе линии имеют нормальный кариотип человека (46, XY) и существенно не различаются по частоте хромосомных перестроек. Для определения статуса клеток анализ поверхностных маркеров на 6-м пассаже выявил в обеих линиях экспрессию поверхностных антигенов, характерных для МСК человека (CD44, CD73, CD90, CD105 и HLA ABC), и отсутствие экспрессии CD34, CD45 и HLA DR. В клетках обеих линий экспрессируются маркеры недифференцированных эмбриональных стволовых клеток человека (ЭСК) — SSEA-4 и SOX 2. Экспрессия SSEA-4 на 26-м пассаже не отличается от таковой 6-го пассажа. Обе линии экспрессируют маркеры ранней дифференцировки ЭСК в производные трех зародышевых листков. Клетки обеих линий на 6-м пассаже способны дифференцироваться в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях, что также подтверждает статус МСК. Адипогенный потенциал значительно снижается у обеих линий в течение 20 пассажей. Эти данные свидетельствуют о том, что уже при среднем уровне репликативного старения наблюдается изменение адипогенного дифференцировочного потенциала в отличие от неизменных ростовых характеристик. По-видимому, репликативное старение клеток вносит существенный вклад в изменение дифференцировочного потенциала МСК. В целом полученные результаты свидетельствуют о существовании ряда различий между линиями, полученными от разных доноров, по ростовым характеристикам и характеру репликативного старения. Эти различия могут быть обусловлены как непосредственным генетическим влиянием, так и опосредованно — разным микроокружением, которое детерминирует свойства клеток еще до выделения их из организмов доноров.

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

Анализ характеристик мезенхимных стволовых клеток (МСК) человека, выделенных из разных источников, является весьма актуальной проблемой. Важность таких исследований вытекает из особенностей взаимодействия МСК, выделенных из разных тканей, со свойственным каждой ткани характерным микроокружением. Происхождение или источник получения МСК может опреде-

лять их функциональные характеристики. Под разными источниками надо понимать как разные ткани одной стадии онтогенеза, так и разные или одинаковые ткани разных стадий онтогенеза. Стадии онтогенеза условно можно разделить на взрослые, эмбриональные и внезародышевые. Сравнительное изучение характеристик, являющихся определяющими в поддержании статуса

МСК, а также других характеристик, ответственных за важнейшие клеточные процессы, способствует углублению фундаментальных знаний о МСК человека. Это важно как для понимания механизмов биологических процессов в клетке, так и для расширения возможностей использования МСК в регенеративной медицине.

Надо подчеркнуть, что МСК, являясь неиммортиализованными диплоидными клетками, служат наиболее адекватной моделью для изучения биологических процессов в здоровом организме. Тем не менее диплоидные (неиммортиализованные) клеточные линии в отличие от иммортиализованных линий подвергаются процессу репликативного старения в процессе длительного культивирования. Известно, что репликативное старение — комплексный процесс. Он включает в себя ряд признаков — существенное снижение или прекращение пролиферации, морфологические изменения, увеличенную активность β -галактозидазы, повышение уровня экспрессии опухолевых супрессорных генов, укорочение теломер, уменьшение дифференцировочного потенциала, ряд эпигенетических изменений и др. Процесс клеточного старения в МСК может начинаться на ранних пассажах 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). Исследование процесса старения диплоидных клеточных линий, с одной стороны, углубляет фундаментальные знания о процессах, происходящих в клетках, а с другой — вносит возрастные ограничения по использованию МСК в регенеративной медицине.

Согласно требованиям Международного общества клеточной терапии, статус МСК разного происхождения определяется рядом общих характеристик: это адгезивность к культуральному пластику, активная пролиферация, экспрессия поверхностных маркеров CD105, CD90, CD73, CD44, HLA ABC и отсутствие экспрессии CD34, CD45 и HLA DR, а также способность к дифференцировке в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях (Dominici et al., 2006; Sensebe et al., 2010). Существуют многочисленные сравнительные исследования свойств МСК, выделенных из разных источников, включая разные ткани взрослых, эмбриональных и внезародышевых тканей человека (Крылова и др., 2012, 2014, 2015, 2016, 2017; Кольцова и др., 2015; Kao et al., 2015; Garcia et al., 2016; Lee et al., 2016; Aгаџо et al., 2017; Dizaji et al., 2017; Xu et al., 2017). Поскольку клеточные популяции каждого донора являются генетически уникальным материалом, одним из объектов для сравнения характеристик МСК является клеточный материал, выделенный из одной ткани доноров одного возраста. Представляет существенный интерес исследование генетического вклада индивидуального донора в разные характеристики МСК. Есть ряд данных, указывающих на вариации характеристик МСК между разными донорами (Bernardo et al., 2007; Redaelli et al., 2012; Lo Surdo et al., 2013; Portalska et al., 2013; Stultz et al., 2016). Удачной моделью является крайняя плоть детей одного возраста.

Задачи настоящей работы: 1) выделение клеток и получение двух клеточных линий из крайней плоти доноров одного возраста; сравнительный анализ характеристик, определяющих статус МСК этих линий на раннем пассаже (6-м); 2) анализ экспрессии маркеров эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) — Oct-4, SOX-2 и SSEA-4; 3) сравнительный количественный анализ активности фермента β -галактозидазы, характеризующей признаки

репликативного старения клеточных популяций в процессе длительного культивирования (26 пассажей); 4) анализ дифференцировочного потенциала клеток в процессе длительного культивирования.

Материал и методика

Для выделения клеток из крайней плоти использовали донорский материал от 2-х здоровых детей в возрасте 2.5 года, предоставленный детской клиникой «Baby» с разрешения родителей пациентов и при получении от них информированного согласия.

