

## ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПУПОЧНОГО КАНАТИКА ЧЕЛОВЕКА ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ *IN VITRO*

А.А. Айзенштадт<sup>1,3</sup>, М.А. Сказина<sup>3</sup>, Е.А. Котелевская<sup>3</sup>, Л.В. Елсукова<sup>3</sup>, Т.Л. Золина<sup>3</sup>, Н.В. Пономарцев<sup>2</sup>,  
Н.К. Галактионов<sup>2</sup>, И.А. Галембо<sup>3</sup>, Д.А. Иволгин<sup>1,3</sup>, И.И. Масленникова<sup>1,3</sup>, Н.И. Енукашвили<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>2</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>3</sup> Покровский банк стволовых клеток, Санкт-Петербург, Россия

Для цитирования: Айзенштадт А.А., Сказина М.А., Котелевская Е.А., и др. Характеристики мезенхимных стромальных клеток пупочного канатика человека при длительном культивировании *in vitro* // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. – 2018. – Т. 10. – № 1. – С. 11–19. doi: 10.17816/mechnikov201810111-19

Поступила в редакцию: 03.03.2018

Принята к печати: 30.03.2018

♦ Мезенхимные стромальные клетки (МСК) считаются одним из наиболее перспективных ресурсов для регенеративной терапии из-за простоты выделения, высокой пролиферативной активности и широкого спектра продуцируемых ими биологически активных веществ (цитокины, факторы роста и др.). Использование МСК в клинической практике связано с необходимостью их культивирования, в ходе которого могут значительно изменяться свойства и характеристики клеток. Наша работа была посвящена изучению возможности спонтанной трансформации и изменений морфофункциональных свойств мезенхимных стромальных клеток человека в условиях *ex vivo*. При скрининге более 200 первичных культур МСК различного тканевого происхождения удалось получить одну длительно пролиферирующую культуру (на 59-м пассаже, более 6 мес. культивирования). В течение всего периода культивирования клетки сохраняли нормальный кариотип, морфологию, иммунофенотип и дифференцировочный потенциал МСК. В результате оценки изменения длины теломер, по отсутствию теломеразной активности и окраске на SA-β-gal было выявлено старение культуры, которое начиналось после 28-го пассажа. Таким образом, показано, что при долгосрочном культивировании МСК сохраняют свои характеристики и подвержены клеточному старению.

♦ **Ключевые слова:** мезенхимные стромальные клетки (МСК); онкотрансформация; старение культуры.

## CHARACTERIZATION OF UMBILICAL CORD MESENCHYMAL STROMAL CELLS DURING LONG-TERM EXPANSION *IN VITRO*

А.А. Aizenshtadt<sup>1,3</sup>, М.А. Skazina<sup>3</sup>, Е.А. Kotelevskaya<sup>3</sup>, Л.В. Yelsukova<sup>3</sup>, Т.Л. Zolina<sup>3</sup>, Н.В. Ponomartsev<sup>2</sup>,  
Н.К. Galaktionov<sup>2</sup>, И.А. Galembo<sup>3</sup>, Д.А. Ivogin<sup>1,3</sup>, И.И. Maslennikova<sup>1,3</sup>, Н.И. Eukashvily<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia;

<sup>2</sup> Institute of Cytology RAS, Saint Petersburg, Russia;

<sup>3</sup> Stem Cell Bank Pokrovsky, Saint Petersburg, Russia

For citation: Aizenshtadt AA, Skazina MA, Kotelevskaya EA, et al. Characterization of umbilical cord mesenchymal stromal cells during long-term expansion *in vitro*. *Herald of North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov*. 2018;10(1):11-19. doi: 10.17816/mechnikov201810111-19

Received: 03.03.2018

Accepted: 30.03.2018

♦ One of the clinicians' major concerns is the biological safety of MSC. The critical question for clinical application of human MSC is their ability to undergo spontaneous malignant transformation in a recipient organism. The goal of our research was to study umbilical cord hMSC proliferative and differentiation capacities, karyotype stability, telomerase activity and telomere length, oncomarkers expression and tumorigenicity during long-term (6 months) cultivation *ex vivo*.

Here we report on the establishing the primary culture of human umbilical cord MSC, MSC\_0714, that was capable to proliferate *ex vivo* for up to 59 passages (6 months). During this period, the cells preserved their normal karyotype, morphology and MSC immunophenotype. Telomeres started to shorten only after the passage 20, while hTERT was inactive in these cells for the whole period of expansion. At the beginning of cultivation the number of SA- $\beta$ -gal positive cells did not exceeded 3-5%, after the 22th passage their number started to increase and reached 49% at the passage 57. Thus, it was shown that MSC during long-term culture retain their characteristics and undergo cell senescence.

♦ **Keywords:** mesenchymal stem cells (MSC); oncotransformation; cell culture senescence.

