ЦИТОЛОГИЯ, 2020, том 62, № 11, с. 782–792

УДК 576.5

КЛЕТОЧНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РЕПЛИКАТИВНОГО СТАРЕНИЯ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

© 2020 г. Д. Е. Бобков[1, 2, *], Г. Г. Полянская[1]

[1]*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия*

[2]*НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, 197376 Россия*

**E-mail: bobkov@incras.ru*

Поступила в редакцию 01.08.2020 г.
После доработки 15.08.2020 г.
Принята к публикации 17.08.2020 г.

Широкое использование мезенхимных стволовых клеток (МСК) человека в биомедицинских технологиях приводит к необходимости подробного исследования различных свойств, характерных для этих клеток, в разные периоды их жизнедеятельности. Обзор посвящен общей и сравнительной характеристике разных МСК человека, анализу различных клеточных процессов, сопровождающих репликативное старение МСК, которое является неотъемлемой частью жизнедеятельности этих клеток при длительном культивировании. Наиболее подробно в обзоре рассмотрена цитогенетическая нестабильность, а также некоторые молекулярные механизмы, участвующие в процессе репликативного старения клеток, включающие реорганизацию внеклеточного матрикса и структур цитоскелета.

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки, репликативное старение, кариотип, внеклеточный матрикс, цитоскелет

DOI: 10.31857/S0041377120110036

В настоящее время в разных странах проводится много разносторонних исследований характеристик МСК человека, выделенных из разных органов и тканей. В целом предлагаемый обзор посвящен обобщению многочисленных результатов по молекулярным и клеточным характеристикам МСК, выделенных из разных источников. В обзоре описываются и анализируются: характеристики МСК, как одного из типов неиммортализованных клеточных линий; общие характеристики, определяющие статус МСК человека; основные различия между МСК разного происхождения по характеристикам, определяющим статус МСК, но не нарушающих его, а также характеристикам, ответственным за важнейшие клеточные процессы.

Задача основной части обзора состоит в анализе различных клеточных процессов, сопровождающих репликативное старение (РС) МСК, возникающее в процессе длительного культивирования клеточных популяций и представляющее собой комплексный динамичный процесс, индуцированный генетическими и эпигенетическими нарушениями. Наиболее подробно представлены характеристики РС, не освещенные широко в литературных источниках. К таким характеристикам отнесены цитогенетическая нестабильность, характеристика активности ММП и содержания белков ВКМ, реорганизация структур цитоскелета.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МСК ЧЕЛОВЕКА

Мезенхимные стволовые клетки человека относятся к неиммортализованным клеточным линиям. Важнейшими общими характеристиками МСК являются диплоидный кариотип, характерный для организма донора, и ограниченный срок жизни клеток. Ограниченность срока жизни клеток определяется не длительностью культивирования, а числом удвоений клеточных популяций, характеризующим пролиферативную активность. С увеличением числа клеточных удвоений в процессе культивирования МСК пролиферация клеток постепенно замедляется, и клеточная популяция входит в фазу РС.

РС обусловлено укорочением теломер, происходящим при каждом цикле репликации ДНК и, соответственно, при каждом клеточном делении, как правило, вследствие выключения фермента теломеразы (Прайс, 1997; Хейфлик, 1997; Bodnar et al., 1998). Дальнейшей судьбой клеток в фазе старения может быть либо дегенерация и гибель, либо длительное существование живых клеток с крайне низкой пролиферативной активностью без спонтанного приобретения неограниченного пролиферативного потенциала (Hayflick, 1965; Matsumura et al., 1979) с

Принятые сокращения: ВКМ – внеклеточный матрикс; ММП – матриксные металлопротеиназы; МСК – мезенхимные стволовые клетки; РС – репликативное старение; СИПС – стресс-индуцированное преждевременное старение; SASP – секреторный фенотип, ассоциированный со старением.

возможным переключением на другой метаболический путь (Гаврилов, Гаврилова, 1991). Для преодоления ограниченного срока жизни клеток возможно введение в клетки каталитической субъединицы теломеразы hTERT, которая способствует расширению срока жизни клеток и восстановлению ряда функций, в частности, пролиферативной способности и дифференцировочного потенциала (Bodnar et al., 1998; Zhang et al., 2006). И хотя укорочение теломер является признаком клеточного старения, их относительная длина различна у разных доноров, что затрудняет проведение сравнительного анализа разных линий МСК по этому признаку (Li et al., 2017).