Выделение клеток из кусочка кожи проводили ферментативным методом. Для этого фрагмент кожи, доставленный из клиники в транспортной среде (20 мл культуральной среды IMDM (Invitrogen, США) и 200 мкл антибиотика-антимикотика (Gibco, США)), тщательно отмывали от крови в PBS без Ca^{2+} и Mg^{2+} (Биолот, Россия), отделяли дерму от эпидермиса, а затем разрезали на фрагменты объемом 1 мм³ с помощью стерильных ножниц. Затем измельченную ткань инкубировали в 0.1%-ном растворе коллагеназы I типа (Gibco, США) при 37 °C в течение 30 мин на шейкере, инактивируя действие фермента добавлением эмбриональной бычьей сыворотки (FBS; Hyclone, США). Полученную суспензию клеток центрифугировали, осадок промывали в PBS, ресуспендировали в среде IMDM, содержащей 10 % FBS. Далее единичные клетки переносили в чашки, инкубировали с FBS в течение 1 ч при 37 °C и затем высушивали. Прикрепившиеся клетки культивировали, меняя среду каждые 2—3 сут, до образования монослоя.

Две полученные клеточные линии постоянно культивировали в условиях 5 % CO₂, при 37 °C и 90 % влажности. Криоконсервацию полученных клеточных линий проводили в кондиционированной среде, содержащей 5 % криопротектора диметилсульфоксида (DMSO; Биолот, Россия). Полученные фибробластоподобные линии назвали FRSN-1 и FRSN-2.

Морфологический анализ линий проводили с помощью инвертированного микроскопа (NICON, Япония).

Репликативное старение клеток оценивали по активности фермента β -галактозидазы. Клетки линий FRSN-1 и FRSN-2 выращивали в 3.5-сантиметровых чашках Петри до образования конfluence. 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, 20 и 26-м пассажах для обеих линий. Долю окрашенных клеток (%) определяли путем подсчета не менее 500 клеток в разных полях зрения на одну временную точку.

Эффективность клонирования клеточных линий определяли в чашках Петри в условиях редкого пассажа (3—4 кл./см²). Через 14 сут клетки окрашивали 1%-ным водным раствором кристалл-виолета и на чашках Петри 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 3 повторности.

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 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 пассажах 6, 20 и 26 для обеих линий.

Кариотипический анализ проводили на 6-м пассаже. Для получения препаратов метафазных хромосом за 2 ч до фиксации клеток в среду вводили Кагуо-МАХ (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 КСl и 1%-ного раствора цитрата натрия. Клетки фиксировали смесью метанола с ледяной уксусной кислотой (3 : 1) (Реактив, Россия). Для количественного кариотипического анализа метафазных пластинок хромосомы окрашивали водным раствором Гимза (1 : 50) (Sigma, Германия). Модальное число хромосом и пределы изменчивости клеток по числу хромосом для каждой линии определяли при анализе 100 метафаз; долю полиплоидных клеток определяли при анализе 1000 метафаз.

Для структурного кариотипического анализа проводили дифференциальное G-окрашивание хромосом в соответствии с ранее описанной методикой (Ozkinay, Mitelman, 1979). Анализировали 100 метафаз для каждой линии. Кариотип 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 пассаже. Иммунофенотипирование проводили с помощью панели конъюгатов CD-маркерных моноклональных антител с флуорохромами. В работе использовали моноклональные антитела против CD34, CD45, HLA ABC и HLA DR (Caltac, США), CD44, CD73, CD105 (Beckman Coulter, США) и CD90 (BD Pharmingen, США). В качестве негативного контроля использовали очищенные мышьиные антитела IgG1/Fitc и IgG1/RFE (ДАКО, 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 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 °С в течение 30 мин. Далее пробы доводили до оптимального объема (0.3—0.4 мл) с помощью Stain Buffer (BD Pharmingen, США).

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 тубулину (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 и 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 °С. 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 обеих линий.

Для количественной оценки маркеров недифференцированных ЭСК SSEA-4 (Santa Cruz, США) и SOX-2 (Sigma, Германия) использовали 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 микромаст в хондрогенной дифференцировочной среде (HyClone Thermo Scientific HyClone Product, США). Индукцию проводили в течение 3 нед, меняя среду каждые 3—4 сут.

Показателем остеогенной дифференцировки и служили соли кальция во внеклеточном матриксе, выявляемые с помощью реакции Van Kossa. Для этого клетки фиксировали 2 мин в метаноле при –20 °С 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.

Сульфатированные гликозаминогликаны при хондрогенной дифференцировке идентифицировали по окраске 1%-ным раствором толуидинового синего в 50%-ном изопропанол (MP Biomedicals, США). Время окраски составляло 30 мин при комнатной температуре.

Для выявления адипогенной дифференцировки клетки промывали PBS без ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} и фиксировали в метаноле в течение 2 мин при –20 °С. 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.

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

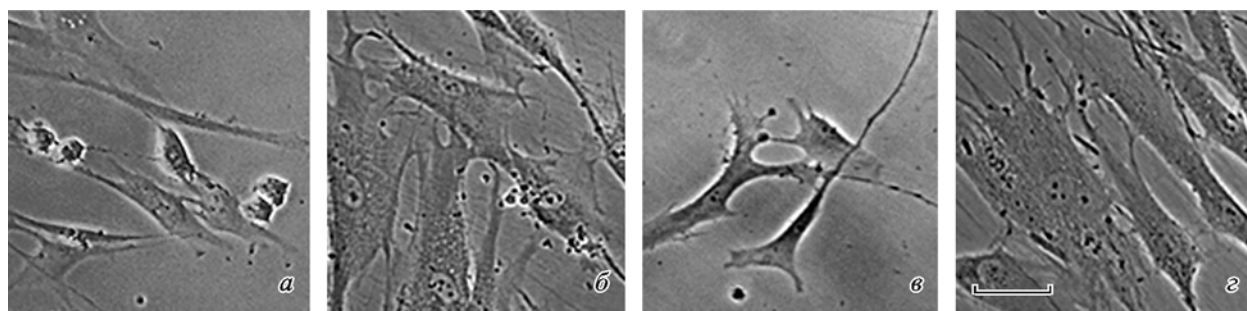


Рис. 1. Прижизненные фотографии клеток линий FRSN-1 (а, б) и FRSN-2 (в, з) на 6-м и 26-м пассажах.
Масштабные отрезки — 50 мкм.