## Введение

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) представляют собой высокопролиферативные мультипотентные клетки. В соответствии с минимальными критериями Международного общества клеточной терапии МСК человека — это клетки с фибробластоподобной морфологией, обладающие способностью к адгезии к культуральному пластику, дифференцировочным потенциалом и следующим иммунофенотипом: CD105<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup> и CD90<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD14<sup>-</sup>, CD11b<sup>-</sup>, CD79<sup>-</sup>, CD19<sup>-</sup> и HLA-DR [1]. В настоящее время МСК считаются одним из наиболее перспективных ресурсов для регенеративной терапии из-за простоты выделения, высокой пролиферативной активности и широкого спектра продуцируемых ими биологически активных веществ (цитокины, факторы роста и др.).

Использование МСК в клинической практике связано с необходимостью их культивирования *ex vivo*, в ходе которого могут значительно изменяться свойства и характеристики клеток. Это в свою очередь может влиять на безопасность и эффективность их применения. МСК человека после выделения из тканей для клинического применения культивируют *ex vivo* в течение короткого периода времени (2–4 пассажа, 1 месяц), чтобы избежать риска бактериального заражения, хромосомных aberrаций и злокачественной трансформации. В ранее опубликованных работах старение культур МСК человека с прекращением пролиферации клеток фиксировали не позднее 30-го пассажа [7–10]. МСК возможно получить из различных тканевых источников: костного мозга, жировой ткани, плаценты и пуповины, пульпы зуба и т. д. Плацента и пуповина служат удобным источником для выделения МСК за счет неинвазивного способа получения ткани и более высокой пролиферативной активности МСК пуповины [2, 3, 11, 12]. Однако небольшая часть МСК может оставаться в тканях реципиента длительное время. Хотя стромальные клетки имеют решающее значение для восстановления тканей, в не-

скольких исследованиях указывается, что они также могут участвовать в злокачественной трансформации и иницировании рака, как показано у мышей [4, 5].

**Целью** наших исследований было изучение способности пролиферации и дифференцировки МСК периваскулярного пространства пупочного канатика (МСК ПК) с оценкой стабильности кариотипа, активности теломеразы и длины теломер. Нам удалось получить одну длительно пролиферирующую культуру (на 59-м пассаже, более 6 мес. культивирования), иммунофенотип и кариотип которой оставались постоянными на протяжении всего периода культивирования.

## Материалы и методы

**Выделение и культивирование периваскулярного пространства пупочного канатика.** Образцы пупочных канатиков были получены при неосложненных родах. Забор биологического материала производили только при наличии информированного согласия доноров или их законных представителей. МСК выделяли по описанной ранее методике [12]: пупочную вену канатика промывали раствором Версена, заполняли 0,1 % раствором коллагеназы I и IV типов (Sigma, США) и инкубировали в течение 30 мин при 37 °С. Затем вену промывали фосфатно-солевым буфером, повторно заполняли раствором коллагеназ и инкубировали в течение 30 мин при 37 °С. Полученную взвесь клеток отмывали от фермента центрифугированием (300 g, 10 мин). Клетки переносили в полную ростовую среду, которая состояла из Advanced Stem Cell Medium и 20 % заменителя сыворотки NuClone (США) с добавлением антибиотика пенициллина и антимикотика стрептомицина (оба — Gibco, США), затем высевали в культуральные флаконы (TPP, Швейцария) при плотности 100–400 тыс. кл/см<sup>2</sup>. Клетки культивировали в условиях гипоксии (7 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>). Смену среды проводили через 3 сут. Пересев (пассирование) клеток при достижении конfluence-

ности (плотности культуры) 70–80 % осуществляли по стандартным методикам.

Время удвоения популяции (*PDT*) рассчитывали следующим образом:

$$PDT = (t_2 - t_1) / 3,32 \cdot (\log n_2 - \log n_1),$$

где  $(t_2 - t_1)$  — время (*h*) между пассажами;  $n_2, n_1$  — количество клеток на каждом пассаже.

**Иммунофенотипирование.** Экспрессию поверхностных антигенов анализировали с использованием меченных флуорохромом антител против CD34, CD45, CD90, CD105, CD73, CD13, CD10, CD44, CD14, CD117 (все из BD Bioscience, США) с помощью проточного цитометра FC500 (Beckman Coulter, США) в соответствии с инструкциями производителя. МСК промывали последовательно 0,02 % ЭДТА и 0,25 % раствора трипсина. Трипсинизацию останавливали добавлением 10 % заменителя сыворотки (HyClone) в PBS. Полученную суспензию дважды промывали и ресуспендировали в 150 мкл PBS для окрашивания антителами и последующего анализа с помощью проточной цитометрии.

**Окраска на  $\beta$ -галактозидазу (SA- $\beta$ -gal).**  $\beta$ -Галактозидазу, ассоциированную со старением (SA- $\beta$ -gal), выявляли в клетках в соответствии со стандартным протоколом. При использовании данного протокола клетки с активной формой SA- $\beta$ -gal окрашиваются в синий цвет. Клетки выращивали до 60–70 % конfluence, затем промывали в PBS, фиксировали 4 % параформальдегидом в фосфатно-солевом буфере и окрашивали раствором SA- $\beta$ -gal в течение 16 часов. Реакцию останавливали путем удаления окрашивающего раствора и промывки клеток дистиллированной водой. Полученные препараты анализировали с помощью фазо-контрастного микроскопа Axioscope (Zeiss, Germany). Подсчитывали число окрашенных клеток. В каждом препарате анализировали не менее 20 полей зрения.

