

ПОЛУЧЕНИЕ И СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИНИЙ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПУЛЬПЫ МОЛОЧНОГО ЗУБА ДЕТЕЙ РАЗНОГО ПОЛА

© 2023 г. А. С. Мусорина¹, *, В. И. Турилова¹, А. Н. Шатрова¹, Т. К. Яковлева¹, Г. Г. Полянская¹, **

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: anam18@inbox.ru

**E-mail: gpolanskaya@gmail.com

Поступила в редакцию 01.06.2023 г.

После доработки 27.06.2023 г.

Принята к публикации 28.06.2023 г.

Получены и охарактеризованы 2 новые неиммортиализованные фибробластоподобные клеточные линии (MSC-DP-1 и MSC-DP-2), выделенные из пульпы молочных зубов двух разнополых 6-летних детей. С целью подтверждения статуса мезенхимных стволовых клеток был проведен сравнительный анализ ряда характеристик этих линий на ранних и поздних пассажах. В процессе длительного культивирования выявлены существенные межлинейные различия по характеру репликативного старения (РС) и по ростовым характеристикам. Линия MSC-DP-1 характеризовалась более поздним вхождением в активную стадию РС и более активной пролиферацией по сравнению с линией MSC-DP-2. Кариотипический анализ показал, что обе линии на ранних пассажах имеют нормальный диплоидный кариотип человека. На позднем (18-м пассаже) в стадии активного РС линия MSC-DP-2 сохраняет нормальный кариотип. А линия MSC-DP-1, которая вступает в активную стадию РС гораздо позже (на 42-м пассаже), имеет аномальный кариотип с большим количеством клональных и неклональных хромосомных перестроек. Показана в обеих линиях высокая доля клеток, несущих поверхностные антигены, характерные для МСК человека: CD44, CD73, CD90, CD105, HLA-ABC, и низкая частота клеток с антигенами CD34, CD45 и HLA-DR. Клетки полученных линий на раннем пассаже обладают способностью дифференцироваться в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях. Но линия MSC-DP-2 проявляет более слабую дифференцировку в адипогенном направлении, чем линия MSC-DP-1. В процессе РС в линии MSC-DP-1 имеет место значительное ослабление адипогенной дифференцировки, а в линии MSC-DP-2 она исчезает. Активность остальных дифференцировок не изменяется в процессе РС. В целом, полученные результаты подтверждают статус МСК для полученных линий и свидетельствуют о межлинейных различиях в процессе РС. Тем не менее проведенное сравнение с ранее полученной линией – MSC-DP не свидетельствуют о гендерной природе наблюдаемых различий между этими линиями. По-видимому, они связаны с генетическими особенностями разных доноров.

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки человека, репликативное старение, пролиферативная активность, поверхностные клеточные маркеры, кариотип, дифференцировка

DOI: 10.31857/S0041377123050061, **EDN:** KJQHDE

В настоящее время значительно расширяется использование мезенхимных стволовых клеток (МСК) человека различного происхождения как для фундаментальных исследований клеточных процессов, так и для биомедицинских исследований, связанных с широким спектром заболеваний (Liu et al., 2020; Кольцова и др., 2020, 2022; Hezan et al., 2022; Hoang et al., 2022; Jayasinghe et al., 2022; Navarro et al., 2022; Pischitta et al., 2022; Rahmani-Moghadam et al., 2022; Sharma et al., 2022; Tesiye et al., 2022; Yang et al., 2022;

Zhang et al., 2022; Chen et al., 2023; Hatore et al., 2023; Mou et al., 2023; Sousa et al., 2023 Turano et al., 2023).

Согласно требованиям Международного общества клеточной терапии, статус МСК, полученных из любых источников, определяется рядом обязательных характеристик: адгезивностью к культуральному пластику; активной пролиферацией; экспрессией определенной панели поверхностных антигенов или маркеров (CD44, CD73, CD90, CD105 и HLA-ABC) и отсутствием экспрессии антигенов, нехарактерных для МСК: CD34, CD45 и HLA-DR; способностью к дифференцировке в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях; нормальным кариотипом человека, согласно установ-

Принятые сокращения: ДХ – дицентрическая хромосома; ИП – индекс пролиферации; ИФА – иммунофлуоресцентный анализ; МСК – мезенхимные стволовые клетки; РС – репликативное старение; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки.

ленным критериям (Dominici et al., 2006; Sensebé et al., 2010; Barkholt et al., 2013).

В настоящее время проводится широкий спектр сравнительных исследований характеристик МСК человека, выделенных из разных источников. Эти источники включают, в частности, разные ткани одного донора, одинаковые ткани разной локализации одного донора, одинаковые ткани разных доноров, различающихся возрастом, полом и другими особенностями. Такие исследования необходимы как для углубления знаний о механизмах биологических процессов в клетке, так и для расширения возможностей использования МСК в регенеративной медицине. Важность этих исследований связана с особенностями взаимодействия клеток с их уникальным микроокружением, характерным для конкретной ткани. Микроокружение постоянно находится под влиянием генетических, эпигенетических и внешних факторов, регулирует пролиферацию, выживаемость, миграцию, старение, дифференцировочный потенциал и другие клеточные функции. Таким образом, источник получения МСК может определять их функциональные характеристики. (Poljanskaya et al., 2022).

Сравнительный анализ характеристик МСК, выделенных из разных источников, свидетельствует о количественных различиях между линиями по важнейшим характеристикам (Stanko et al., 2014; Topoluk et al., 2017; Li et al., 2018; Полянская, 2018; Jin et al., 2019; Мусорина и др., 2019; Кольцова и др., 2020; Semenova et al., 2021; Shin et al., 2021; Tai et al., 2021; Yigitbilek et al., 2021; Wu et al., 2022; Yi et al., 2022; Zou et al., 2022).

Линии мезенхимных стволовых клеток, как и любые неиммортиализованные клеточные линии, в процессе длительного культивирования подвергаются репликативному старению (РС), представляющему собой сложный комплексный процесс, индуцированный генетическими и эпигенетическими нарушениями. Он характеризуется рядом существенных изменений клеточных свойств. РС начинается на ранних пассажах и постепенно усиливается в процессе культивирования, вступая в активную стадию (Poljanskaya et al., 2022). При получении новой линии МСК, представляется существенным охарактеризовать эту линию не только на ранних пассажах, но и проанализировать ее свойства в процессе РС, включая сроки наступления его активной стадии. Такое исследование способствует расширению фундаментальных знаний о клеточных процессах, а также регламентирует сроки использования данной линии в биомедицинских технологиях.

В последнее время расширяется спектр МСК, выделение которых не требует применения инвазивных процедур, связанных, в частности, с этическими проблемами (Bongso, Fong, 2013). К таким источникам МСК, в частности, относятся постоянные линии эмбриональных стволовых клеток, внезароды-

шевые органы, десна, зубная ткань, грудное молоко (Крылова и др., 2012; Кольцова и др., 2018, 2019, 2022; Poljanskaya et al., 2022; Rahmani-Moghadam et al., 2022). Следует подчеркнуть, что образование ниши стволовых клеток в пульпе молочных зубов начинается до рождения ребенка. В связи с этим пульпа молочных зубов является источником более здоровых стволовых клеток по сравнению с пульпой постоянных зубов взрослого организма (Kerkis, Caplan, 2012). Учитывая также важность микроокружения для функциональной активности МСК, в частности разное микроокружение у генетически разных доноров, представляло интерес провести выделение МСК из пульпы зуба двух шестилетних доноров разного пола. В предыдущих исследованиях было показано, что имеют место гендерные различия по дифференцировочному потенциалу в остеогенном и хондрогенном направлениях МСК, выделенных из разных источников (Aksu et al., 2008; Payne et al., 2010; Scibetta et al., 2019). В ранее проведенной нами сравнительной характеристике двух линий МСК, выделенных из Вартонова студня пупочного канатика (MSCW-1 и MSCW-2) у разнополых доноров, был получен ряд различий по некоторым характеристикам (Кольцова и др., 2017). Тем не менее утверждать, что причиной наблюдаемых различий является именно разный пол доноров, сложно. Надо учитывать, что микроокружение клеточного материала, связанно с широким спектром генотипических, эпигенетических и внешних условий. Поэтому первоочередной задачей работы является получение линий, выделенных из зубной ткани разных доноров, сравнение их между собой по статусным характеристикам МСК, а также с ранее полученной линией из пульпы молочного зуба.

Таким образом, в работе поставлены следующие задачи: 1. выделение из пульпы зуба двух доноров фибробластоподобных клеток; 2. сравнительный анализ активности фермента SA- β -галактозидазы, характеризующий процесс РС; 3. сравнительный анализ характеристик, подтверждающих статус МСК на ранних 6–7-м и более поздних пассажах – ростовые характеристики, кариотипическая изменчивость, экспрессия маркеров недифференцированных эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) и дифференцировочного потенциала клеток при длительном культивировании. Все полученные характеристики в процессе обсуждения результатов будут сравнены с ранее полученной линией МСК (MSC-DP), выделенной из пульпы зуба шестилетней девочки.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Выделение клеток. Использовали пульпы выпавших естественным образом молочных зубов двух разнополых шестилетних детей. Материал использовали с разрешения родственников ребенка. Сразу после выпадения зубы помещали в пробирку с транспортной средой, содержащей DMEM/F12 (Биолот, Россия) и раствор антибиотиков и антимикотика в 50-

кратном разведении (Antibiotic Antimycotic Solution, Sigma, Израиль). До начала работы, пробирка с материалом хранилась при 4°C не более 24 ч.

Выделение клеток из пульпы зубов проводили механическим методом. Все содержимое пульпы 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 раствор антибиотиков и антимикотика в 50-кратном разведении (Antibiotic Antimycotic Solution, Gibco, США). Выделенные из пульпы зубов фрагменты ткани культивировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 10–14 дней. 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 2-м пассаже при отсутствии явных признаков контаминации бактериями и грибами прекращали добавление в ростовую среду раствора антибиотиков и антимикотика. Криоконсервировали клетки на 4-м пассаже 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. Таким образом, были получены две клеточные линии: MSC-DP-1 (от мальчика) и MSC-DP-2 (от девочки). Основные характеристики получали на 6-м и 7-м пассажах; динамику их изменений отслеживали при длительном культивировании.

Репликативное старение клеток. Оценивали активность фермента SA-β-галактозидазы. Клетки выращивали в чашках Петри (3.5 мм: Nunc, Дания) в течение 24–48 ч до образования субконфлюента. Затем среду удаляли и окрашивали клетки с помощью набора реактивов (Senescence Cells Histochemical Staining Kit, SIGMA, США), согласно инструкции. У клеток, вступающих в фазу РС, цитоплазма окрашивается в ярко синий цвет. Анализ проводили с помощью инвертированного микроскопа Nikon TS100 (Япония) на пассажах 6, 16, 25, 32, 42 для линии MSC-DP-1 и на пассажах 6 и 18 для линии MSC-DP-2. Долю окрашенных клеток (в %) определяли при подсчете не менее 1000 клеток в разных полях зрения на одну временную точку.

Характеристика пролиферативной активности.