Результаты и обсуждение

В результате культивирования в течение 6 пассажей были получены линии фибробластоподобных клеток, которые назвали согласно источнику их получения из крайней плоти двух доноров одного возраста FRSN-1 и FRSN-2. Морфологический анализ этих линий показал однородность клеточных популяций со средними по размеру вытянутыми фибробластоподобными клетками (рис. 1).

Анализ репликативного старения клеток по активности β -галактозидазы показал межлинейные различия по характеру этого процесса, несмотря на то, что сам процесс имеет место в обеих линиях (табл. 1). Так, в линии FRSN-1 на 6-м пассаже старение незначительно, тогда как в линии FRSN-2 на 6-м пассаже частота стареющих клеток уже большая ($P < 0.01$). Но при продолжении культивирования до 20-го пассажа в клетках FRSN-1 активность β -галактозидазы увеличивается ($P < 0.01$), а в клетках FRSN-2 она остается на неизменном уровне по сравнению с пассажем 6 ($P < 0.05$). А далее, к 26-му пассажу, активность β -галактозидазы увеличивается в клетках обеих линий, что говорит об усилении процесса репликативного старения (табл. 1).

В обеих линиях на 26-м пассаже существенно изменяется и морфология клеток, выражающаяся в увеличении размеров и степени их расплывчатости и свидетельствующая о наступлении репликативного старения (рис. 1).

Ростовые характеристики определяли двумя методами — по эффективности клонирования и по кривым роста с определением среднего времени удвоения клеточных популяций. Эффективность клонирования клеток FRSN-1 и FRSN-2 на 6-м пассаже различается и составляет соответственно 25.1 ± 1.3 и 2.5 ± 0.1 %. На

26-м пассаже эффективность клонирования в клетках FRSN-1 значительно снижена (до 3.9 ± 0.1 %), а клетки FRSN-2 совсем теряют эту способность. Снижение клоногенной активности в процессе культивирования показано и другими авторами на МСК костного мозга человека (Lo Surdo et al., 2013). Эффективность клонирования различается и между линиями МСК разного происхождения (Крылова и др., 2016, 2017; Szepesi et al., 2016). Но подчеркнем, что при сравнении эффективности клонирования разных линий МСК необходимо учитывать первоначальную плотность посева клеток на культуральный сосуд, от которой зависит уровень пролиферативной активности (Kim et al., 2017), а также возможное влияние метаболитических продуктов, секретируемых клетками, и клеточную миграцию, свойственную МСК. В связи с этим для строгой оценки клоногенной активности необходимо использовать посев единичных клеток с использованием 96-луночных плат (Sarugaser et al., 2009; Ali et al., 2015).

Результаты по характеристике пролиферативной активности при длительном культивировании свидетельствуют об активном делении клеток на 6-м пассаже в обеих линиях (рис. 2). Анализ кривых роста показал, что время активной (логарифмической) фазы роста для клеток FRSN-1 и FRSN-2 одинаково и составляет 96 ч. Среднее время удвоения клеточных популяций статистически не различается между линиями FRSN-1 и FRSN-2 и составляет 36.9 ± 0.2 и 39.0 ± 0.8 ч соответственно. Таким образом, пассаж 6, на котором анализировали характеристики МСК, соответствует 16–17 удвоениям клеточных популяций.

Анализ кривых роста обеих линий на позднем пассаже, когда идут процессы репликативного старения, показал снижение пролиферативной активности. Среднее вре-

Таблица 1

Динамика активности β -галактозидазы в процессе культивирования клеток двух линий

Пассаж	Клетки FRSN-1		Клетки FRSN-2	
	число клеток	доля окрашенных на β -гал, %	число клеток	доля окрашенных на β -гал, %
6-й	500	9.0 ± 1.3	610	16.2 ± 1.5
20-й	530	21.4 ± 1.8	500	19.3 ± 1.8
26-й	500	40.0 ± 2.2	600	45.0 ± 2.0

Примечание. Даны средние значения и их ошибки при подсчете не менее 500 клеток в нескольких полях зрения на одну временную точку. β -гал — β -галактозидаза.

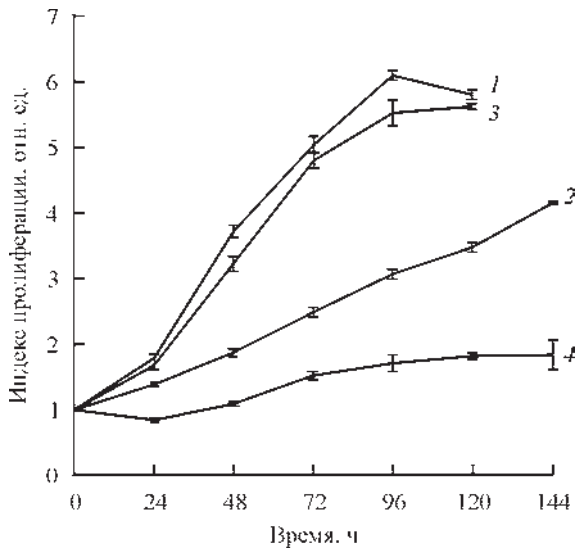


Рис. 2. Кривые роста клеток линий FRSN-1 (1, 2) и FRSN-2 (3, 4) на разных пассажах — 6-м (кривые 1, 3) и 26-м (кривые 2, 4).