МСК человека имеют статус, определяемый рядом характеристик. К статусным характеристикам МСК относятся способность к самообновлению, иммуномодулирующие свойства, адгезивность к культуральному пластику, фибробластоподобная морфология, активная пролиферация, наличие определенной панели поверхностных антигенов (CD44, CD73, CD90, CD105 и HLA-ABC) и отсутствие ряда других антигенов (CD34 и HLA-DR), направленная дифференцировка в производные мезодермы (Dominici et al., 2006; Sensebé et al., 2010; Костюк и др., 2016). В настоящее время получены культуры МСК человека из разных органов и тканей, в частности, из костного мозга, эмбриональных стволовых клеток, пуповинной крови, Вартонова студня пупочного канатика, плаценты, эндометрия, губчатой кости, надкостницы, синовиальной жидкости, поджелудочной железы, жировой ткани, кожи, легкого, тимуса, зуба, десны и ряда других источников (Musina et al., 2005; Huang et al., 2009; Multu et al., 2015; Li et al., 2017; Кольцова и др., 2018, 2019, 2020; Полянская, 2018).

Тем не менее, между линиями МСК обнаружены различия по характеристикам, определяющим статус МСК, но не нарушающих его, а также характеристикам, ответственным за важнейшие клеточные процессы. В частности, наблюдаются различия по ростовым характеристикам, по цитогенетической стабильности, по дифференцировочному потенциалу, по иммуномодулирующим свойствам, по клеточной подвижности (миграции), по характеру РС. Причинами наблюдаемых различий могут быть эпигенетические и генетические факторы: первые определяются условиями культивирования, или свойствами микроокружения, в котором существовали эти клетки до помещения их в условия *in vitro*; вторые – генетическими различиями между донорами (Крылова и др., 2015; Воронкина и др., 2016; Alessio et al., 2018; Facchin et al., 2018; Guan et al., 2019; Khasawneh et al., 2019; Полянская, 2018; Полянская и др., 2019; Terunuma et al., 2019; Yang et al., 2019).

Сравнительное изучение основных характеристик МСК способствует углублению фундаментальных знаний о МСК человека и расширению возможностей использования их в регенеративной медицине. Важность таких исследований вытекает из особенностей взаимодействия МСК с их уникальным микроокружением (нишей), характерным для определенной ткани, которое регулирует пролиферацию, выживаемость, миграцию, старение, дифференцировочный потенциал и другие клеточные свойства посредством межклеточных взаимодействий и различных биоактивных молекул. Микроокружение постоянно находится под влиянием генетических, эпигенетических и внешних факторов. Таким образом, происхождение или источник получения МСК могут определять их функциональные характеристики.

Важнейшим механизмом действия МСК на поврежденные ткани является миграция МСК в эти участки и оказание на них трофического действия через секрецию биоактивных факторов, изменяющих микроокружение поврежденных клеток и, тем самым, способствующих улучшению тканевой репарации. Показано также, что МСК могут оказывать трофическое действие посредством клеточных везикул, осуществляющих перенос биоактивных молекул в клетки-мишени, либо путем шеддинга – отрезания внеклеточных доменов трансмембранных белков. В настоящее время в литературе широко обсуждаются механизмы тканевой репарации с помощью МСК, связанные с продукцией цитокинов и паракринных факторов. Активно исследуется состав секретома (секреторный фенотип) МСК, который представляет собой кондиционированную среду, содержащую продукты секреции МСК. Кондиционированная среда включает множество цитокинов и факторов, ремоделирующих ВКМ, ферментов и ростовых факторов, способствующих активации генетического аппарата клетки. Поэтому не исключено использование секретома в регенеративной медицине (Caplan, Dennis, 2006; Phinney, Prockop, 2007; Edwards et al., 2008; Carvalho et al., 2011; Gruenloh et al., 2011; Guiducci et al., 2011; Huang et al., 2013; Luo et al., 2013, 2018; Ando et al., 2014; Hendijani et al., 2015; Danieli et al., 2016; Julianto, Rindastuti, 2016; Liang et al., 2016; Vulcano et al., 2016; Zachar et al., 2016; Li et al., 2017).