**Оценка дифференцировочного потенциала.** Дифференцировочный потенциал МСК ПК оценивали с помощью набора Human Mesenchymal Stem Cell Functional Identification Kit (R & D Systems, США) в соответствии с протоколом производителя. Клетки высевали при плотности  $2 \cdot 10^4$  клеток/см<sup>2</sup>. Адипогенез индуцировали, когда клетки достигали 100 % конfluence. Остеогенную и хондрогенную дифференцировку МСК индуцировали при достижении 60–70 % конfluence монослоя. Присутствие адипоцитов в культурах МСК выявляли окрашиванием жировым крас-

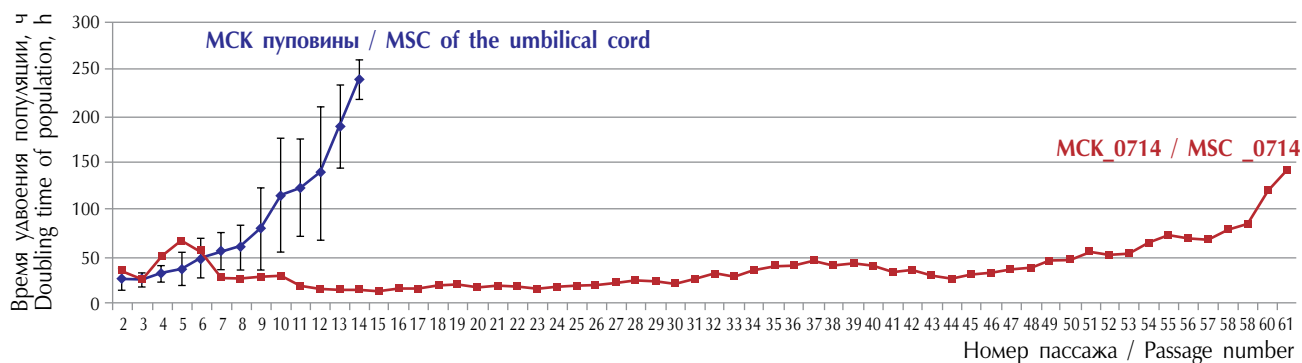
ным О (Bio-Optica), прохождение остеогенной дифференцировки — по окрашиванию отложенного кальция в остеocyтах ализариновым красным С (Chemicon), хондрогенной дифференцировки — с помощью окраски альциановым синим.

**Кариотипирование.** Для проведения кариотипирования препараты метафазных хромосом, полученные по стандартным методикам, окрашивали раствором Hoechst 33258 с последующим контрастированием актиномицином D при уровне разрешения 450–550 сегментов (ISCN). Анализ проводили с помощью микроскопа AxioScore A1, Carl Zeiss и программного обеспечения Ikaros, Meta Systems (Германия).

**Определение длины теломер и активности теломеразы.** Изменение длины теломер в ходе культивирования оценивали методом измерения флуоресцентной *in situ* гибридизации с помощью проточной цитометрии (Flow-FISH). Анализ проводили с использованием коммерческого набора Telomere PNA Kit/FITC for Flow Cytometry (Daco, США) на проточном цитометре Beckman Coulter FC500 в соответствии с инструкцией производителя. В качестве положительного контроля использовали клетки линий 1301 и KB с удлинёнными теломерами. Активность теломеразы в культуре определяли с помощью протокола амплификации теломерных повторов (telomeric repeat amplification protocol, TRAP) с использованием коммерческого набора TRAPEZE® RT Telomerase Detection Kit (Millipore) согласно инструкции производителя. В качестве отрицательного контроля применяли термически инактивированные образцы анализируемой длительно культивируемой культуры, в качестве положительного контроля — рекомендованные производителем набора клетки линий 1301 и KB с удлинёнными теломерами и активной теломеразой. Клетки использовали в количестве  $3 \cdot 10^6$  клеток на реакцию.

## Результаты

**Морфология клеток и продолжительность пролиферации клеток *in vitro*.** Проанализировано более 200 культур МСК ПК. Большинство из них могли быть пассированы не более 5–7 раз (рис. 1). Среди проанализированных культур обнаружена культура МСК ПК (МСК\_0714) со способностью к длительному культивированию *in vitro*, клетки которой сохраняли пролиферативную активность в течение 59 пассажей. В начале культивирования ростовые характеристики данной культуры



**Рис. 1.** Среднее время удвоения популяции мезенхимных стромальных клеток пупочного канатика. Синяя линия — среднее время удвоение популяции мезенхимных стромальных клеток в 204 культурах. Красная линия — время удвоения популяции мезенхимных стромальных клеток \_0714. По оси абсцисс — количество пассажей, по оси ординат — время удвоения популяции. Данные представлены в виде среднего значения с отложенным стандартным отклонением