мя удвоения клеточных популяций существенно увеличивается в обеих линиях по сравнению с предыдущим сроком и различается между линиями на 26-м пассаже: 58.5 ± 0.2 (FRSN-1) и 81.3 ± 6.6 (FRSN-2) ч ($P < 0.01$). Увеличение времени удвоения при длительном культивировании ранее было показано и нами, и другими авторами (García et al., 2016; Кольцова и др., 2017; De Witte et al., 2017). По характеру кривых роста на 26-м пассаже клетки также существенно различаются (рис. 2). Так, время логарифмической фазы роста клеток FRSN-1 составило 120 ч. При этом на протяжении всего срока культивирования наблюдается небольшое, но достоверно значимое увеличение индекса пролиферации (ИП), хотя на протяжении 144 ч культивирования ИП не выходит на плато. Но на 29-м пассаже ИП резко снижается на всех анализируемых сроках, и через 144 ч пролиферация останавливается (не показано). Кроме того, присутствуют явные признаки старения клеточной популяции, о чем свидетельствуют результаты табл. 1, а также существенное увеличение размера клеток, их расплывчатости и наличие дегенерации (рис. 1). Кроме того, уменьшается и значение максимального ИП на 26-м пассаже по сравнению с пассажем 6 ($P < 0.01$) и резко снижается клоногенная активность. Другая картина наблюдается при анализе кривой роста линии FRSN-2. Так, время логарифмической фазы составило 48 ч (рис. 2). После культивирования клеток в течение 72 ч кривая роста выходит на плато, где и сохраняется до 144 ч. Имеет место низкий ИП на протяжении всего срока культивирования по сравнению с ростом клеток на 6-м пассаже. Признаки старения клеток FRSN-2 совпадают с вышеперечисленными признаками для клеток FRSN-1. Результаты свидетельствуют о том, что, несмотря на один и тот же источник выделения МСК и одинаковый возраст доноров, характер процесса репликативного старения разный, и это, по-видимому, связано с его генетической детерминированностью, определяющей наблюдаемые различия между донорами. Но в целом полученные результаты подтверждают ограниченный срок жизни клеток линий FRSN-1 и FRSN-2, характерный для неиммортизированных клеточных популяций (Hayflick, 1965; Matsumura et al., 1979; Bonab et al., 2006).

Количественный кариотипический анализ линий FRSN-1 и FRSN-2 показал, что они характеризуются одинаковой высокой частотой клеток с модальным числом хромосом, равным $46 (98.0 \pm 1.4)$ и 94.0 ± 2.3 % соответственно. Доля полиплоидных клеток у двух линий разная и составляет 6.4 ± 0.8 и 10.5 ± 1.0 % соответственно, т. е. полиплоиды среди клеток FRSN-2 встречаются чаще, чем среди клеток FRSN-1 ($P < 0.01$). Но в обоих случаях частота встречаемости полиплоидов выше, чем в других линиях МСК, полученных нами из разных источников. Исключение составляет только еще одна линия FRSN, полученная нами ранее и имеющая 13.0 % полиплоидов (Крылова, и др., 2012).

Структурный кариотипический анализ показал, что обе линии имеют нормальный кариотип человека — 46, XY (рис. 3). Анализ 100 метафазных пластинок не выявил значительных различий между линиями по кариотипической стабильности. Так, в линии FRSN-1 в 100 проанализированных клетках выявлены две структурные аномалии в разных клетках: 1) в одной клетке FRSN-1 обнаружено 47 хромосом за счет дополнительной неидентифицированной маркерной хромосомы (mar); 2) в другой клетке с числом хромосом 46 выявлена структурная перестройка хромосомы 10: $der(10)add(10)(p12)add(10)(q22)$. В линии FRSN-2 в 100 клетках обнаружено 7 структурных хромосомных перестроек. Так, в одной клетке выявлены перестройки хромосом 5 и 20: $del(5)(q12)$ и $der(20)(20pter \rightarrow 20q13.3::?:5q13 \rightarrow 5qter)$; в двух клетках обнаружены разные перестройки с вовлечением короткого плеча хромосомы 11: $add(11)(p15)$ и $add(11)(p11.2)$; в трех клетках — перестройки хромосомы 12, одна из которых с вовлечением короткого плеча встретилась в двух клетках: $add(12)(p13)$, в третьей клетке в перестройке участвовали оба гомолога хромосомы 12 с образованием $der(12)t(12;12)(p13;q15)$ и $del(12)(q15)$. Таким образом, перестройки хромосом в клеточных линиях FRSN-1 и FRSN-2 характеризовались появлением дополнительного неидентифицированного хромосомного материала, который присутствовал либо в составе структурно перестроенных хромосом, либо в виде маркерной хромосомы в кариотипе линии FRSN-1.

Частота хромосомных аномалий в клетках FRSN-1 составляет 2.0 ± 1.4 , а в клетках FRSN-2 — 7.0 ± 2.5 %. Достоверных различий по частоте хромосомных перестроек не выявлено. Все обнаруженные хромосомные перестройки носят неклональный характер, за исключением одной аномалии в линии FRSN-2, встреченной в двух клетках. Но с учетом общего объема просмотренных метафаз частота этой неклональной перестройки составляет 2 ± 1.4 %. Следует подчеркнуть, что Международное общество клеточной терапии и Рабочая группа по клеточным продуктам рекомендуют исключать клеточные культуры, имеющие 10 % клональных хромосомных нарушений и более 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.

Для подтверждения статуса МСК полученных линий FRSN-1 и FRSN-2 провели сравнительный анализ поверхностных маркеров, характерных для МСК, с помощью проточной цитофлуориметрии. Анализ подтвердил наличие статуса МСК для обеих линий и отсут-