1) *Эффективность клонирования* клеточных линий определяли в чашках Петри в условиях редкого посева (4 кл./см² – 100 клеток на 1 чашку 60 мм). Через 21 сут клетки окрашивали 1%-ным водным раствором кристалл-виолета и считали колонии. Эффективность клонирования определяли в % как отношение числа выросших колоний (клонов) к числу посе-

янных клеток. Учитывали колонии, состоящие из не менее 50 клеток. Эффективность клонирования анализировали на 6-, 16-, 24- и 39-м пассажах для линии MSC-DP-1 и на 6-, 16- и 18-м пассажах для линии MSC-DP-2.

2) *Индекс пролиферации (ИП)* – отношение числа клеток в текущий момент к исходному числу посеянных клеток. Строили кривые роста клеточных популяций согласно ИП в определенный момент времени. Для измерения среднего времени удвоения клеточной популяции каждый экспериментальный вариант повторяли 3 раза, ежедневно считали клетки в течение 120–192 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. Анализ проводили на пассажах 6, 24 и 32 для линии MSC-DP-1, и на пассажах 6, и 18 для линии MSC-DP-2.

Кариотипический анализ полученных клеточных популяций. Для получения препаратов метафазных хромосом за 2 ч до фиксации в культуру вводили колцемид (Demecolcine solution 10 мкг/мл в HBSS; Sigma, США) до конечной концентрации 0.1 мкг/мл, снимали клетки с субстрата смесью трипсина и версена (1 : 3), проводили гипотоническую обработку смесью 0.075 М раствора KCl и 1%-ного раствора цитрата натрия. Клетки фиксировали смесью метанола с ледяной уксусной кислотой (3 : 1). Для количественного кариотипического анализа препараты метафазных хромосом окрашивали водным раствором Гимза (1 : 50). Модальное число хромосом и пределы изменчивости клеток по числу хромосом определяли при анализе 100 метафазных пластинок; долю полиплоидных клеток оценивали при анализе 1000 метафазных пластинок для клеточных линий MSC-DP-1 и MSC-DP-2.

Для структурного кариотипического анализа проводили дифференциальное G-окрашивание хромосом в соответствии с ранее описанной методикой (Ozkinay, Mitelman, 1979). Анализировали 100 метафаз в каждом варианте. Клетки линии MSC-DP-1 анализировали на пассажах 6, 15, 24, 33, 42; клетки линии MSC-DP-2 – на пассажах 7 и 18. Кариотипы анализировали с помощью микроскопа Axio Imager.M1 (Carl Zeiss, Германия) с системой автоматического кариотипирования Ikaros 4 Karyotyping System (MetaSystems, Germany) и описывали в соответствии с Международной номенклатурой хромосом человека ISCN (McGowan-Jordan et al., 2016).

Иммунофлуоресцентный анализ. Для иммунофлуоресцентного анализа (ИФА) наличия поверхностных маркеров, характерных для ЭСК, и маркеров ранней дифференцировки в производные 3-х зародышевых листков использовали антитела против SSEA-4, TRA-1-60 (Chemicon, США), SOX-2 и транскрипционного фактора Oct-4 (Santa Cruz, США). Для иммунофлуоресцентного анализа присутствия

маркеров ранней дифференцировки в производные 3-х зародышевых листков, использовали антитела против α -актина и гладкомышечного актина (тест на мезодерму), α -фетопротеина (тест на энтодерму) (Sigma, США) и нестина (тест на эктодерму) (Chemicon, США). Клетки выращивали на покровных стеклах, фиксировали 10%-ным раствором формалина (Sigma-Aldrich, США) в течение 20 мин при комнатной температуре, пермеабелизовали 0.1%-ным раствором Тритона X100 в течение 15 мин при комнатной температуре, неспецифичные сайты связывания антител блокировали 0.1%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA) (Sigma, США) в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем инкубировали с перечисленными выше антителами в течение ночи при 4°C. Все антитела разводили в соотношении 1 : 50. Для выявления локализации связанных с белками антител инкубировали препараты в течение ночи при 4°C с антителами против иммуноглобулинов мыши (FITC; Chemicon, США), разведенных в соотношении 1 : 500. Каждому этапу предшествовала трехкратная отмывка препаратов в PBS. Для выявления ядер препараты инкубировали с красителем Hoechst 33342 в концентрации 0.1 мкг/мл в течение 10 мин при комнатной температуре. В качестве отрицательного контроля использовали клетки, инкубированные только с антителами против иммуноглобулинов мыши (FITC; Chemicon, США). Визуализацию проводили с помощью микроскопа Zeiss LSM 5 Pascal (Германия). Анализировали на пассажах 6 и 39 (линия MSC-DP-1) и на пассажах 6 и 17 (линия MSC-DP-2).

Определение статуса МСК с помощью проточной цитофлуориметрии. Наличие поверхностных антигенов анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии на цитометре Beckman Coulter (США). Присутствие каждого маркера оценивали по результатам 3-х экспериментов для клеток, находящихся на пассажах 6, 43 (линия MSC-DP-1) и на пассажах 6, 18 (линия MSC-DP-2). Иммунофенотипирование полученных клеточных линий проводили с помощью панели конъюгатов CD-маркерных моноклональных антител с флуорохромами. В работе использовали моноклональные антитела против CD-34, HLA-ABC и HLA-DR (Caltac, США), CD-44, CD-73, CD-105 (Beckman Coulter, США), CD-90 (Chemicon, США). В качестве негативного контроля использовали очищенные мышинные антитела IgG1/FITC и IgG1/RFE (ДАКО, Дания). Клетки снимали с поверхности чашки с помощью 0.05%-ного раствора трипсина с версеном (Gibco, США) и отмывали от него раствором PBS, не содержащем ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} (Биолот, Россия). Полученную суспензию клеток (1 млн/мл) в PBS делили на пробы по 30 мкл, добавляли к каждой из них по 3 мкл антител и инкубировали при 4°C в течение 30 мин. Далее пробы доводили до оптимального объема (0.3–0.4 мл) буфером FACS (PBS, содержащий 1% BSA и 0.05% азида натрия).

Индукция остеогенной, адипогенной и хондрогенной дифференцировки для определения статуса МСК. Использовали модифицированный метод (Reyes et al., 2001). Клетки высевали на покровные стекла, помещенные в культуральные чашки Петри диаметром 35 мм (50000 клеток на чашку). Через 1 сут меняли обычную ростовую среду на среду для адипогенной и остеогенной дифференцировок (StemPro; Gibco, США). Хондрогенную дифференцировку проводили в культуре микромаст в хондрогенной дифференцировочной среде (StemPro, Gibco, США). Индукцию проводили в течение трех недель, меняя среду каждые 7 сут.

Для идентификации остеогенной дифференцировки использовали выявление кальция по модифицированному методу Мак-Ги–Рассела (Луппа, 1980). Для этого клетки однократно промывали PBS без ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} и фиксировали 10%-ным раствором формалина (Sigma-Aldrich, США) в течение 20 мин. Окрашивание (красителем Alizarin Red Solution; Merck, Германия) в течение 30 с–5 мин (до проявления окраски) и визуализацию окрашенных в оранжево-красный цвет отложений кальция проводили под контролем микроскопа (Zeiss LSM 5 Pascal, Германия). Отмытые и высушенные стекла монтировали на предметное стекло.

Для идентификации адипогенной дифференцировки клетки промывали PBS без ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} , фиксировали в метаноле в течение 2 мин при –20°C. Затем клетки промывали 50%-ным этанолом и окрашивали красным масляным (Oil Red O solution; SIGMA, США) в течение 10 мин. Далее клетки промывали 50%-ным этанолом, затем дистиллированной водой и монтировали на предметные стекла. Визуализировали окрашенные капли жира (оранжево-красные) под микроскопом Zeiss LSM 5 Pascal (Германия).

Для идентификации хондрогенной дифференцировки из сформированных микромаст готовили мазки на трех предметных стеклах, фиксировали их содержимое 10%-ным раствором формалина (Sigma-Aldrich, США) в течение 20 мин. Далее каждый из мазков окрашивали в течение 30 мин при комнатной температуре 1%-ным раствором толуидинового синего в 50%-ном изопропанол, или 0.1%-ным водным раствором сафранина, или 1%-ным раствором альцианового синего в 3%-ной уксусной кислоте (Sigma, США). Окрашенные мазки промывали дистиллированной водой, высушивали и монтировали под покровное стекло.

Идентификацию дифференцировок для линии MSC-DP-1 проводили на 6-м и 40-м пассажах; для линии MSC-DP-2 – на 6-м и 18-м пассажах.

Полученные в работе количественные результаты обрабатывали статистически с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при вероятности нулевой гипотезы $p < 0.05$.