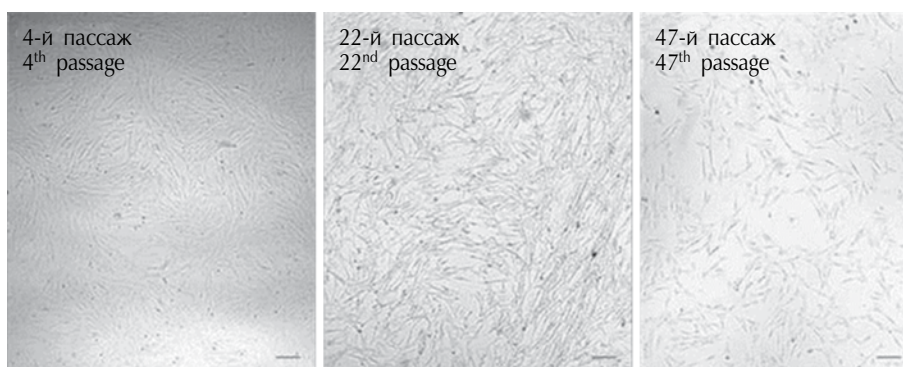
**Fig. 1.** Average time doubling of the population of mesenchymal stromal cells of umbilical cord. The blue line is the mean time of doubling the population of mesenchymal stromal cells in 204 cultures. The red line is the time of doubling the population of mesenchymal stromal cells \_0714. The abscissa is the number of passages, the ordinate is the time of population doubling. The data are presented as an average value with a deferred standard deviation

были схожими со средними показателями для МСК ПК, к 5-му пассажу время удвоения популяции увеличилось, однако затем скорость прироста популяции вернулась к прежним значениям и была относительно постоянной до 30-го пассажа, плавно увеличиваясь затем до 50-го пассажа. Заметное снижение пролиферативной активности наблюдали только на поздних сроках культивирования (50–60-й пассаж) (см. рис. 1).

В течение всего периода культивирования клетки МСК\_0714 сохраняли типичную для МСК морфологию. При этом в начале культивирования в популяции в основном присутствовали фибробластоподобные клетки размером

25–60 мкм, а также вытянутые веретеновидные клетки с линейными размерами 50–100 мкм. После 40-го пассажа в популяции стали появляться более крупные клетки (100–250 мкм) полигональной формы с большим количеством отростков (рис. 2). Однако мы не обнаружили колоний округлых клеток с уменьшенной адгезией к пластику

**Старение клеток при длительном культивировании.** В начале культивирования содержание SA- $\beta$ -gal-позитивных клеток не превышало 3–5 %. После 50-го пассажа их доля существенно возросла и к 57-му пассажу достигла 49 % (рис. 3). Следует отметить, что основная часть окрашенных клеток на поздних пассажах — по-



**Рис. 2.** Репрезентативные микрофотографии клеток культуры МСК\_0714 на ранних (4-й пассаж), средних (22-й пассаж) и поздних (47-й пассаж) сроках культивирования. Световая микроскопия. Ув.  $\times 400$ . Масштаб (50 мкм) указан на микрофотографиях

**Fig. 2.** Representative micrographs of culture cells MSC\_0714 in early (4<sup>th</sup> passage), medium (22<sup>nd</sup> passage) and late (47<sup>th</sup> passage) cultivation times. Light microscopy. Uv.  $\times 400$ . The scale (50  $\mu$ m) is indicated in micrographs

лигональные крупные клетки. Такая морфология характерна для стареющих МСК.

**Изменение экспрессии поверхностных антигенов при длительном культивировании.** Иммунофенотипирование МСК\_0714 при длительном культивировании выполняли на 2-м и 3-м пассажах, а затем — каждые 3–4 пассажа. На всем протяжении культивирования процентное содержание клеток, экспрессирующих антигены CD90, CD105, CD44, CD73 и отрицательных по экспрессии CD45, CD34, CD117, CD14, практически не изменялось и превышало 90 % (табл. 1). Несмотря на постоянное содержание в популяции клеток с МСК-специфичным иммунофенотипом, анализ интенсивности флуоресценции клеток, экспрессирующих CD90 и CD105, выявил, что с увеличением срока культивирования *in vitro* происходило заметное снижение плотности изучаемых антигенов на поверхности МСК (рис. 4).

**Снижение дифференцировочного потенциала в ходе длительного культивирования мезенхимных стволовых клеток.** Анализировали способность МСК к дифференцировке в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлениях. Эта способность является одной из основных характеристик МСК согласно принятым критериям [1]. Все проанализированные культуры МСК обладали способностью к дифференцировке в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях. Дифференцировочный потенциал клеток культуры МСК\_0714 оценивали каждые 3–7 пассажей начиная с 5-го пассажа. До 28-го пассажа

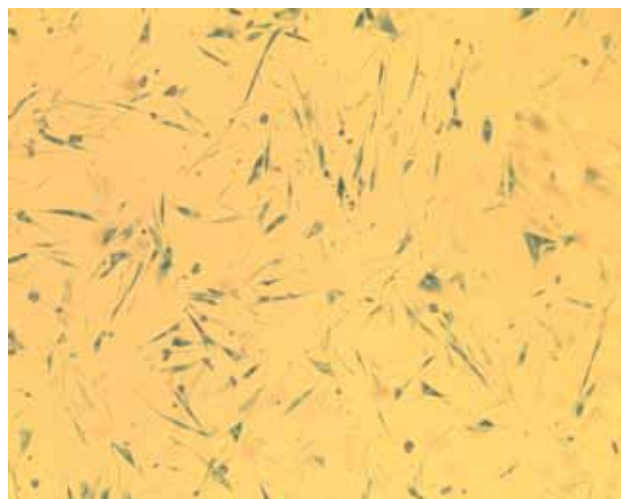


Рис. 3. Культура МСК\_0714 на 48-м пассаже. Синий цвет — клетки с активной SA-β-gal. Световая микроскопия. Ув. ×400. Масштаб указан на микрофотографиях