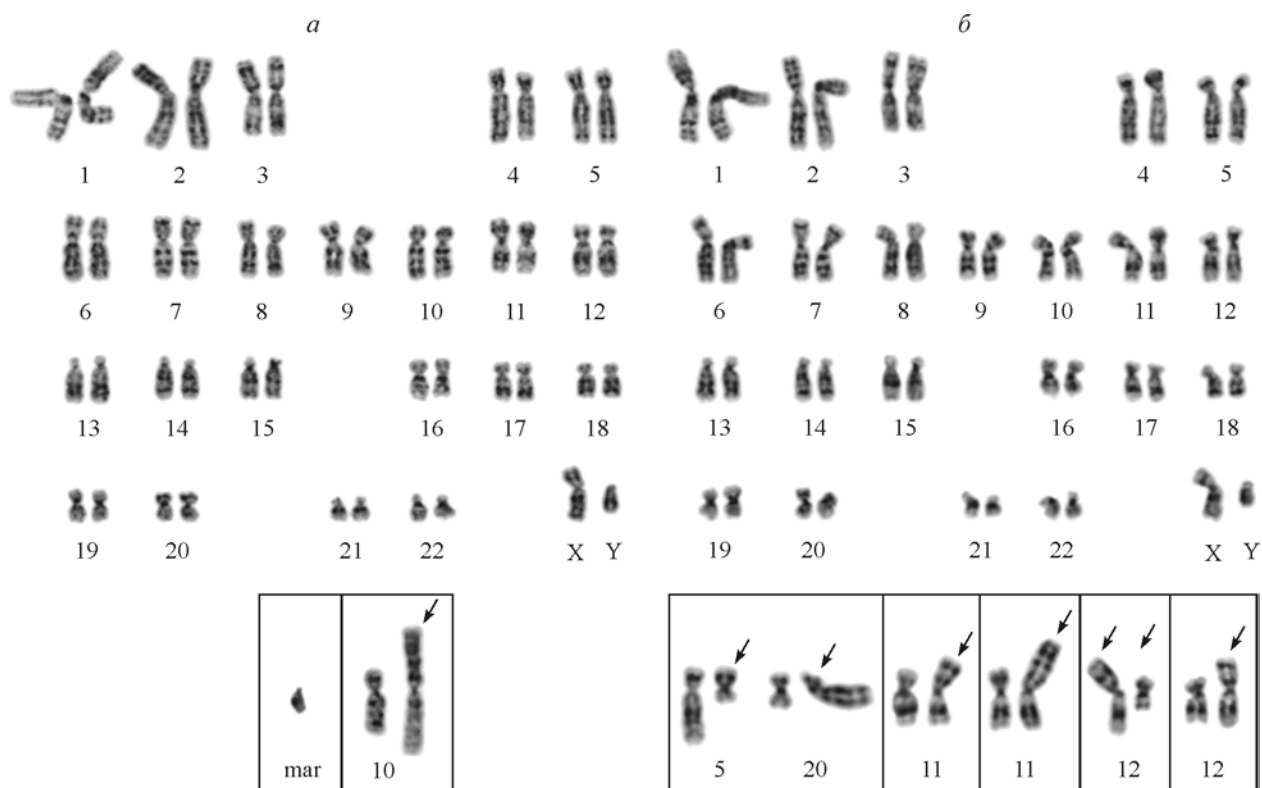


Рис. 3. Кариотипы клеточных линий FRSN-1 (а) и FRSN-2 (б); 46, XY. 6-й пассаж.

а, *врезка* — дополнительная неидентифицированная хромосома — *mar* — в клетке с числом хромосом 47; структурно перестроенная хромосома 10 (*стрелка*) $der(10)(?:p12 \rightarrow q22::?)$. б, *врезка* — структурно перестроенные хромосомы (*стрелки*), обнаруженные в отдельных клетках: $del(5)(pter \rightarrow q12::)$ и $der(20)(20pter \rightarrow 20q13.3::?:5q13 \rightarrow 5qter)$; $add(11)(?:p15 \rightarrow qter)$; $add(11)(?:p11.2 \rightarrow qter)$; $der(12)(12qter \rightarrow 12q15::12p13 \rightarrow 12qter)$ и $del(12)(pter \rightarrow q15::)$; $add(12)(?:p13 \rightarrow qter)$.

ствие существенных различий между ними по основным маркерам МСК (табл. 2). Из представленных результатов следует наличие экспрессии поверхностных антигенов, характерных для МСК человека: CD44, CD73, CD90 и CD105. Выявлено отсутствие или низкая частота экспрессии антигенов CD34, CD45 и HLA DR. Таким образом, согласно требованиям Международного общества клеточной терапии (Dominici et al, 2006; Sensebe et al., 2010) для линий FRSN-1 и FRSN-2 подтвержден статус МСК.

С помощью иммунофлуоресцентного анализа показано отсутствие экспрессии транскрипционного фактора Oct-4 (данные не представлены). С помощью проточной цитометрии в обеих линиях обнаружена экспрессия маркеров ранней дифференцировки ЭСК — SSEA-4 и SOX-2 (табл. 2). К настоящему времени получено много экспериментальных данных, подтверждающих наличие экспрессии маркеров ЭСК в разных линиях МСК. Но пока эти данные находятся на этапе накопления без серьезных попыток обобщения. Так, показано, что МСК, выделенные из костного мозга и экспрессирующие SSEA-4, имеют более высокую пролиферативную активность, чем МСК, не экспрессирующие этот маркер (Gang et al., 2007). При изучении сигнальных путей показано, что фактор SOX-2 активно участвует в процессах пролиферации и дифференцировки МСК, выделенных как из эмбриональных, так и из взрослых тканей (Park et al., 2012). Наличие экспрессии маркеров недифференцированных ЭСК в МСК разного происхождения, возможно, объясняет их расширенный мультипотентный дифференцировочный потенциал (Wu et al., 2013).

Тем не менее не выявлено зависимости наличия экспрессии этих маркеров от стадии онтогенеза, в которой находится источник получения МСК. Есть расхождения по экспрессии этих маркеров в процессе длительного культивирования. В частности, из наших предыдущих результатов следует, что в клетках линий MSCWJ-1 и MSCWJ-2

Таблица 2

Экспрессия (%) поверхностных маркеров в клетках двух линий

Маркер	Доля клеток, несущих маркер, %	
	FRSN-1	FRSN-2
CD44	99.27 ± 0.40	99.82 ± 0.05
CD73	99.04 ± 0.10	99.62 ± 0.06
CD90	99.00 ± 0.23	99.82 ± 0.05
CD105	94.93 ± 2.55	99.83 ± 0.09
CD34	0.54 ± 0.12	0.90 ± 0.25
CD45	0.85 ± 0.39	1.79 ± 0.94
HLA ABC	83.99 ± 5.52	99.95 ± 0.01
HLA DR	0.80 ± 0.17	0.05 ± 0.01
SSEA-4	38.96 ± 5.22	32.73 ± 3.62
SOX-2	50.30 ± 9.98	44.83 ± 1.60

Примечание. Даны средние значения и их ошибки из 3—4 экспериментов.