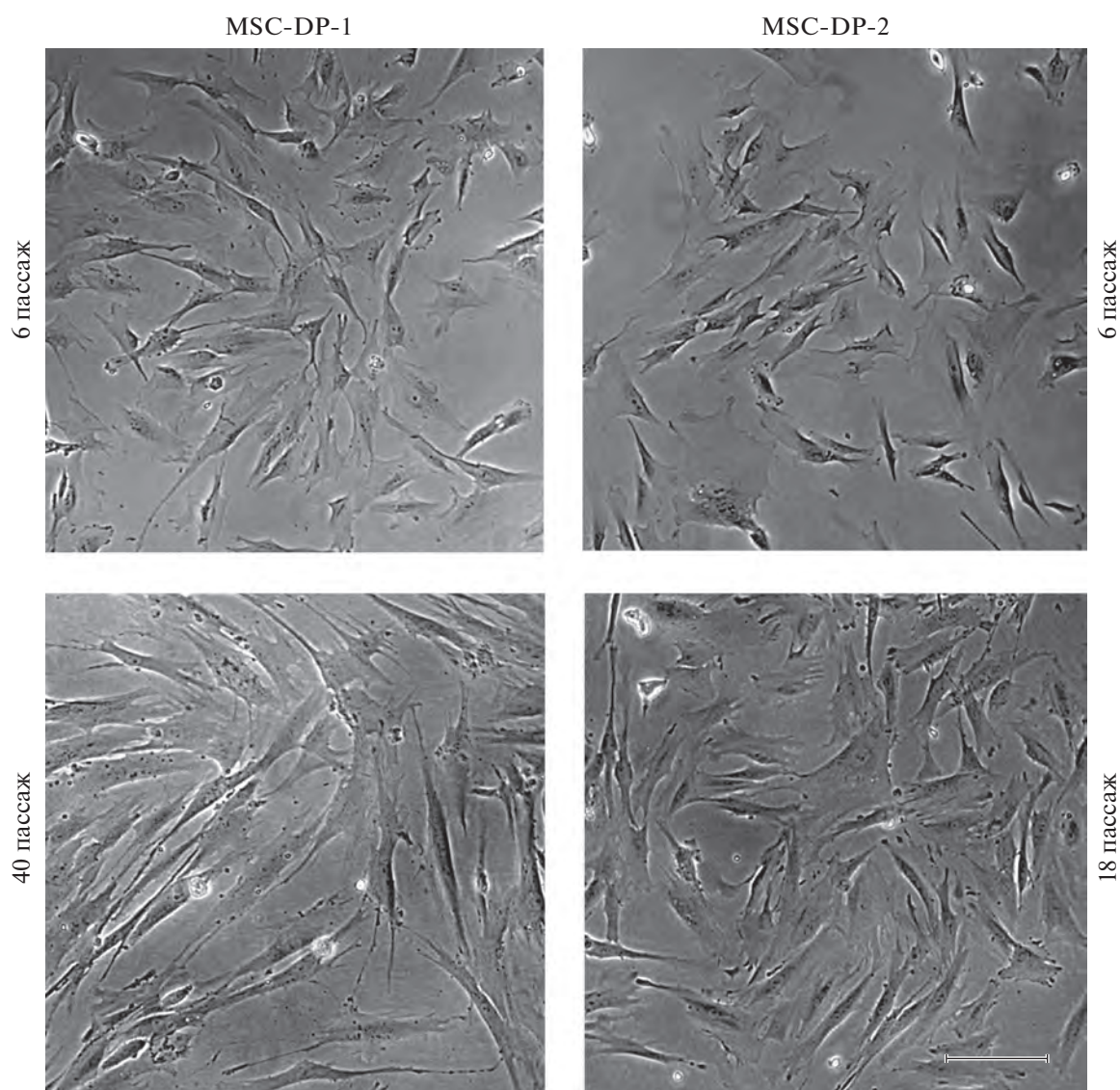


Рис. 1. Прижизненные фотографии клеточных линий MSC-DP-1 и MSC-DP-2 на пассажах 6, 40 и 6, 18 соответственно инвертированный световой микроскоп Nikon Eclipse TS100, Япония. Масштабная линейка: 200 мкм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологический анализ. Проведено культивирование выделенных из пульпы молочных зубов двух доноров фибробластоподобных клеток в течение 6 пассажей. В результате получены 2 линии, названные, согласно источнику получения, MSC-DP-1 (от мальчика) и MSC-DP-2 (от девочки). Морфологический анализ этих линий показал однородность клеточных популяций со средними по размеру вытянутыми фибробластоподобными клетками (рис. 1).

Репликативное старение клеток. Репликативное старение клеток оценивали по активности SA- β -галактозидазы в клеточных линиях MSC-DP-1 и MSC-DP-2 (табл. 1). В клетках линии MSC-DP-1 на пассажах 6, 16 и 25 обнаружена небольшая доля стареющих клеток, что свидетельствует об отсутствии

активного РС. При продолжении культивирования на пассаже 32 наблюдается значительное увеличение доли стареющих клеток, достигающее максимума на пассаже 42. В клетках линии MSC-DP-2 уже на 6-м пассаже наблюдается небольшая, но более высокая доля стареющих клеток по сравнению с клетками MSC-DP-1 ($p < 0.05$). К пассажу 18 эта доля клеток значительно увеличивается, что свидетельствует о вступлении клеток в активную стадию РС. Таким образом, установлен разный характер РС в процессе длительного культивирования исследуемых линий.

Проведенный сравнительный анализ характера РС с линией MSC-DP, ранее полученной из пульпы зуба 6-ти летней девочки (Кольцова и др., 2018), свидетельствует о различиях как между линиями МСК, выделенными из доноров женского пола, так и из до-

Таблица 1. Доля клеток с выраженной активностью β -галактозидазы (β -гал) в клетках линий MSC-DP-1 и MSC-DP-2 в процессе культивирования

Пассаж	MSC-DP-1		MSC-DP-2	
	число клеток	доля клеток с активностью β -гал, %	число клеток	доля клеток с активностью β -гал, %
6	1224	4.80 \pm 0.60	1351	11.00 \pm 0.85
16	1313	5.30 \pm 0.62	—	—
18	—	—	1227	43.80 \pm 1.41
25	1213	5.03 \pm 0.63	—	—
32	1216	32.10 \pm 1.30	—	—
42	1239	47.13 \pm 1.42	—	—

Примечание. Показана доля клеток (%) и их ошибки при подсчете не менее 1000 клеток.

нора мужского пола. Эти результаты свидетельствуют, по-видимому, о генетических различиях между донорами, не связанными с их полом. Кроме усиления активности SA- β -галактозидазы, в клеточных линиях в процессе длительного культивирования существенно изменяется морфология клеток, выражающаяся в увеличении размеров и степени их распластанности, что тоже свидетельствует об активном РС (рис. 1). Эта характеристика одинакова во всех трех линиях. Еще одной характеристикой активного РС является наличие дебриса во всех линиях.

Ростовые характеристики. Эффективность клонирования клеток MSC-DP-1 на 6-м пассаже составляет 15.3 \pm 1.8%. Затем она снижается ($p < 0.05$) и составляет на 16- и 24-м пассажах соответственно 7.3 \pm 0.7 и 6.0 \pm 1.2%. Надо отметить, что на этих сроках культивирования еще не наступает активное РС. По-видимому, нет однозначной корреляции между клоногенной активностью и уровнем РС. Тем не менее на 39-м пассаже, на стадии активного РС, клоногенная активность отсутствует.

Эффективность клонирования клеток MSC-DP-2 на 6-м пассаже составляет 16.6 \pm 2.8%, что совпадает с линией MSC-DP-1, несмотря на повышенную долю стареющих клеток в линии MSC-DP-2. Это еще раз подтверждает отсутствие связи между уровнем РС и клоногенной активностью. На 16-м пассаже на стадии активного РС имеет место снижение клоногенной активности до 6.6 \pm 0.9%, которая исчезает на 18-м пассаже. В целом эти результаты подтверждают ранее полученные данные о снижении уровня клоногенной активности в процессе РС и свидетельствуют о ее больших колебаниях между разными линиями (Lo Surdo et al., 2013; Szepesi et al., 2016; Кольцова и др., 2018, 2020; Мусорина и др., 2019).

Клеточная линия MSC-DP-1 на 6-м пассаже характеризуется активной пролиферацией (рис. 2). Анализ индексов пролиферации (ИП) в течение 120 ч позволяет сделать вывод о том, что логарифмическая фаза роста составляет 96 ч (от 0 до 96). Среднее время одного удвоения клеточной популяции

составляет 26.6 \pm 0.32 ч. В процессе культивирования на 24-м пассаже логарифмическая фаза роста составляет 96 ч (от 0 до 96). Среднее время одного удвоения клеточной популяции составляет 30.1 \pm 0.25 ч. Анализ ИП на 33-м пассаже свидетельствует о снижении пролиферативной активности (рис. 2, кривая 3). Так, логарифмическая фаза продолжается от 24 до 48 ч, затем наступает плато до 72 ч и последующее увеличение ИП до 96 ч, т.е. в целом она составляет 72 ч. Среднее значение ИП снижается и составляет на 24-м пассаже 6.38 \pm 1.18, на 33-м пассаже — 1.65 \pm 0.24 ($p < 0.05$) (рис. 2, кривые 2 и 3). Эти результаты свидетельствуют о наступлении активной стадии РС. Среднее время одного удвоения клеточной популяции составляет 65.9 \pm 5.4. Таким образом, в процессе РС значительно увеличивается среднее время удвоения ($p < 0.05$), что характерно для большинства линий МСК (Garcia et al., 2016; de Witte et al., 2017; Кольцова и др., 2017, 2019; Koltsova et al., 2021).

Клеточная линия MSC-DP-2 на пассаже 6 характеризуется значительной пролиферативной активностью (рис. 3). Анализ (ИП) в течение 192 ч позволяет сделать вывод о том, что логарифмическая фаза роста составляет 72 ч (от 48 до 120 ч). Среднее время одного удвоения клеточной популяции составляет 37.5 \pm 2.2 ч. В процессе культивирования на пассаже 18 логарифмическая фаза роста составляет 24 ч (от 72 до 96 ч). Среднее время одного удвоения клеточной популяции — 16.7 \pm 0.4. Таким образом, в отличие от линии MSC-DP-1, клетки линии MSC-DP-2 не увеличивают среднее время удвоения в процессе РС, а значительно снижают этот параметр. Отсутствие увеличения времени удвоения в процессе РС мы наблюдали еще в 2-х линиях: в линии MSC-DP, выделенной ранее из пульпы зуба, наблюдали сходство длительности времени удвоения на ранних и поздних пассажах, а в линии SC7-MSC, выделенной из линии ЭСК, этот параметр значительно снижался в процессе РС, подобно линии MSC-DP-2.

На основании формулы расчета среднего времени удвоения клеточной популяции (Седова, 2008) причиной отсутствия увеличения этого параметра в

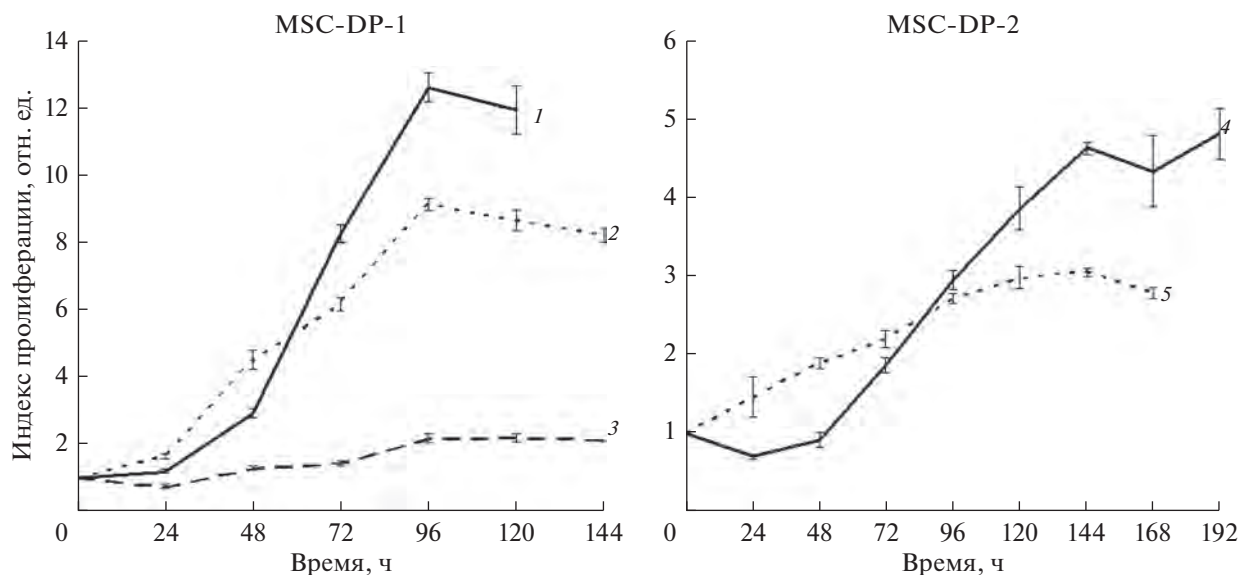


Рис. 2. Кривые роста клеток линии MSC-DP-1 на пассаже 6 (кривая 1), на пассаже 24 (кривая 2), на пассаже 33 (кривая 3) и клеток линии MSC-DP-2 на пассаже 6 (кривая 4), на пассаже 18 (кривая 5).