Fig. 3. Culture MSC\_0714 on the 48<sup>th</sup> passage. Blue — cells with active SA-β-gal. Light microscopy. Uv. ×400. The scale is indicated in micrographs

МСК обладали способностью к дифференцировке в остео-, хондро- и адипогенном направлениях (рис. 5), затем, постепенно утрачивая дифференцировочный потенциал (клетки утратили способность к хондрогенной дифференцировке на 32-м пассаже, адипогенной дифференцировке — на 41-м и остеогенной — на 50-м), к концу культивирования клетки не обладали способностью к дифференцировке, несмотря на сохранение МСК-специфичного иммунофенотипа.

Таблица 1 / Table 1

**Изменение иммунофенотипа клеток МСК\_0714 в зависимости от длительности культивирования**  
Change in immunophenotype of cells MSC\_0714 depending on the duration of cultivation

Антиген	Содержание окрашенных клеток				
	3-й пассаж	10-й пассаж	19-й пассаж	33-й пассаж	57-й пассаж
CD 90	98 ± 2	98 ± 2	99 ± 0,6	98 ± 2	97,5 ± 2,4
CD 105	97,5 ± 1,5	98 ± 1	98 ± 1,2	97 ± 2	96,7 ± 2,32
CD 73	96,5 ± 0,29	97 ± 0,4	98 ± 0,9	97 ± 1	99,3 ± 0,7
CD 10	95,0 ± 1,4	95,0 ± 1,5	94 ± 2	93 ± 4,5	<b>81,8 ± 17,1*</b>
CD 13	99 ± 0,59	98 ± 0,3	99 ± 0,3	94 ± 5	<b>63,6 ± 14,5*</b>
CD 44	96 ± 0,84	96 ± 0,5	96 ± 0,5	96 ± 0,5	99 ± 0,9
HLA-ABC	0	0	0	0	0
CD 45	0,05 ± 0,02	0	0,6 ± 0,5	0	1 ± 0,4
CD14	0	0	0,3 ± 0,5	0,5 ± 0,5	0,8 ± 0,5
CD117	1 ± 0,05	1,1 ± 0,05	1,1 ± 0,05	1,1 ± 0,05	1,5 ± 0,7
CD34	0	0	0	0	2,1 ± 1,8

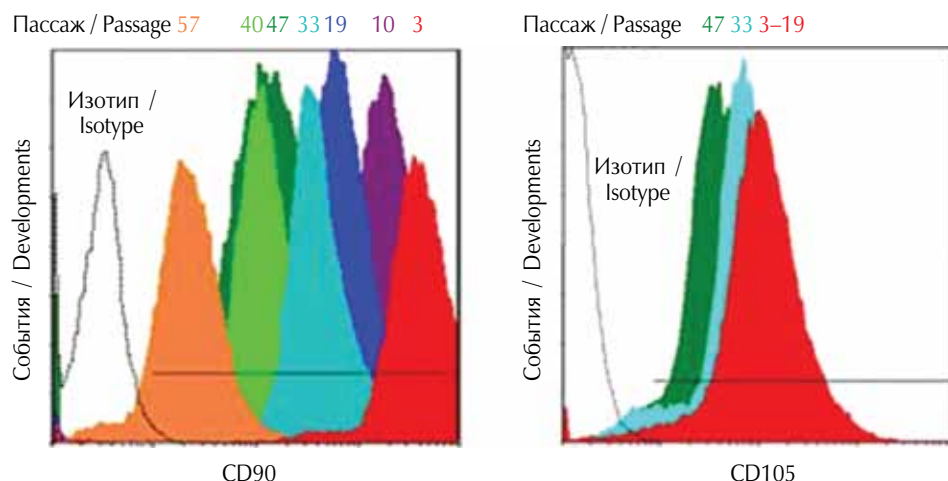


Рис. 4. Интенсивность флуоресценции клеток культуры МСК\_0714, экспрессирующих антигены CD90 и CD105 в зависимости от пассажа

Fig. 4. Intensity of fluorescence of culture cells MSC\_0714, expressing antigens CD90 and CD105 as a function of passage