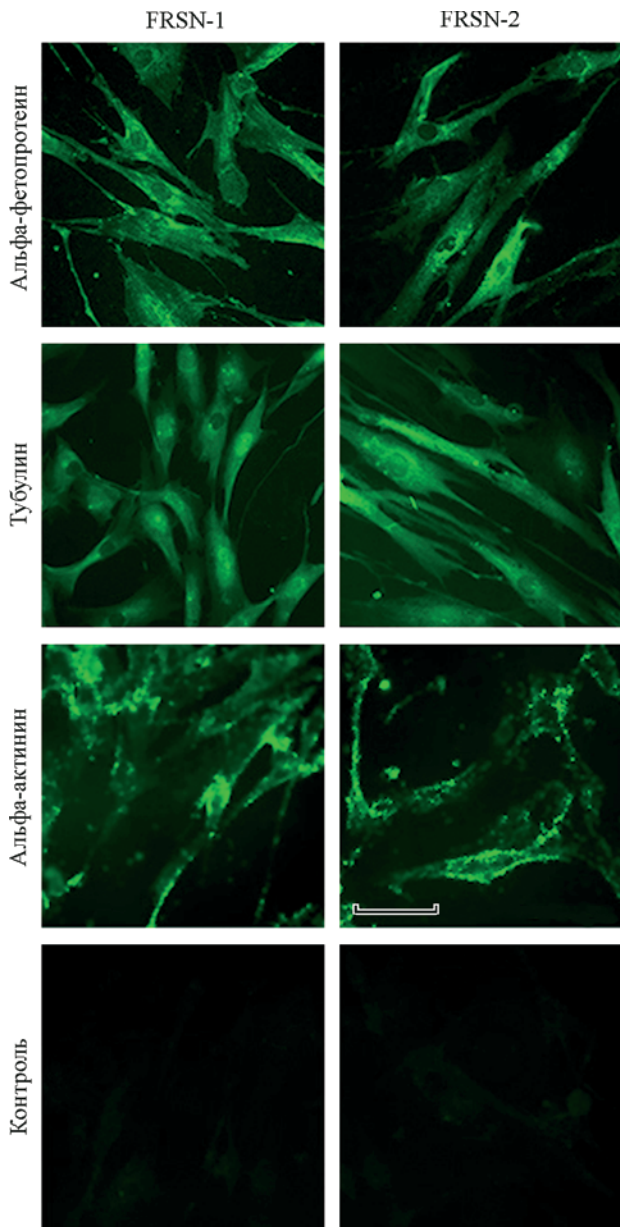


Рис. 4. Маркеры ранней дифференцировки ЭСК в клетках линий FRSN-1 и FRSN-2. Флуоресценция соответствующих моноклональных антител.

Показаны маркеры энтодермы альфа-фетопрогеина, маркер эктодермы тубулин и маркер мезодермы альфа-актинина.
Масштабные отрезки — 50 мкм.

(источник МСК — Вартонов студень пупочного канатика) на 6-м пассаже экспрессируются SSEA-4 и SOX-2, а на поздних пассажах их экспрессия снижается только в клетках MSCWJ-2 с активным старением (80 %), но не снижается в клетках MSCWJ-1 с менее активным старением (58 %) (Кольцова и др., 2017). В настоящем исследовании уровень экспрессии SSEA-4 на 26-м пассаже составляет 46.5 ± 7.5 и 28.2 ± 3.9 % для FRSN-1 и FRSN-2 соответственно. Эти данные статистически не отличаются от показателей, полученных на 6-м пассаже (табл. 2). При этом стареющие клетки в этих линиях на 26-м пассаже составляют 40.0 ± 2.2 и 45.0 ± 2.0 % соответственно. Возможно, что наблюдаемое снижение активности SSEA-4 в клетках MSCWJ-2 связано с вы-

сокой интенсивностью процесса репликативного старения.

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-фетопрогеин (маркер энтодермы) и тубулин (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; Кольцова и др., 2015). Механизмы взаимосвязи маркеров ранней дифференцировки с функциональной деятельностью МСК пока неизвестны. Есть разные предположения противоположного характера: 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 FRSN-1 и FRSN-2 выявила их способность формировать жировую, костную и хрящевую ткани (рис. 5), что соответствует статусу МСК (Dominici et al., 2006; Sensebe et al., 2010). Культивирование клеток в адипогенной среде способствовало образованию кластеров адипоцитов, показанных с помощью окрашивания красителем масляным красным (Oil Red O). Культивирование клеток в остеогенной среде способствовало формированию минеральных комплексов, идентифицированных с помощью реакции Van Kossa, выявляющей нерастворимые соли кальция в межклеточном пространстве. Культивирование клеток в хондрогенной среде привело к образованию сульфатированных гликозаминогликанов, которые выявлены с помощью окрашивания толуидиновым синим.

На 6-м пассаже не обнаружено различий между линиями по дифференцировочному потенциалу в исследованных направлениях. Тем не менее в обеих линиях уже на 20-м пассаже значительно уменьшается интенсивность дифференцировки в адипогенном направлении. Следует отметить, что на этом пассаже еще нет активного старения, но его признаки уже есть, судя по активности β -галактазидазы (табл. 1). Пролiferативная активность клеток обеих линий на 20-м пассаже такая же, как на пассаже 6. Ранее нами были обнаружены различия по интенсивности адипогенной дифференцировки между двумя линиями, полученными от одного донора, но из разных тканей (Крылова и др., 2014). Нами показаны различия по интенсивности остеогенной дифференцировки между МСК из кожи век разных доноров: в МСК от более старого донора (53 года, линия DF-3) она меньше, чем в МСК от более молодых доноров (линии DF-1 и DF-2) (Крылова и др., 2016). Также нами показано нарушение остеогенной и адипогенной дифференцировки на поздних пассажах в двух линиях МСК (MSCWJ-1 и MSCWJ-2), полученных из Вартонова студня пупочного канатика человека (Кольцова и др., 2017). В этой работе было обнаружено отсутствие хондрогенной дифференцировки у клеток MSCWJ-2 с ранним активным репликативным старением. Зависимость дифференцировочного потенциала от длительности культивирования МСК наблюдали и другие авторы (Park et al., 2005; Bonab et al., 2006; Lo Surdo et al., 2013; Bianchi et al., 2017). По-видимому, снижение дифференцировочного потенциала МСК может иметь разные