процессе РС можно считать несоответствие длительности логарифмической фазы величине ИП в некоторых линиях. По-видимому, изменение среднего времени удвоения клеточной популяции не является обязательным признаком РС. Проведенный в настоящей работе сравнительный анализ двух новых линий МСК с ранее полученной линией MSC-DP (Кольцова и др., 2018) свидетельствует о сходстве линий от одного пола (MSC-DP и MSC-DP-2) по отсутствию увеличения среднего времени удвоения клеточной популяции в стадии активного РС и о различии по этому параметру между линиями разного пола (MSC-DP и MSC-DP-1). Но на клетках линии SC7-MSC, выделенной из ЭСК мужского пола, также показано отсутствие увеличения времени удвоения популяции в активной стадии РС (Кольцова и др., 2022).

Таким образом, в нашей работе, проведенной на небольшом числе линий, нельзя связать характер пролиферативной активности с полом донора. Кроме этого, линии MSC-DP-1 и MSC-DP-2 значительно различаются между собой по пролиферативной активности на раннем 6-м пассаже. Средние ИП составляют на 6-м пассаже 7.29 ± 2.25 и 3.01 ± 0.59 соответственно ($p < 0.05$) (рис. 2, кривые 1 и 4). А линия MSC-DP (от девочки) совпадает по ИП с линией MSC-DP-1 (от мальчика) и значительно отличается от линии MSC-DP-2 (от девочки). Это также косвенно подтверждает неоднозначность гендерных различий. На стадии активного РС величины ИП в клетках MSC-DP-1 и MSC-DP-2 уменьшаются и составляет 1.65 ± 0.24 и 2.44 ± 0.22 соответственно ($p < 0.05$) (рис. 2, кривые 3 и 5).

Кариотипический анализ. Проведен кариотипический анализ линии MSC-DP-1 на пассажах 6, 15, 24,

33 и 42 и линии MSC-DP-2 на пассажах 7 и 18. Клетки линии MSC-DP-1 сохраняли нормальный диплоидный кариотип мужского пола 46,XY с модальным диплоидным числом хромосом 46 на пассажах 6, 15, 24 и 33. На пассаже 42 наблюдаются отличия распределения клеток по числу хромосом от нормального кариотипа: пределы изменчивости по числу хромосом составляют 44–47 с модальным числом хромосом 45 (54.0 ± 5.0) и субмодальным числом хромосом 46 (31.0 ± 4.6). Доля полиплоидных клеток на 4-х пассажах, не имеющих кариотипических аномалий,

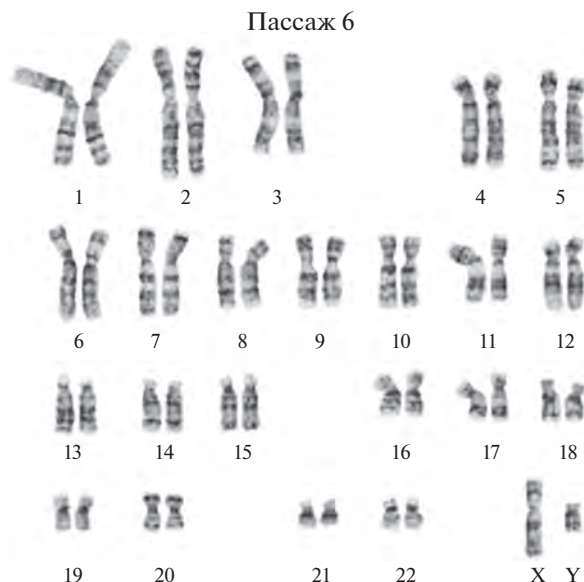


Рис. 3. Кариотип клеточной линии MSC-DP-1 на 6-м пассаже. Нормальный кариотип: 46,XY.

составила в среднем 4.6%, а на пассаже 42 – 3.0%. Таким образом, принципиальных различий не обнаружено.

Структурный анализ кариотипа линии MSC-DP-1 на 6-м, 15-м, 24-м и 33-м пассажах не выявил хромосомных перестроек. Для иллюстрации нормального кариотипа этой линии представлен кариотип на 6-м пассаже на рис. 3. На 42-м пассаже нормальный диплоидный кариотип (46,XY) был обнаружен только в 23% клеток при анализе 100 метафазных пластинок (рис. 4а). В 77% клеток обнаружены 104 структурные перестройки хромосом: 40.4% транслокаций, 39.4% дицентрических хромосом (ДХ), преимущественно по типу теломерных ассоциаций, а также 12.5% аномальных хромосом с неидентифицированным дополнительным материалом и 2.9% маркерных хромосом. Далее рассмотрим подробнее типы и количество обнаруженных 104-х хромосомных изменений.

В клеточной линии MSC-DP-1 на 42-м пассаже выявлен структурный вариант кариотипа (СВК) с перестройками хромосом 14 и 20 (44 клетки). Так, в 12-ти клетках присутствовала ДХ dic(14;20)(p13;q13.3) (рис. 4б); в 32-х клетках – дериват хромосомы 20, der(20)t(14;20)(q11.1;q13.3), образовавшийся, по-видимому, в результате утраты короткого плеча и центромерного района хромосомы 14 (рис. 4в). Кроме того, в двух клетках с ДХ dic(14;20)(p13;q13.3) и в 9 клетках с der(20)t(14;20)(q11.1;q13.3) обнаружены дополнительные перестройки других хромосом, в том числе клональная перестройка, ДХ dic(15;21)(q26;p13) (рис. 4б, в).

В 33-х клетках обнаружены различные клональные и неклональные перестройки хромосом (рис. 4з, д).

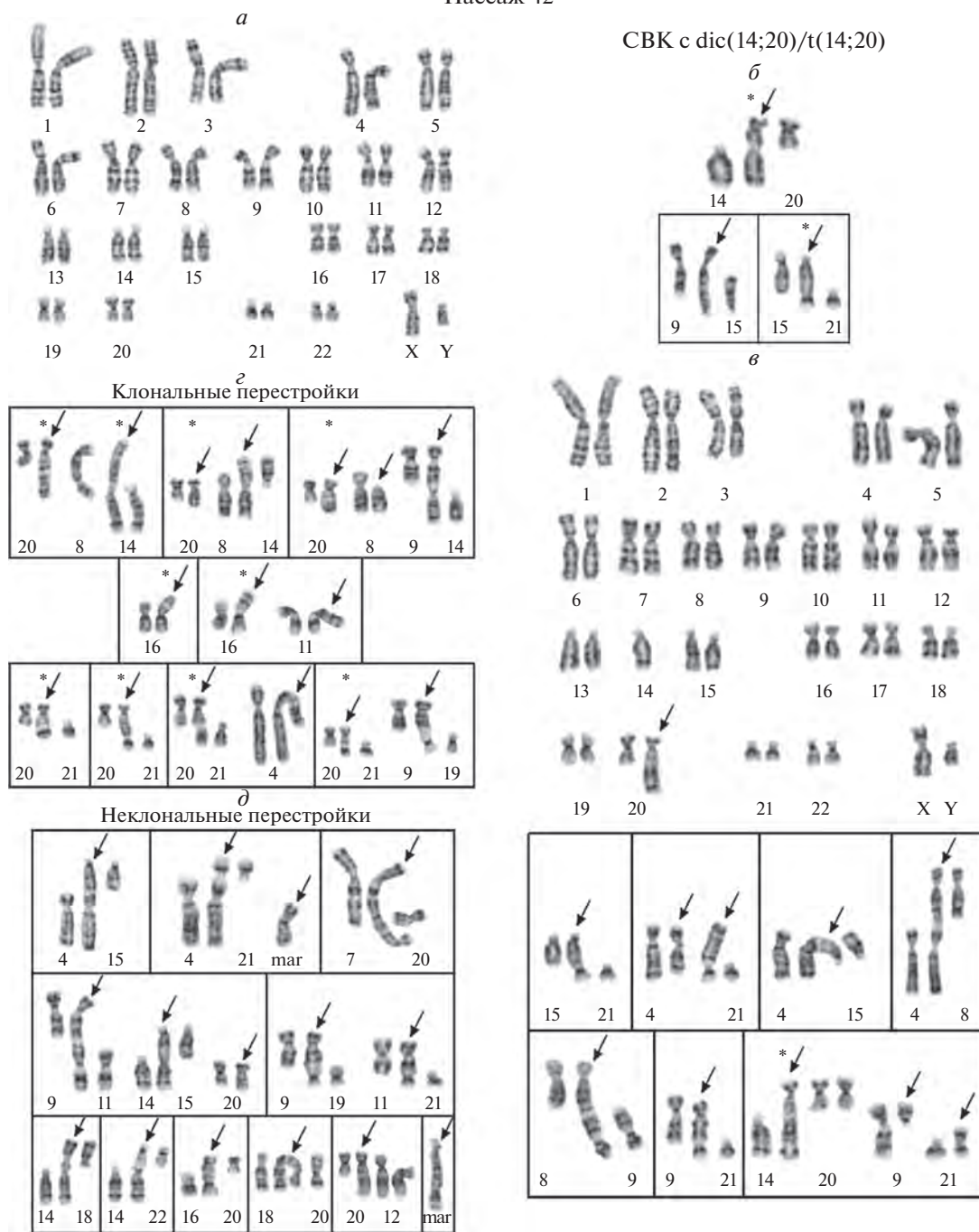
Клональные перестройки выявлены в 13-ти клетках (рис. 4е): в 4-х клетках обнаружена транслокация хромосом 8 и 20 с разными точками разрыва в прицентромерном районе хромосомы 8. Короткое плечо хромосомы 8 обнаруживали либо в составе ДХ dic(8;20)(q11.2;q13.3) в сочетании с транслокацией хромосом 8 и 14, t(8;14)(q11.2;p13) (2 клетки), либо в составе деривата хромосомы 20 der(20)t(8;20)(p11.2;q13.3) в сочетании с ДХ dic(8;14)(p11.2;p13) в одной клетке, или ДХ dic(9;14)(q34;p13) и делецией хромосомы 8, del(8)(p11.2) – в другой. В 3-х клетках обнаружена аномальная хромосома 16, add(16)(p13.3) с появлением неидентифицированного дополнительного материала на коротком плече. В одной из таких клеток обнаружена аномальная хромосома 11 с дополнительным, также неидентифицированным, материалом на коротком плече, add(11)(p15). В 6-ти клетках выявлена ДХ dic(20;21)(q13.3;p13), в одной из которых эта аномалия сочеталась с перестройкой хромосомы 4, а в другой – с ДХ dic(9;19)(q34;p13.3).

В остальных 20-ти клетках выявлены неклональные перестройки (рис. 4д). В перестройках преимущественно участвовали хромосомы 20 (57.7%) и 14 (51.9%), с меньшей частотой – хромосомы 21 (15.4%), 9 (10.6%), 15 (7.7%), 4 (6.7%) и 8 (6.7%). В перестройки избирательно вовлекались терминальные районы хромосом 20q13.3, 21p13, 15q26, 9q34, терминальные и прицентромерные районы хромосом 14, 8 и 4.