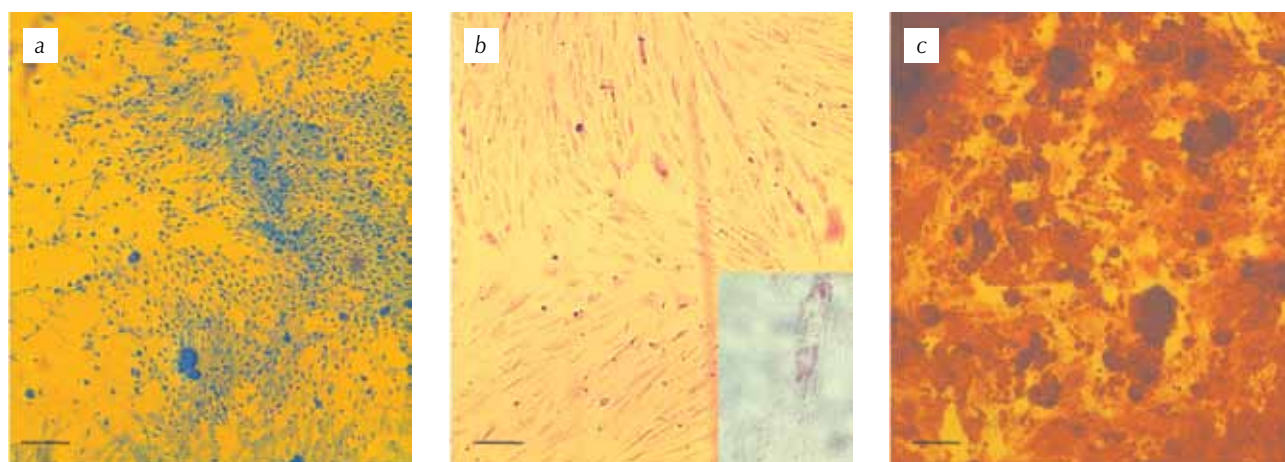


Рис. 5. Вид культур МСК\_0714 28-го пассажа после 2-й недели культивирования в среде, содержащей хондрогенные (а — окрашивание альциановым синим), адипогенные (b — окрашивание жирowym красным O) и остеогенные стимулы (с — окрашивание ализариновым красным). Световая микроскопия. Ув. ×400. Масштаб указан на микрофотографиях

Fig. 5. Type of cultures MSC\_0714 of the 28<sup>th</sup> passage after the second week of cultivation in a medium containing chondrogenic (a — staining with alcian blue), adipogenic (b — staining with fatty red O) and osteogenic stimuli (c — staining with alizarin red). Light microscopy. Uv. ×400. The scale is indicated in micrographs

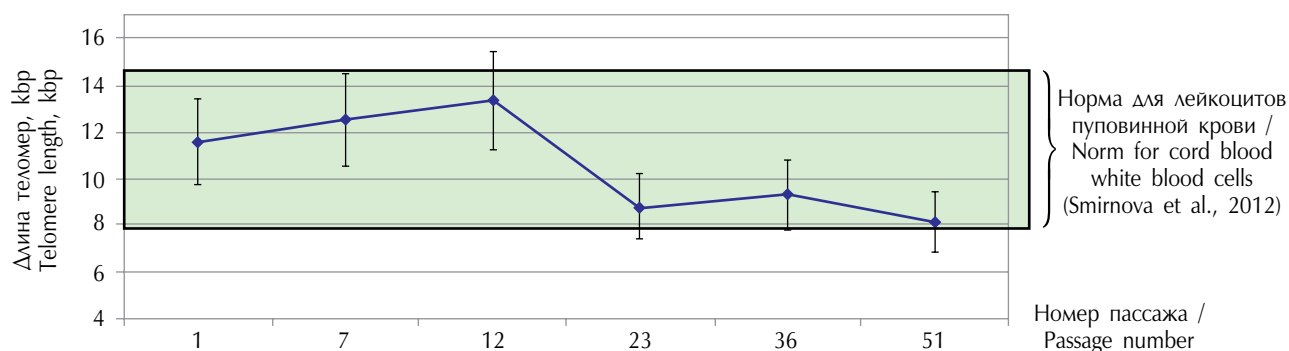


Рис. 6. Изменение длины теломер клеток культур МСК\_0714 в ходе культивирования *in vitro*

Fig. 6. Change in telomere length of cell cultures of MSK\_0714 during *in vitro* culture

**Сокращение длины теломер при неактивной теломеразе в МСК\_0714 в ходе длительного культивирования.** Для культуры МСК\_0714 была проведена оценка изменения длины теломер в ходе культивирования. До 23-го пассажа МСК характеризовались стабильной длиной теломер, которая затем сокращалась в среднем на 30 %, однако оставалась в пределах, описанных для некультивированных клеток пуповинной крови (рис. 6).

Активность теломеразы в клетках МСК\_0714 оценивали на всем протяжении культивирования каждые пять пассажей. На всем протяжении культивирования не было выявлено признаков активации теломеразы (рис. 7).

**Сохранение стабильного кариотипа мезенхимных стволовых клеток при длительном культивировании.** Для оценки кариотипа каждого образца МСК анализировали 20 метафазных пластинок на четырех и более поздних пассажах в зависимости от длительности поддержания пролиферативного потенциала. Для культуры МСК\_0714 кариотипирование проводили на 5, 9, 17, 24, 33, 50 и 59-м пассажах. Показано, что МСК\_0714 на всем протяжении культивирования сохраняли стабильный кариотип без изменения количества и структуры хромосом в течение всего срока культивирования (рис. 8).