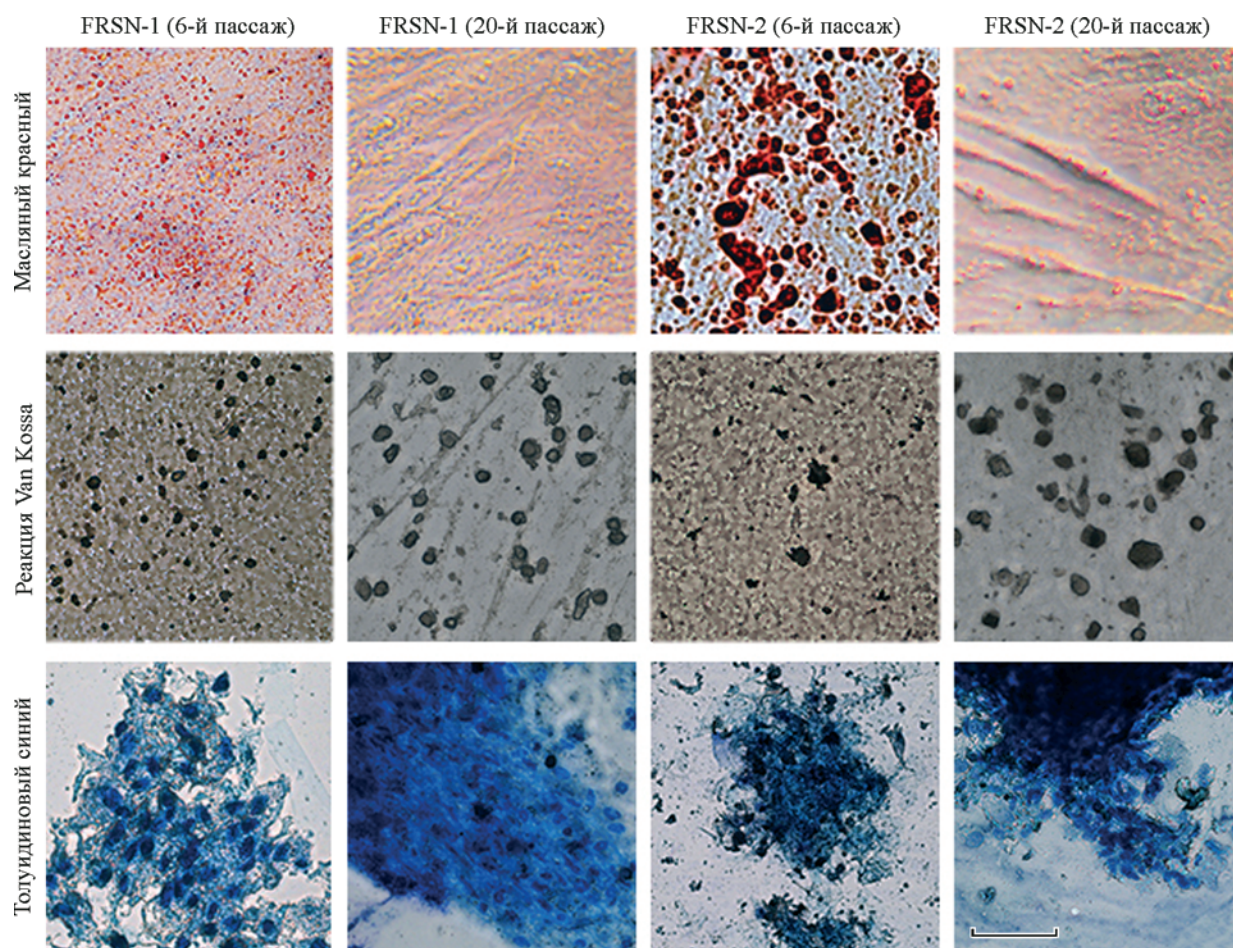


Рис. 5. Дифференцировка клеток линий FRSN-1 и FRSN-2 в адипогенном (окрашивание жировых включений масляным красным), остеогенном (реакция Van Kossa, выявляющая нерастворимые соли кальция в межклеточном пространстве) и в хондрогенном направлении (окрашивание толуидиновым синим — ТС — сульфатированных гликозаминогликанов) при длительном культивировании.

Масштабные отрезки: 25 (масляный красной) и 50 (реакция Van Kossa и ТС) мкм.

причины, но, безусловно, репликативное старение клеток вносит существенный вклад в это явление.

В целом полученные в настоящей работе результаты свидетельствуют о существовании ряда различий в клеточных линиях, полученных из одинаковой ткани доноров одного возраста, по ростовым характеристикам и характеру репликативного старения клеток. Эти различия могут быть обусловлены как непосредственным генетическим влиянием на механизмы пролиферативной активности и репликативного старения в клетках от генетически разных доноров, так и опосредованно — разным микроокружением клеток еще до выделения их из организма, которое детерминирует их свойства.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы развития биоресурсных коллекций ФАНО по государственному заданию № 0124-2017-0004.

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.)