В клетках линии MSC-DP-2 на пассаже 7 имеет место нормальный диплоидный кариотип женского пола, 46,XX, который выявлен в 98 клетках (рис. 6). В двух клетках обнаружена клональная перестройка хромосом 1 и 12 (2%), приводящая к трисомии по длинному

Рис. 4. Кариотип клеточной линии MSC-DP-1 на 42-м пассаже. *а* – Нормальный кариотип, 46,XY. *б* – Дицентрическая хромосома (ДХ) dic(14;20)(20pter→20q13.3::14p13→14qter) в СВК 45,XY,dic(14;20)(p13;q13.3). На врезке показаны аномалии хромосомом, выявленные в двух клетках с dic(14;20)(p13;q13.3) и числом хромосом 44: ДХ dic(9;15)(9pter→9q22::15q26→15pter); ДХ dic(15;21)(15pter→15q26::21p13→21qter). *в* – Кариотип клеток с транслокацией хромосом 14 и 20, 45,XY,t(14;20)(20pter→20q13.3::14q11.1→14qter); на врезке показаны аномалии хромосомом, выявленные в клетках с t(14;20)(q11.1;q13.3); *в верхнем ряду* – ДХ dic(15;21)(15pter→15q26::21p13→21qter); транслокации хромосом 4, 14 и 21 с образованием ДХ dic(4;14)(4pter→4q12::14p13→14qter) и деривата хромосомы 21 der(21)(4qter→4q12::21p13→21qter); ДХ dic(4;15)(15pter→15q26::4p16→4qter); ДХ dic(4;8)(8pter→8q24.3::4p16→4qter); *в нижнем ряду* – ДХ dic(8;9)(8pter→8q24.3::9q34→9pter); ДХ dic(9;21)(9pter→9q34::21p13→21qter); дополнительная копия хромосомы 20, делеция хромосомы 9 del(9)(pter→q12.); и изодицентрическая хромосома idic(21)(qter→p13::p13→qter) в клетке с транслокацией t(14;20)(q11.1;q13.3) и числом хромосом 46. *г* – На врезке показаны выявленные клональные перестройки хромосомом; *в верхнем ряду* – транслокации хромосом 8, 14 и 20 с образованием ДХ dic(8;20)(20pter→20q13.3::8q11.2→8pter) и деривата хромосомы 14 der(14)(8qter→8q11.2::14p13→14qter); транслокации хромосом 8, 14 и 20 с образованием деривата хромосомы 20 der(20)(20pter→20q13.3::8p11.2→8pter) и ДХ dic(8;14)(8qter→8p11.2::14p13→14qter); транслокация хромосом 8 и 20 с образованием der(20)(20pter→20q13.3::8p11.2→8pter), делеция хромосомы 8 del(8)(p11.2→qter), ДХ dic(9;14)(9pter→9q34::14p13→14qter); *в среднем ряду* – хромосома 16 с дополнительным неидентифицированным материалом на коротком плече add(16)(?:p13.3→qter); add(16)(?:p13.3→qter) и хромосома 11 с дополнительным неидентифицированным материалом на коротком плече add(11)(?:p15→qter); *в нижнем ряду* – ДХ dic(20;21)(20pter→20q13.3::21p13→21qter); ДХ dic(20;21)(20pter→20q13.3::?:21p13→21qter); ДХ dic(20;21)(q13.3;p13) и хромосома 4 с дополнительным неидентифицированным материалом на коротком плече add(4)(?:p16→qter); ДХ dic(20;21)(q13.3;p13) и ДХ dic(9;19)(9pter→9q34::19p13.3→19qter). *д* – На врезке показаны некоторые неклональные перестройки хромосомом, выявленные в отдельных клетках; *в верхнем ряду* – ДХ dic(4;15)(15pter→15q26::4p16→4qter); ДХ dic(4;21)(21qter→21p13::4p16→4qter) и маркерная хромосома; ДХ dic(7;20)(7pter→7q36::20q13.3→20pter); *в среднем ряду* – ДХ dic(9;11)(9pter→9q34::11p15→11qter), ДХ dic(14;15)(15pter→15q26::14p13→14qter) и хромосома 20 с дополнительным неидентифицированным материалом на длинном плече add(20)(pter→q13.3::?:); ДХ dic(9;19)(9pter→9q34::19q13.4→19pter) и ДХ dic(11;21)(11pter→11q25::21p13→21qter); *в нижнем ряду* – ДХ dic(14;18)(18qter→18p11.3::14p13→14qter); ДХ dic(14;22)(22pter→22q13::14p13→14qter); ДХ dic(16;20)(20pter→20q13.3::16p13.3→16qter); ДХ dic(18;20)(20pter→20q13.3::18p11.3→18qter); дериват хромосомы 20 с дополнительным материалом длинного плеча хромосомы 12 der(20)(20pter→20q13.3::12q13→12qter); маркерная хромосома. *Стрелками* указаны структурно перестроенные хромосомы; *звездочкой* отмечены клональные перестройки хромосомом.

Пассаж 42



плечу хромосомы 1, $\text{der}(12)\text{t}(1;12)(\text{q}12;\text{q}24.3)$ (рис. 6, врезка), но количественно не превышающая установленные критерии для кариотипически нормальных линий (Barkholt et al., 2013). На пассаже 18 клетки имели нормальный диплоидный кариотип 46,XX. Доля полиплоидных клеток составляла 6.0% на 7-м пассаже и 0.8% на 18 пассаже.

Проведенный структурный кариотипический анализ при длительном культивировании показал

появление ДХ на основе теломерных ассоциаций в процессе активного РС. Подобное явление ранее было обнаружено и в некоторых других линиях в процессе РС. Причем обнаружено преимущественное участие в образовании теломерных ассоциаций 14 и 21 хромосом (Кольцова и др., 2018, Мусорина и др., 2019). Появление теломерных ассоциаций было ранее показано в разных “безмаркерных” иммортализованных и неиммортализованных диплоидных линиях при стрессовых ситуациях и при старении. Надо отме-

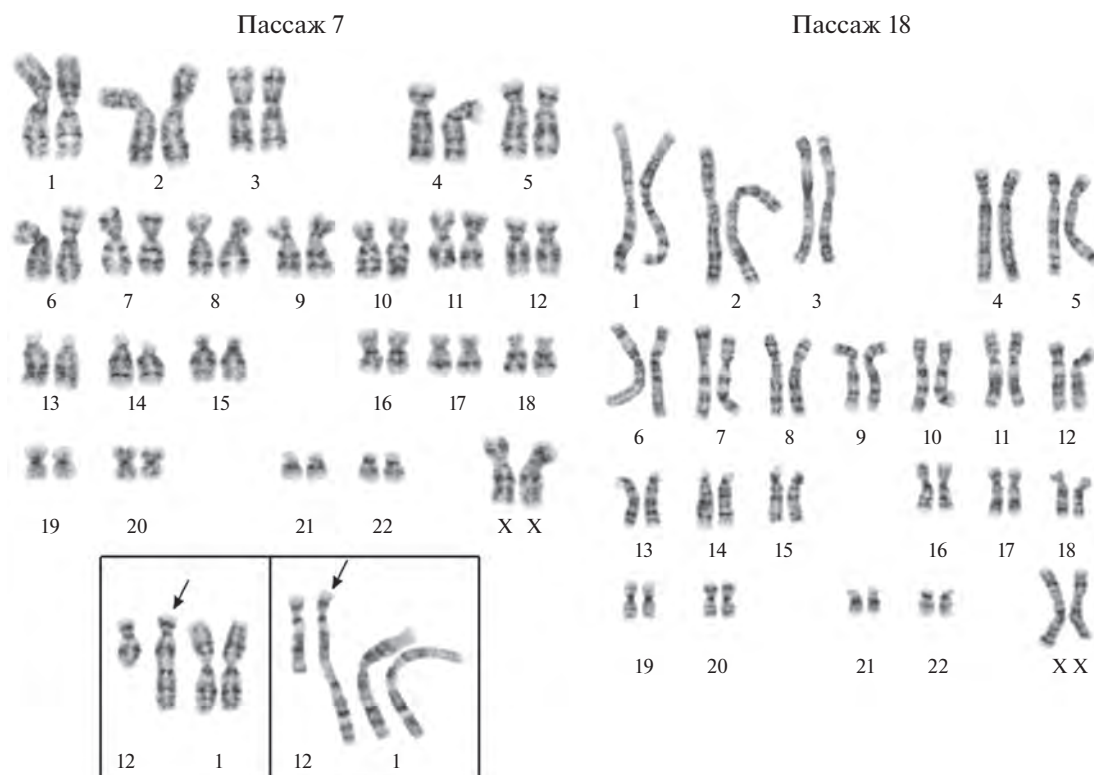


Рис. 5. Кариотипы клеточной линии MSC-DP-2 на 7-м и 18-м пассажах. Пассаж 7: нормальный кариотип: 46,XX. На врезке показана структурная перестройка хромосом 1 и 12, приводящая к трисомии по длинному плечу хромосомы 1, обнаруженная в двух клетках: дериват хромосомы 12 $der(12)(12pter \rightarrow 12q24.3::1q12 \rightarrow 1qter)$ разной степени конденсации (стрелки). Пассаж 18: нормальный кариотип: 46,XX.

туть, что РС нельзя считать индуцированным разными воздействиями стрессом. Но тем не менее процесс РС постепенно способствует ухудшению и, в конечном счете, остановке клеточных процессов, характерных для МСК на ранних и средних пассажах. По-видимому, в процессе РС происходит завершение генетической программы онтогенеза данных клеток. Анализ характерных черт теломерных ассоциаций, включая и преимущественное участие определенных хромосом в их образовании, проведенный на большом “безмаркерном” клеточном материале, позволил сделать вывод, что роль теломерных ассоциаций в таких клеточных линиях, по-видимому, 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 (Benn, 1976; Matsumura et al., 1979; Хейфлик, 1997; Полянская, 2000; Полянская, Вахтин, 2003). Возможно, что этот механизм имеет место и при РС. Но, исходя из нерегулярности появления этих структур в процессе РС в разных линиях МСК, нельзя сделать вывод об этом явлении, как обязательном при РС.

Результаты ИФА. Показана экспрессия маркеров ранней дифференцировки ЭСК в производные трех

зародышевых листков в обеих линиях с помощью иммунофлуоресцентного анализа (рис. 7). Идентифицированы следующие маркеры: альфа-актинин (маркер мезодермы), альфа-фетопротеин (маркер энтодермы) и нестин (маркер эктодермы). Эти результаты совпадают с более ранними данными, полученными на других линиях МСК, включая линию MSC-DP. Причем, наличие экспрессии этих маркеров в МСК разного происхождения было показано при использовании разных методов. Предположительно, функциональная роль этих маркеров связана либо с дифференцировочной пластичностью МСК, либо с эмбриональным происхождением МСК. Известно, что МСК могут дифференцироваться не только в производные мезодермы, но и в производные эктодермы и энтодермы (Riekstina et al., 2009; Huang et al., 2010; Sensebé et al., 2010; Antonucci et al., 2011; Mamidi et al., 2011; Кольцова и др., 2015, 2018; Ding et al., 2015).