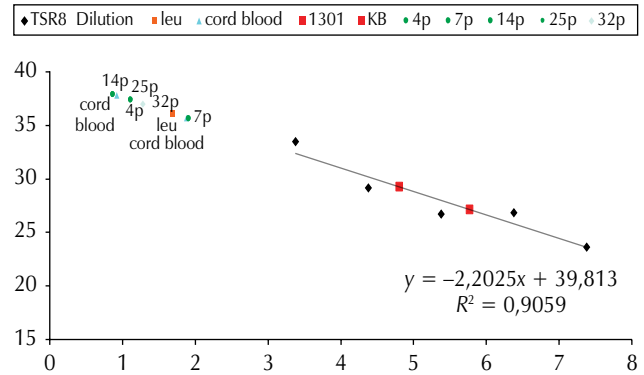


Рис. 7. Активность теломеразы в клетках МСК\_0714. KB и 1301 — положительный контроль, клетки с высокоактивной теломеразой hTERT

Fig. 7. Activity of telomerase in the cells of MSK\_0714. KV and 1301 — positive control, cells with high-activity telomerase hTERT

### Обсуждение

МСК человека обладают высоким пролиферативным потенциалом. Однако скорость пролиферации может меняться в зависимости от источника выделения [12]. Такая высокая пролиферативная активность является одновременно достоинством и недостатком. С одной стороны, высокий пролиферативный потенциал клеток позволяет получить их в количествах, достаточ-

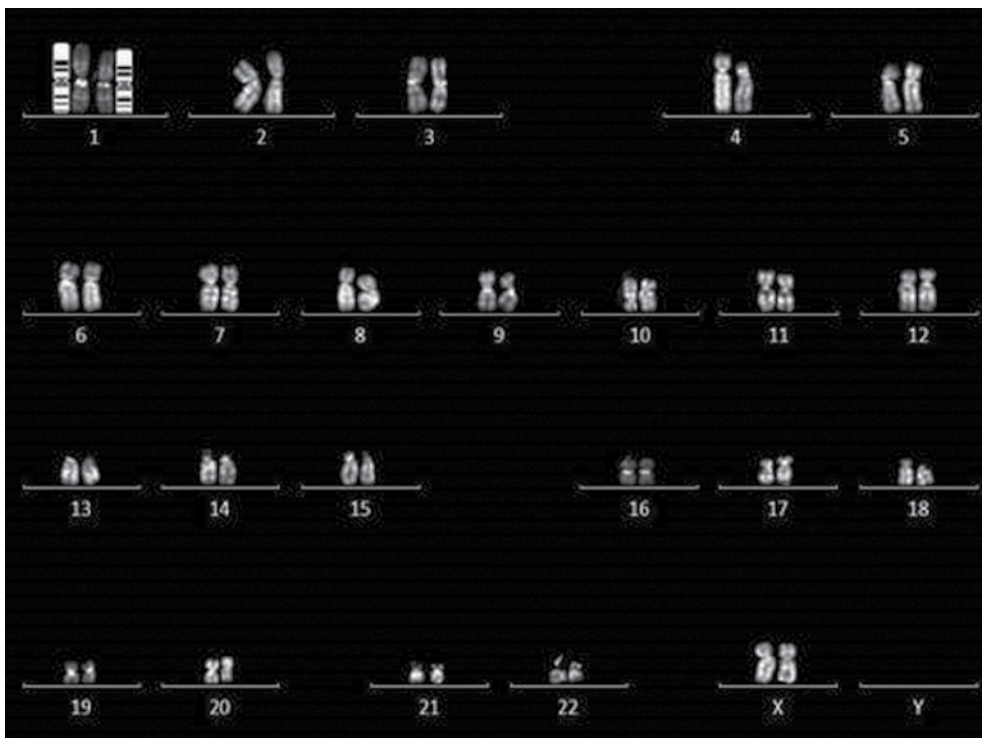


Рис. 8. Кариотип МСК\_0714 через 5 мес. после начала культивирования (50-й пассаж)

Fig. 8. Karyotype MSC\_0714 at 5 months after the beginning of cultivation (50<sup>th</sup> passage)

ных для трансплантации, с другой — вызывает опасения по поводу возможности спонтанной онкогенной трансформации. Аллогенные (донорские) трансплантированные МСК удаляются из организма реципиента в течение примерно 1 мес. Небольшая часть клеток остается и пролиферирует в течение более длительного периода [6, 13].

В культуре большинство образцов МСК пролиферируют в течение 1–2 мес. и далее вступают в процесс клеточного старения. Клетки МСК\_0714 интенсивно пролиферировали и сохраняли иммунофенотип на протяжении 21–25 пассажей (3 мес. роста в культуре). В продолжение 4 мес. последующего роста в культуре выраженность признаков клеточного старения (активность SA- $\beta$ -gal, ассоциированной со старением и укорочением теломер) нарастала. По нашим данным, на основе анализа научных публикаций (база данных PubMed) в ходе реализации проекта впервые была получена культура МСК, клетки которой обладали способностью к длительному культивированию *in vitro* — в течение 59 пассажей или более 6 мес. В ранее опубликованных работах старение культур МСК человека с прекращением пролиферации клеток фиксировали не позднее 30-го пассажа [7–10]. Следует отметить, что значительный размер выборки, использованной в нашем исследовании, свидетельствует о том, что сохранение пролиферативного потенциала *in vitro* в течение длительного периода (более 20 пассажей), видимо, не является характерной особенностью МСК.