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 студня 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' 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 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 неиммортизированных 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.)
- 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.* 7 (2). URL: <http://www.smolensk.ru/user/sgma/mmorph/n-18-html/cont.htm>.)
- 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. eCollection 2015.
- 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.
- Araújo A. B., Salton G. D., Furlan J. M., Schneider N., Angeli M. H., Laureano A. M., Silla L., Passos E. P., Paz A. H. 2017. Comparison of human mesenchymal stromal cells from four neonatal tissues: amniotic membrane, chorionic membrane, placental decidua and umbilical cord. *Cytotherapy*. 19 : 577—585.
- Barkholt L., Flory E., Jekerle V., Lucas-Samuel S., Ahnert P., Bisset L., Büscher D., Fibbe W., Foussat A., Kwa M., Lantz O., Mačiulaitis 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.
- Bernardo M. E., Zaffaroni N., Novara F., Cometa A. M., Avanzini M. A., Moretta A., Montagna D., Maccario R., Villa R., Daidone M. G., Zuffardi O., Locatelli F. 2007. Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term *in vitro* culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res*. 67 : 9142—9149.
- 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.
- 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.
- 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 : 798—807.
- Dizaji Asl K., Shafaei H., Soleimani Rad J., Nozad H. O. 2017. Comparison of characteristics of human amniotic membrane and human adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *World J. Plast. Surg.* 6 : 33—39.
- 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. Cytotherapy*. 8 : 315—317.
- Estrada J. C., Torres Y., Benguria A., Dopazo A., Roche E., Carrera-Quintanar L., Pérez R. A., Enriquez J. A., Torres R., Ramírez J. C., Samper E., Bernad A. 2013. Human mesenchymal stem cell-replicative senescence and oxidative stress are closely linked to aneuploidy. *Cell Death Dis.* 4 : e691. Doi: 10.1038/cddis.2013.211.
- 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.
- Hayflick L. 1965. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 37 : 614—636.
- 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.
- Kao S. Y., Shyu J. F., Wang H. S., Lin C. H., Su C. H., Chen T. H., Wong Z. C., Tsai P. J. 2015. Comparisons of differentiation potential in human mesenchymal stem cells from Wharton's jelly, bone marrow, and pancreatic tissues. *Stem Cells Int.* 2015 : 306158. Doi: 10.1155/2015/306158.
- 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.
- Kuilman T., Michaloglou C., Mooi W. J., Peeper D. S. 2010. The essence of senescence. *Genes Develop.* 24 : 2463—2479.
- Lee N. E., Kim S. J., Yang S. J., Joo S. Y., Park H., Lee K. W., Yang H. M., Park J. B. 2016. Comparative characterization of mesenchymal stromal cells from multiple abdominal adipose tissues and enrichment of angiogenic ability via CD146 molecule. *Cytotherapy*. 19 : 170—180.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Portalska K. J., Groen N., Krenning G., Georgi N., Mentink A., Harmsen M. C., van Blitterswijk C., de Boer J. 2013. The effect of donor variation and senescence on endothelial differentiation of human mesenchymal stromal cells. *Tissue Eng. Part A.* 19 : 2318—2329.
- 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. 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.
- 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., Navakasikiene R. 2016. Senescence-associated molecular and epigenetic alterations in mesenchymal stem cell cultures from amniotic fluid of normal and fetus-affected pregnancy. *Stem Cells Int.* 2016 : 2019498.
- Sensebé L., Krampera M., Schrezenmeier H., Bourin P., Giordano R. 2010. Mesenchymal stem cells for clinical application. *Vox Sang.* 98 : 93—107.
- Shaffer I. G., Slovak M. L., Campbell L. J. (Eds). 2009. An international system for human cytogenetic nomenclature. Basel: S. Karger. 138 p.
- 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. *Cytotherapy.* 18 : 336—343.
- 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.
- 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.
- 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.
- Xu L., Zhou J., Liu J., Liu Y., Wang L., Jiang R., Diao Z., Yan G., Peault B., Sun H., Ding L. 2017. Different angiogenic potentials of mesenchymal stem cells derived from umbilical artery, umbilical vein, and Wharton's jelly. *Stem Cells Int.* 2017 : 3175748. Doi: 10.1155/2017/3175748.

Поступила 1 XII 2017

THE DERIVATION AND COMPARATIVE CHARACTERIZATION
OF MESENCHYMAL STEM CELL LINES ISOLATED
FROM THE FORESKIN OF TWO DONORS OF THE SAME AGE

T. A. Krylova, A. S. Musorina, 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

Two new non-immortalized human cell lines were generated from foreskin of two donors of the same age — 2.5 years, called FRSN-1 and FRSN-2. Growth characteristics and differentiation potential of these cell lines were studied on the 6th passage, and their status as mesenchymal stem cells was confirmed. Some of characteristics analyzed during long-term cultivation up to the 26th passage. The start time and the dynamics of the process of replicative senescence that were defined with the use of the activity of β -galactosidase differ between the lines. However, the replicative senescence process is equally enhanced to the 26th passage in both lines. The plating efficiency significantly differ between the lines on the 6th passage it is significantly higher in FRSN-1 than FRSN-2. The plating efficiency decreases significantly on the 26th passage in FRSN-1, and cells of the line FRSN-2 lose this ability. Growth curves show the active proliferation of these lines on the 6th passage. The average doubling time did not differ between the lines and is 36.9 and 39 hours respectively. Analysis of growth curves on the 26th passage indicates a decline in proliferative activity and the increase in the average doubling time of cell populations in both lines; but in the line FRSN-2 it is much more than in the FRSN-1. The of growth curves structure differ significantly between the lines. Morphological analysis reveals changes that are typical for the phase of senescence and that are associated with increasing cell size and the degree of their spreading. Numerical and structural karyotypic analyses on the 6th passage show that both lines have normal karyotype of 46, XY and do not have significant interline differences in the frequency of chromosomal aberrations. To determine status of these cell lines, comparative analysis of the surface markers was performed using flow cytometry. Analysis has revealed that cells of both lines express the surface antigens characteristic of human MSC: CD44, CD73, CD90, CD105, HLA-ABC; they do not express CD34, CD45 and HLA-DR. Flow cytometry analysis showed the expression markers of non-differentiated ESC — SSEA-4 and SOX2 in both lines. The expression of SSEA-4 is also present on the 26th passage in both lines. The expression of markers of early differentiation ESC in the derivatives of 3 germ layers was shown for cells of FRSN-1 and FRSN-2 lines. Capability of these cell lines to differentiate to osteogenic, chondrogenic and adipogenic directions is shown on the 6th passage.

Both lines showed a significant reduction in the adipogenic potential on the 20th passage. These data indicate that adipogenic differentiation potential changes even at an the average degree of replicative senescence in contrast to the growth characteristics. Apparently, replicative senescence of cells makes a significant contribution to the change in differentiation potential of MSC. Overall, the results indicate the existence of some differences in derived from different donors cell lines that manifest in the growth characteristics and the nature of the replicative senescence of cells. These differences may be caused by a direct genetic influence on the mechanisms of the proliferative activity and replicative senescence in cell lines from genetically different donors and by indirect influence of different microenvironment, which determined the properties of the cells before the selection of their donor organisms.

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