Существенно отметить, что на ранних и поздних пассажах в обеих линиях отсутствуют клетки, несущие маркеры недифференцированных ЭСК: SSEA-4, Oct-4, SOX2. Исключение составляет TRA-1-60, который присутствует на ранних и поздних пассажах в линии MSC-DP-1 (данные не представлены). Информация о наличии этих маркеров в разных МСК противоречива. Есть исследования, свидетельству-

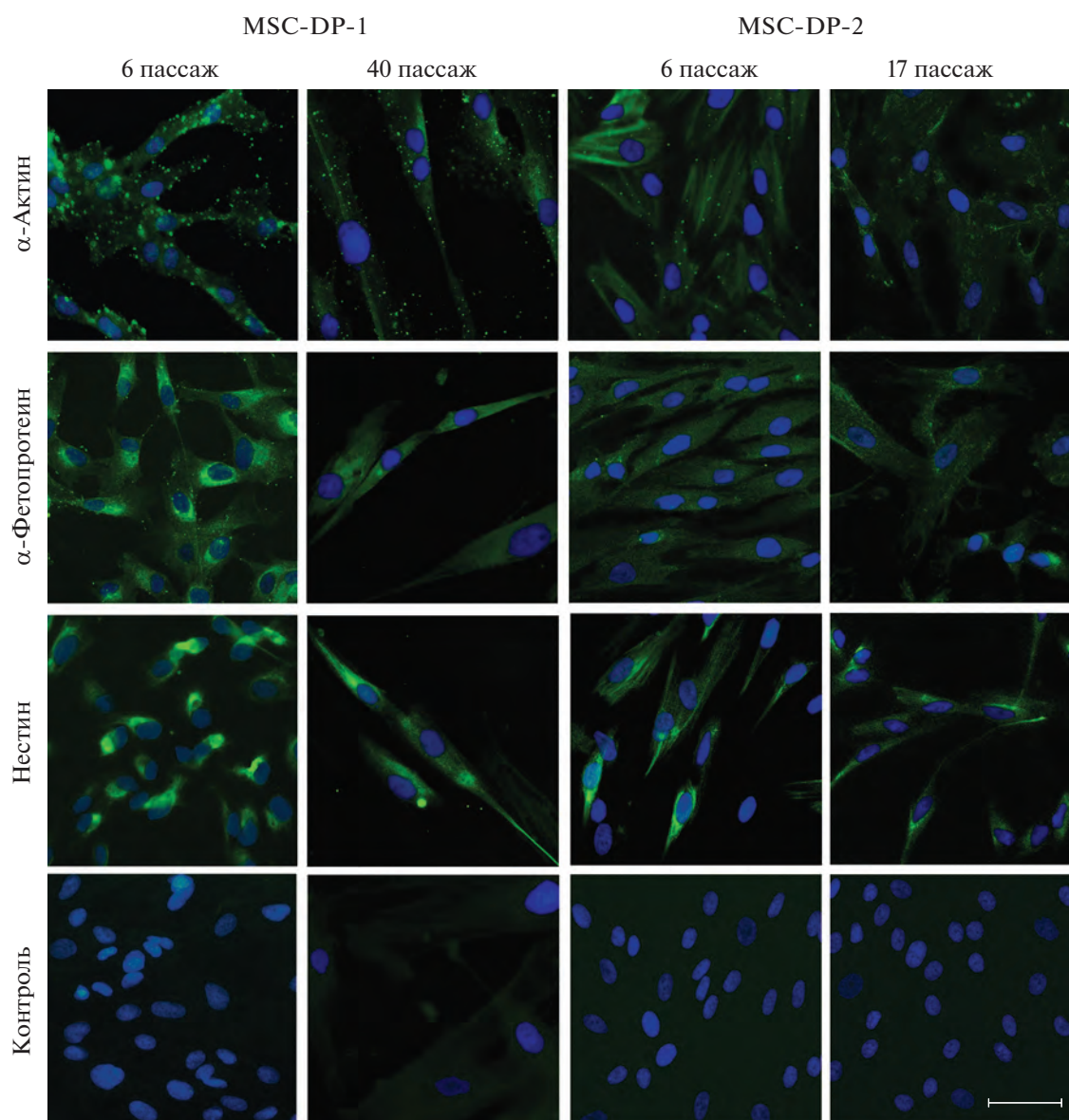


Рис. 6. Флуоресценция маркеров ранней дифференцировки ЭСК в линиях мезенхимных стволовых клеток MSC-DP-1 на пассажах 6, 40 и MSC-DP-2 на пассажах 6, 17. Показаны маркеры мезодермы (α -актинина), энтодермы (α -фетопротеина) и эктодермы (нестина). Окраска соответствующими моноклональными антителами. Масштабная линейка: 50 мкм.

ющие об их отсутствии или присутствии некоторых из них. Есть данные, предположительно подтверждающие их участие в процессах пролиферации и дифференцировки МСК, согласно наличию корреляции между уровнем экспрессии некоторых маркеров и уровнем пролиферации и дифференцировки некоторых МСК (Крылова и др., 2012; Кольцова и др., 2017; Полянская, 2018). Но, исходя из полученных в этом исследовании результатов, сложно провести корреляцию между указанными параметрами. Так, несмотря на отсутствие этих маркеров, наблюдается высокая пролиферативная активность в линии MSC-DP-1, а присутствие маркера TRA-1-60 не спо-

собствует ее увеличению в этой линии на поздних пассажах. Сравнение экспрессии этих маркеров в клетках линий MSC-DP и MSC-DP-1 показало различия только по наличию в линии MSC-DP экспрессии маркера SSEA-4 на раннем пассаже, что не привело к увеличенной пролиферативной активности или увеличению дифференцировочного потенциала по сравнению с линией MSC-DP-1. Таким образом, вопрос о роли Oct-4, SSEA-4, SOX2 и TRA-1-60 в функциональной деятельности МСК пока остается открытым.

Анализ поверхностных антигенов для определения статуса МСК. Поверхностные антигены МСК полу-

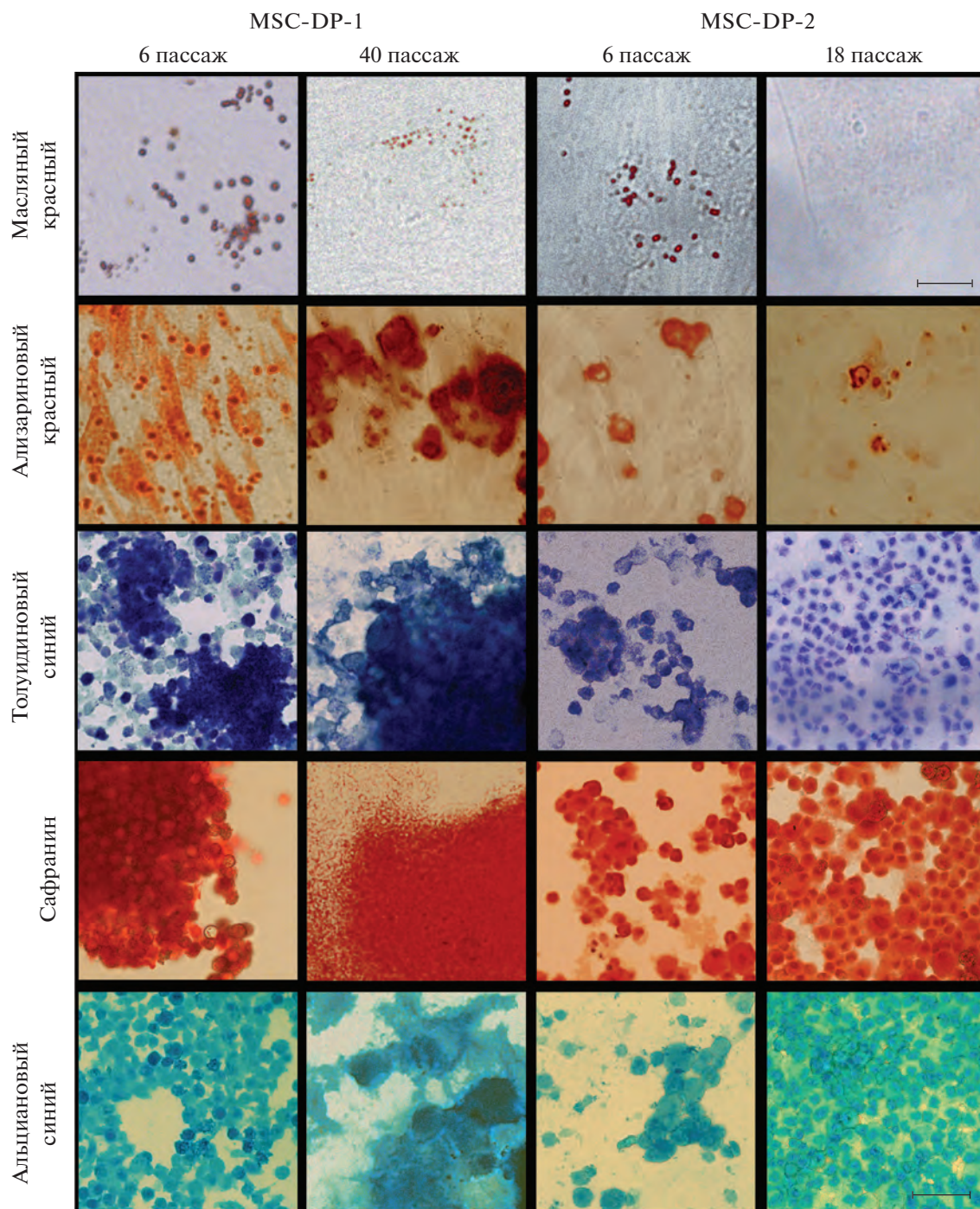


Рис. 7. Дифференцировка клеточных линий MSC-DP-1 и MSC-DP-2 в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях на пассажах 6, 40 и на пассажах 6, 18 соответственно. Показаны окрашивание жировых включений масляным красным (адипогенез), окрашивание ализариновым красным комплексов с кальцием (остеогенез) и окрашивание толуидиновым синим сульфатированных глюкозаминогликанов, сафранином протеогликанов и альциановым синим кислых глюкозаминогликанов (хондрогенез). Масштабная линейка: 10 мкм для адипогенеза и 50 мкм для остеогенеза и хондрогенеза.

ченых линий анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии и подтвердили наличие у них статуса МСК (табл. 2). Для популяций обеих линий и ранее полученной линии MSC-DP характерна большая доля клеток, несущих характерные для

МСК антигены CD44, CD73, CD90, CD105 и HLA-ABC и небольшая часть клеток с антигенами CD34, CD45 и HLA-DR. Никаких принципиальных различий между линиями на ранних и поздних пассажах не обнаружено.

Таблица 2. Доля клеток (%), несущих разные поверхностные маркеры в линиях MSC-DP-1 и MSC-DP-2

Маркер	MSC-DP-1, пассаж 6	MSC-DP-1, пассаж 43	MSC-DP-2, пассаж 6	MSC-DP-2, пассаж 18
CD44	99.99 ± 0.007	99.84 ± 0.16	99.98 ± 0.02	99.90 ± 0.04
CD73	99.86 ± 0.03	99.76 ± 0.18	99.93 ± 0.00	99.54 ± 0.15
CD90	99.91 ± 0.04	99.96 ± 0.04	100.00 ± 0.00	99.88 ± 0.05
CD105	91.67 ± 2.38	97.46 ± 1.50	96.90 ± 0.49	99.46 ± 0.10
HLA-ABC	100.00 ± 0.00	95.62 ± 0.76	99.66 ± 0.07	99.68 ± 0.13
HLA-DR	0.62 ± 0.12	0.97 ± 0.45	0.18 ± 0.11	0.28 ± 0.09
CD45	0.52 ± 0.01	1.32 ± 0.42	0.54 ± 0.18	0.53 ± 0.04
CD34	0.67 ± 0.11	1.19 ± 0.49	0.58 ± 0.12	1.19 ± 0.08

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

Индукция остеогенной, адипогенной и хондрогенной дифференцировки для определения статуса МСК.