При этом в части публикаций было описано, что длительное культивирование МСК сопровождается хромосомными аномалиями [10, 14], хотя в других исследованиях, наоборот, были получены свидетельства генетической стабильности МСК [15, 16]. Предполагается, что генетическая стабильность, во-первых, видоспецифична — хромосомы МСК человека более стабильны по сравнению с МСК мышей, а во-вторых, зависит от условий культивирования. В полученной нами культуре не было зафиксировано хромосомных перестроек в течение всего периода культивирования *in vitro*, что говорит о высокой генетической стабильности данной культуры МСК ПК

Таким образом, показано, что при долгосрочном культивировании МСК сохраняют свои характеристики и подвержены клеточному старению.

Работа выполнена в рамках государственного задания МЗ РФ и поддержана грантом РФФИ № 16-34-01163.

## Литература

1. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317. doi: 10.1080/14653240600855905.
2. Furno DL, Mannino G, Giuffrida R. Functional Role of Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Chronic Neurodegenerative Diseases. *J Cell Physiol*. 2018;233(5):3982-3999. doi: 10.1002/jcp.26192.
3. Epstein SE, Luger D, Lipinski MJ. Paracrine-Mediated Systemic Anti-Inflammatory Activity of Intravenously Administered Mesenchymal Stem Cells: A Transformative Strategy for Cardiac Stem Cell Therapeutics. *Cir Res*. 2017;121(9):1044-1046. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311925.
4. Mohseny AB, Szuhai K, Romeo S, et al. Osteosarcoma originates from mesenchymal stem cells in consequence of aneuploidization and genomic loss of Cdkn2. *J Pathol*. 2009;219(3):294-305. doi: 10.1002/path.2603.
5. Torsvik A, Røslund GV, Svendsen A, et al. Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: putting the research field on track-letter. *Cancer Res*. 2010;70(15):6393-6396. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1305.
6. Tao H, Lin Y, Zhang G, et al. Experimental observation of human bone marrow mesenchymal stem cell transplantation into rabbit intervertebral discs. *Biomed Rep*. 2016;5(3):357-360. doi: 10.3892/br.2016.731.
7. Katsiani E, Garas A, Skentou C, et al. Chorionic villi derived mesenchymal like stem cells and expression of embryonic stem cells markers during long-term culturing. *Cell and Tissue Banking*. 2016;17(3):517-529. doi: 10.1007/s10561-016-9559-4.
8. Jeong SG, Cho GW. Accumulation of apoptosis-insensitive human bone marrow-mesenchymal stromal cells after long-term expansion. *Cell Biochemistry and Function*. 2016;34(5):310-316. doi: 10.1002/cbf.3191.
9. Danisovic L, Oravcova L, Krajciová L, et al. Effect of long-term culture on the biological and morphological characteristics of human adipose tissue-derived stem cells. *J Physiol Pharmacol*. 2017;68(1):149-158.
10. Nikitina V, Astrelina T, Nugis V, et al. Clonal chromosomal and genomic instability during human multipotent mesenchymal stromal cells long-term culture. *PLoS One*. 2018;13(2):e0192445. doi: 10.1371/journal.pone.0192445.
11. Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells*. 2007;25(6):1384-1392. doi: 10.1634/stemcells.2006-0709.
12. Аизенштадт А.А., Енукашвили Н.И., Золина Т.Л., и др. Сравнение пролиферативной активности и фено-



- типа МСК, полученных из костного мозга, жировой ткани и пупочного канатика // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. – 2015. – Т. 7. – № 2. – С. 14–22. [Aisenstadt AA, Eukashvili NI, Zolina TL. Comparison of proliferation and immunophenotype of MSK, obtained from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord. *Herald of North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov*. 2015;7(2):14-22. (In Russ.)]
13. Ma YH, Zeng X, Qiu XC, et al. Perineurium-like sheath derived from long-term surviving mesenchymal stem cells confers nerve protection to the injured spinal cord. *Biomaterials*. 2018;160:37-55. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.01.015.
14. Wang Y, Zhang Z, Chi Y, et al. Long-term cultured mesenchymal stem cells frequently develop genomic mutations but do not undergo malignant transformation. *Cell Death Dis*. 2013;4(12):e950. doi: 10.1038/cddis.2013.480.
15. Hao H, Chen G, Liu J, et al. Culturing on Wharton's jelly extract delays mesenchymal stem cell senescence through p53 and p16INK4a/pRb pathways. *PLoS One*. 2013;8(3):e58314. doi: 10.1371/journal.pone.0058314.
16. Kundrotas G, Gasperskaja E, Slapsyte G, et al. Identity, proliferation capacity, genomic stability and novel senescence markers of mesenchymal stem cells isolated from low volume of human bone marrow. *Oncotarget*. 2016;7(10):10788-802. doi: 10.18632/oncotarget.7456.

♦ Адрес автора для переписки (*Information about the author*)

Н.И. Енукашвили / Natella I. Eukashvily

Тел. / Tel.: +7(812)322-04-02

E-mail: nie@newmail.ru