Результаты анализа дифференцировочного потенциала в клеточных линиях MSC-DP-1 и MSC-DP-2 представлены на рис. 8. Представленные данные свидетельствуют о наличии адипогенной дифференцировки клеток в линии MSC-DP1 на 6-м пассаже, уровень которой снижается на позднем 40-м пассаже. В отличие от этих клеток, в клетках MSC-DP-2 наблюдается ослабленный характер этой дифференцировки на 6-м пассаже и ее полное отсутствие на позднем 18-м пассаже. Остеогенная и хондрогенная дифференцировки присутствуют в обеих линиях на раннем и позднем пассажах. Таким образом, полученные результаты в целом подтверждают положение о том, что обе линии по этой характеристике соответствуют статусу МСК на раннем пассаже. Далее в процессе РС происходит ослабление или исчезновение дифференцировочного потенциала, что также характеризует МСК. Как правило, это относится не ко всем 3-м дифференцировкам, а отдельным в разных линиях. В нашем случае это явление затронуло адипогенную дифференцировку: частично в линии MSC-DP-1 и полностью – в линии MSC-DP-2. Сравнение этих линий с MSC-DP свидетельствует о различиях между ними, которые связаны с полным отсутствием адипогенной дифференцировки на раннем и позднем пассажах клеток MSC-DP (Кольцова и др., 2018).

В целом сравнительный анализ клеточных популяций, выделенных из двух линий МСК, полученных из пульпы зуба разных доноров, свидетельствует о наличии межлинейных различий по разным статусным характеристикам МСК в процессе РС.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны А.М. Кольцовой (ИНЦ РАН) за предоставление МСК на раннем пассаже.

В работе было использовано оборудование ЦКП “Коллекция культур клеток позвоночных”, имеющего финансовую поддержку Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2021-683).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Госзадания (№ АААА-А19-119020-190093-9) Института цитологии РАН и поддержана Министерством науки и высшего образования РФ по проекту 15.БРК.21.0011 (соглашение № 075-15-2021-1063).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе не было экспериментов с участием животных и людей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кольцова А.М., Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2018. Получение и характеристика линии мезенхимных стволовых клеток, выделенных из пульпы молочного зуба человека. Цитология. Т. 60. № 12. С. 955. (Koltsova A.M., Zenin V.V., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G. 2018. The derivation and characterization of mesenchymal stem cell line, isolated from human pulp of a deciduous tooth. Tsitologiya. V. 60. P. 955.) <https://doi.org/10.1134/S0041377118120015>
- 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. Т. 57. № 11. С. 761. (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. V. 57. № 11. P. 761.)
- Кольцова А.М., Зенин В.В., Петросян М.А., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2020. Получение и характеристика линий мезенхимных стволовых клеток, выделенных из разных областей плаценты одного донора. Цитология. Т. 62. № 9. С. 713. (Koltsova A.M., Zenin V.V., Petrosyan M.A., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G. 2020. Isolation and characterization of Mesenchymal Stem Cell Line Derived from different regions of the placenta of the same donor. Cell Tiss. Biol. V. 15. P. 356.) <https://doi.org/10.31857/S0041377120090035>
- Кольцова А.М., Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2019. Получение и характеристика линии мезенхимных стволовых клеток, выделенной из

- десны человека. Цитология. Т. 61. № 8. С. 658. (Koltsova A.M., Zenin V.V., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G. 2019. The derivation and characterization of mesenchymal stem cell line, isolated from human gingival. Tsitologiya. V. 61. P. 658.)
<https://doi.org/10.1134/S0041377119080029>
- 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. Т. 59. № 9. С. 574. (Koltsova A.M., Krylova T.A., 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. V. 59. P. 574.)
- Кольцова А.М., Зенин В.В., Турилова В.И., Шатрова А.Н., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2022. Получение и характеристика разных популяций мезенхимных стволовых клеток, выделенных из эмбриональных стволовых клеток человека линии SC7. Цитология. Т. 64. № 5. С. 411. (Koltsova A.M., Zenin V.V., Turilova V.I., Shatrova A.N., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G. 2022. The derivation and characterization of different populations of mesenchymal stem cells, isolated from embryonic stem cells line – SC7. Tsitologiya. V. 64. № 5. P. 411.)
<https://doi.org/10.31857/S0041377122050054>
- 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. С. 5. (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. V. 54. P. 5)
- Луппа Х. 1980. Методы гистохимического выявления неорганических веществ. В кн.: Основы гистохимии. М.: Мир. С. 267. (Luppa H. 1980. Methods of histochemical detection of inorganic substances. In: Fundamentals of histochemistry. Moscow: Mir. P. 267.)
- Мусорина А.С., Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2019. Характеристика неиммортилизованной линии мезенхимных стволовых клеток, выделенных из эпикардальной жировой ткани человека. Цитология. Т. 61. № 4. С. 272. (Musorina A.S., Zenin V.V., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G. 2019. Characterization of a nonimmortalized mesenchymal stem cell line isolated from human epicardial adipose tissue. Cell Tiss. Biol. V. 13. P. 247.)
- Полянская Г.Г. 2000. Закономерности кариотипической изменчивости в клеточных культурах при длительном культивировании в разных условиях (обзор). Успехи современной биологии. Т. 120. С. 529. (Poljanskaya G.G. 2000. The regularity of karyotypic variability in cell cultures during long-term cultivation under different conditions (review). Successes of the modern biol. V. 120. P. 529.)
- Полянская Г.Г. 2018. Сравнительный анализ характеристик линий мезенхимных стволовых клеток человека, полученных в коллекции культур клеток позвоночных (обзор). Клеточные культуры. № 34. С. 3. (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". V. 34. P. 3.)
- Полянская Г.Г., Вахтин Ю.Б. 2003. Кариотипическая структура клеточных популяций *in vitro* как целостная система (обзор). Цитология Т. 45. № 2. С. 115. (Poljanskaya G.G., Vakhtin Yu.B. 2003. The karyotypic structure of cell populations *in vitro* as integral system (review). Tsitologiya. V. 45. № 2. P. 115.)
- Седова Г.П. 2008. Количественные аспекты злокачественного роста. Математическая морфология. Электронный математический и медико-биологический журнал. Т. 7. (Sedova G.P. 2008. Quantitative aspects of malignant body height. Mathematical morphology. Electronic Math. Med. Biol. J. V. 7.) URL: <http://sgma.alpha-design.ru/MMORPH/N-18-html/sedova/sedova.htm>
- Хейфлик Л. 1997. Смертность и бессмертие на клеточном уровне. Биохимия. Т. 62. № 11. С. 1380. (Hayflick L. 1997. Mortality and immortality at the cellular level. Biochemistry. V. 62. № 11. P. 1380.)
- Aksu A., Rubin J., Dudas J., Marra K. 2008. Role of gender and anatomical region on induction of osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. Ann. Plast. Surg. V. 60. P. 306.
<https://doi.org/10.1097/SAP.0b013e3180621ff0>
- Antonucci I., Stupia 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. V. 20. P. 789.
<https://doi.org/10.3727/096368910X539074>
- Barkholt L., Flory E., Jekerle V., Lucas-Samuel S., Ahnert P., Bisset L., Büscher D., Fibbe W., Foussat A., Kwa M., Lantz O., Mačulaitis R., Palomäki T., Schneider C.K., Sensebé L., Tachdjian G., Tarte K., Tosca L., Salmikangas P. 2013. Risk of tumorigenicity in mesenchymal stromal cell-based therapies-bridging scientific observations and regulatory viewpoints. Cytother. V. 15. P. 753.
<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.03.005>
- Benn P.A. 1976. Specific chromosome aberrations in senescent fibroblast cell lines derived from human embryos. Am. J. Hum. Genet. V. 28. P. 465.
- 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. V. 9. P. 226.
<https://doi.org/10.1007/s12015-012-9418-z>
- Chen Y., Wang X., Wu Z., Jia S., Wan M. 2023. Epigenetic regulation of dental-derived stem cells and their application in pulp and periodontal regeneration. Biochem., Biophys. Mol. Biol. V. 11: e14550.
<https://doi.org/10.7717/peerj14550>
- 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*. V. 9. P. 798.
<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.02.074>
- Ding D.C., Chang Y.H., Shyu W.C., Lin S.Z.* 2015. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy. *Cell Transplant*. V. 24. P. 339.
<https://doi.org/10.3727/096368915X686841>
- 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*. V. 8. P. 315.
<https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- 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*. V. 6: 24295.
<https://doi.org/10.1038/srep24295>
- Jayasinghe M., Prathiraja O., Prashan B., Jena R., Silva M., Weerawarna P., Singhal M., Kayani A., Karnakoti S., Jain S.* 2022. The role of mesenchymal stem cells in the treatment of type 1 diabetes. *Cureus*. V. 14: e27337.
<https://doi.org/10.7759/cureus.27337>
- Jin Q., Yuan K., Lin W., Niu C., Ma R., Huang Z.* 2019. Comparative characterization of mesenchymal stem cells from human dental pulp and adipose tissue for bone regeneration potential. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol*. V. 47. P. 1577.
<https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1594861>
- Hatore A., Fujii Y., Kawase-Koga Y., Ogasawara T., Chikira J., Minami S., Yamakawa D., Chikazu D.* 2023. VCAM-1 and GFPT-2: predictive markers of osteoblast differentiation in human dental pulp stem cells. *Bone*. V. 166: 116575.
<https://doi.org/10.1016/j.bone.2022.116575>
- Hezan K., Mo R., Wang C., Yue L., Zongjin L.* 2022. Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells and their secretomes in pneumonia. *Curr. Pharm. Biotechnol*. V. 23. P. 1153.
<https://doi.org/10.2174/1389201022666210907115126>
- Hoang D., Pham P., Bach T., Ngo A., Nguyen Q., Phan T., Nguyen G., Le P., Hoang V., Forsyth N., Heke M., Nguyen L.* 2022. Stem cell-based therapy for humn diseases. *Signal Transduct. Target. Ther*. V. 7. P. 272.
<https://doi.org/10.1038/s41392-022-01134-4>
- 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. *Tiss. Eng. (A)*. V. 16. P. 1491.
<https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2009.0431>
- Kerkis I., Caplan A.I.* 2012. Stem cells in dental pulp of deciduous teeth. *Tiss. Eng. Part B Rev*. V. 18. P. 129.
<https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2011.0327>
- Li J., Xu S.-Q., Zhao Y.-M., Yu S., Ge L.-H., Xu B.-H.* 2018. Comparison of the biological characteristics of human mesenchymal stem cells derived from exfoliated deciduous teeth, bone marrow, gingival tissue, and umbilical cord. *Mol. Med. Rep*. V. 18. P. 4969.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9501>
- Liu A., Zhang X., He H., Zhou Li., Naito Y., Sugita S., Lee J.-W.* 2020. Therapeutic potential of mesenchymal stem/stromal cell-derived secretome and vesicles for lung injury and disease. *Expert Opin. Biol. Ther*. V. 20. P. 125.
<https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1689954>
- 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*. V. 15. P. 1527.
<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.04.010>
- 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*. V. 112. P. 1353.
<https://doi.org/10.1002/jcb.23052>
- Matsumura T., Zerrudo Z., Hayflick L.* 1979. Senescent human diploid cells in culture: survival, DNA synthesis and morphology. *J. Gerontol*. V. 34. P. 328.
<https://doi.org/10.1093/geronj/34.3.328>
- Mou C., Wang X., Li W., Li Z., Liu N., Xu Y.* 2023. Efficacy of mesenchymal stromal cells intraspinal transplantation for patients with different degrees of spinal cord injury: a systematic review and meta-analysis. *Cytotherapy*. V. 25. P. 530.
<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2023.01.012>
- McGowan-Jordan J., Simons A., Schmid M.* 2016. An international system for human cytogenetic nomenclature. Basel: S. Karger. 140 p.
- Navarro L., Chen X., Viviescas L.T., Ardila-Roa A., Luna-Gonzalez M., Sossa C., Arango-Rodriguez M.* 2022. Mesenchymal stem cells for critical limb ischemia: their function, mechanism, and therapeutic potential. *Stem Cell Res. Ther*. V. 13. P. 345.
<https://doi.org/10.1186/s13287-022-03043-3>
- Ozkinay C., Mitelman F.* 1979. A simple trypsin-Giemsa technique producing simultaneous G- and C-banding in human chromosomes. *Hereditas*. V. 90. P. 1.
<https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1979.tb01287.x>
- Payne K., Didiano D., Chu C.* 2010. Donor sex and age influence the chondrogenic potential of human femoral bone marrow stem cells. *Osteoarthritis Cartilage*. V. 18. P. 705.
<https://doi.org/10.1016/j.joca.2010.01.011>
- Pischiutta F., Caruso E., Cavaleiro H., Salgado A., Loane D., Zanier E.* 2022. Mesenchymal stromal cell secretome for traumatic brain injury: Focus on immunomodulatory action. *Exp. Neurol*. V. 357: 114199.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2022.114199>
- Poljanskaya G., Bobkov D., Koltsova A., Musorina A., Mikhailova N.* 2022. Creation, working principles, development of applied and scientific activities of the Collection of Cell Cultures of Vertebrate. (review). *Biol. Commun*. V. 67. P. 312.
<https://doi.org/10.21638./spbu03.2022.406>
- Rahmani-Moghadam E., Zarrin V., Mahmoodzadeh A., Owrang M., Talaei-Khozani T.* 2022. Comparison of the characteristics of Breast Milk derived stem cells with the stem cells derived

- from the other sources: a comparative review. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* V. 17. P. 71.
<https://doi.org/10.2174/1574888X16666210622125309>
- 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.* V. 98. P. 2615.
<https://doi.org/10.1182/blood.v98.9.2615>
- 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.* V. 5. P. 378.
<https://doi.org/10.1007/s12015-009-9094-9>
- Scibetta A., Morris E., Liebowitz A., Gao X., Lu A., Philippon M., Huard J.* 2019. Characterization of the chondrogenic and osteogenic potential of male and female human muscle-derived stem cells: Implication for stem cell therapy. V. 37. P. 1339.
<https://doi.org/10.1002/jor.24231>
- Semenova E., Grudniak M.P., Machaj E.K., Bocian K., Chroscinska-Krawczyk M., Trochonowicz M., Stepaniec I.M., Murzyn M., Zagorska K.E., Boruczkowski D., Kolanowski T.J., Oldak T., Rozwadowska N.* 2021. Mesenchymal stromal cells from different parts of umbilical cord: approach to comparison and characteristics. *Stem Cell Rev. Rep.* V. 17. P. 1780.
<https://doi.org/10.1007/s12015-021-10157-3>
- Sensebé L., Krampera M., Schrezenmeier H., Bourin P., Giordano R.* 2010. Mesenchymal stem cells for clinical application. *Vox Sang.* V. 98. P. 93.
<https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2009.01227.x>
- Sharma Y., Shobha K., Sundeep M., Pinelli V., Parveen S., Dhannushkodi A.* 2022. Neural basis of dental pulp stem cells and its potential application in Parkinson's disease. *CNS Neurol. Disord. Targets.* V. 21. P. 62.
<https://doi.org/10.2174/1871527320666210311122921>
- Shin S., Lee J., Kwon Y., Park K.-S., Jeong J.-H., Choi S.-J., Bang S., Chang J., Lee C.* 2021. Comparative proteomic analysis of the mesenchymal stem cells secretome from adipose, bone marrow, placenta and Wharton's jelly. *Int. J. Mol. Sci.* V. 22. P. 845.
<https://doi.org/10.3390/ijms22020845>
- Sousa A., Coelho P., Leite F., Teixeira C., Rocha A., Santos I., Baylina P., Fernandes R., Soares R., Costa R., Gomes A.* 2023. Impact of umbilical cord mesenchymal stromal/stem cell secretome and cord blood serum in prostate cancer progression. *Hum. Cell.* V. 36. P. 1160.
<https://doi.org/10.1007/s13577-023-00880-z>
- Stanko P., Kaiserova K., Altanerova V., Altaner C.* 2014. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from dental pulp, bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue by gene expression. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* V. 158. P. 373.
<https://doi.org/10.5507/bp.2013.078>
- 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.* V. 2016: 3595941.
<https://doi.org/10.1155/2016/3595941>
- Tai C., Wang L., Xie Y., Gao T., Huang F., Wang B.* 2021. Analysis of key distinct biological characteristics of human placenta-derived mesenchymal stromal cells and individual heterogeneity attributing to donors. *Cell Tiss. Organs.* V. 210. P. 45.
<https://doi.org/10.1159/000513038>
- Tesiye M., Gol M., Fadardi M., Kani S., Costa A., Ghasemi-Kasman M., Biagini G.* 2022. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in the treatment of epilepsy and their interaction with antiseizure medications. *Cells.* V. 11. P. 4129.
<https://doi.org/10.3390/cells11244129>
- Topoluk N., Hawkins R., Tokish J., Mercuri J.* 2017. Amniotic mesenchymal stromal cells exhibit preferential osteogenic and chondrogenic differentiation and enhanced matrix production compared with adipose mesenchymal stromal cells. *Am. J. Sports Med.* V. 45. P. 2637.
<https://doi.org/10.1177/0363546517706138>
- Turano E., Scambi I., Virla F., Bonetti B., Mariotti R.* 2023. Extracellular vesicles from mesenchymal stem cells: towards novel therapeutic strategies for neurodegenerative diseases. *Int. J. Mol. Sci.* V. 24. P. 2917.
<https://doi.org/10.3390/ijms24032917>
- Wu W., Zhou J., Xu C.-T., Zhang J., Jin Y.-J., Sun G.-L.* 2022. Derivation and growth characteristics of dental pulp stem cells from patients of different ages. *Mol. Med. Rep.* V. 12. P. 5127.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4106>
- Yi X., Liu F., Chen F., Wang Y., Gao Y.* 2022. Comparison of biological characteristics of placenta mesenchymal stem cells derived from fetus. *Chin. J. Biotechnol.* V. 38. P. 1183.
<https://doi.org/10.13345/j.cjb.210244>
- Yang K., Lu R., Lu J., Fan S., Zhang Q., Lou Z., Ma Y., Lu G., Pan R., Zhang J.* 2022. Phenotypic and functional characterizations of mesenchymal stem/stromal cells isolated from human cranial bone marrow. *Front Neurosci.* V. 16: 909256.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2022.909256>
- Yigitbilek F., Conley S.M., Tang H., Saadiq I.M., Jordan K.L., Lerman L.O., Taner T.* 2021. Comparable in vitro function of human liver-derived and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells: implications for cell-based therapy. *Front. Cell Dev. Biol.* V. 9: 641792.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.641792>
- Zhang Z., Yang X., Cao X., Qin A., Zhao J.* 2022. Current applications of adipose-derived mesenchymal stem cells in bone repair and regeneration: a review of cell experiments, animal models, and clinical trials. *Front. Bioeng. Biotechnol.* V. 10: 942128.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.942128>
- Zou D., Vigen M., Putman A., Cao C., Tarle S., Guinn T., Kaigler D.* 2022. Phenotypic, trophic, and regenerative properties of mesenchymal stem cells from different osseous tissues. *Cell Tiss. Res.* V. 388. P. 75.
<https://doi.org/10.1007/s00441-021-03563-z>

The Derivation and Comparative Characterization of Mesenchymal Stem Cell Lines, Isolated from Human Pulp of a Deciduous Tooth of Children of Different Sexes

A. S. Musorina^{a, *}, V. I. Turilova^a, A. N. Shatrova^a, T. K. Yakovleva^a, and G. G. Poljanskaya^{a, **}

^a*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia*

^{*}*e-mail: anam18@inbox.ru*

^{**}*e-mail: gpolanskaya@gmail.com*

Two new non-immortalized fibroblast-like cell lines isolated from the pulp of Deciduous Tooth of Children of Different Sexes, named MSC-DP-1 and MSC-DP-2, were derived and characterized. In order to confirm the status of mesenchymal stem cells, a comparative analysis of some characteristics in these lines was carried out at early and late passages. In the process of long-term cultivation, significant interline differences were revealed in the nature of replicative senescence (RS) and in growth characteristics. The MSC-DP-1 line was characterized by a later entry into the active stage of RS and more active proliferation compared to the MSC-DP-2 line. Karyotypic analysis showed that both lines have a normal human diploid karyotype at early passages. At the late (18th passage), in the stage of active PS, the MSC-DP-2 line also has a normal karyotype. And the MSC-DP-1 line, which enters the active stage of RS much later (at passage 42), has an abnormal karyotype with a large number of clonal chromosomal rearrangements. Both lines showed a high proportion of cells carrying antigens characteristic of human MSCs: CD44, CD73, CD90, CD105, HLA-ABC, and a low frequency of cells with CD34, CD45, and HLA-DR antigens. The cells of the derived lines at an early passage have the ability to differentiate in adipogenic, osteogenic and chondrogenic directions. But the MSC-DP-2 line shows weaker differentiation in the adipogenic direction, than the MSC-DP-1 line. In the process of RS, a significant weakening of adipogenic differentiation takes place in the MSC-DP-1 line, and it disappears in the MSC-DP-2 line. The activity of other differentiations does not change during RS. In general, the derived results confirm the status of MSCs for the derived lines and indicate interline differences in the RS process. However, the derived differences between these lines, as well as the comparison with the previously derived line MSC-DP do not indicate their gender nature. Apparently, they are associated with the genetic characteristics of different donors.

Keywords: human mesenchymal stem cells, replicative senescence, proliferative activity, cell surface markers, karyotype, differentiation