ХАРАКТЕРИСТИКА РС

РС, наступающее при длительном культивировании клеточных популяций МСК человека, представляет собой комплексный динамичный процесс, индуцированный генетическими и эпигенетическими нарушениями. Оно характеризуется следующими существенными изменениями: снижение или прекращение пролиферации клеток в связи с накоплением и остановкой их в фазе G_1 клеточного цикла; морфологические (увеличение размеров и формирование уплощенной морфологии); увеличение активности фермента SA-β-галактозидазы, ассоциированной с репликативным старением; уменьшение клеточной подвижности или миграции; повышение уровня экспрессии туморсупрессорных генов; укорочение теломер; уменьшение дифференцировочного потенциала; накопление активных форм кислорода и потеря клеточного гомеостаза; уменьшение

уровня антиоксидантов; изменение восприимчивости МСК к белкам теплового шока (БТШ), способствующее снижению активности клеточных защитных механизмов; изменение состава секретома, включающего провоспалительные цитокины, протеазы и других факторы, которые в совокупности формируют фенотип SASP; ряд эпигенетических изменений.

Процесс клеточного старения в МСК начинается на ранних пассажах и постепенно усиливается при длительном культивировании (Wagner et al., 2008; Geissler et al., 2012; Redaelli et al., 2012; Bertolo et al., 2015; Savickiene et al., 2016; Turinetto et al., 2016; Yin, Pickering., 2016; Danisovic et al., 2017; Кольцова и др., 2017, 2018; 2019; Li et al., 2017; Alessio et al., 2018; Borodkina et al., 2018; Hernandez-Segura et al., 2018; Полянская, 2018; Truong et al., 2018., Vassilieva et al., 2018; Yu et al., 2018; Zhang et al., 2018; Мусорина и др., 2019; Bobkov et al., 2020; Jiang et al., 2020; Ratushnyy et al., 2020). Несмотря на то, что изучение репликативного старения клеток в лабораториях разных стран мира широко представлено в литературе, работы в этом направлении не прекращаются. Рассмотрим связь РС с некоторыми клеточными и молекулярными процессами, не перечисленными выше.

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ МСК ЧЕЛОВЕКА В ПРОЦЕССЕ РС

Известно, что РС связано с уменьшением репарации ДНК, благодаря снижению экспрессии соответствующих генов (Niedernhofer et al., 2018; Yu et al., 2018). Следствием уменьшения репаративных процессов в ДНК является, в частности, нарушение цитогенетической стабильности, которая представляет собой важнейший фактор, определяющий характер многих клеточных процессов, включая и РС. Международное общество клеточной терапии и Рабочая группа по клеточным продуктам рекомендуют считать клеточные линии аномальными для биомедицинских прикладных исследований, если они имеют 10% и более клональных хромосомных перестроек (перестройки, встречающиеся в 2-х и более клетках) при анализе минимум 20 клеток методом дифференциального G-окрашивания хромосом (Meisner, Johnson, 2008; Shaffer et al., 2009; Barkholt et al., 2013). Согласно данной рекомендации, цитогенетически аномальные линии могут использоваться для некоторых фундаментальных исследований в области раннего эмбрионального развития, более позднего онтогенеза и канцерогенеза. Некоторые из них могут быть использованы в качестве моделей для фармакологических исследований. Но они совершенно непригодны для использования в прикладных исследованиях, связанных с регенеративной медициной.

Для цитогенетической идентификации необходим контроль геномной стабильности линий МСК не только с помощью цитогенетических методов, но и с помощью молекулярно-биологических методов с большей разрешающей способностью. В опубликованном ранее обзоре проведен подробный анализ нестабильности генома разных стволовых клеток человека, включая МСК (Полянская, 2014). В частности, при проведении анализа 144 культур МСК, было выявлено всего 4% линий с количественными и структурными хромосомными аномалиями (Ben-David et al., 2011). В течение последующих 9 лет в Коллекции культур клеток позвоночных ИНЦ РАН получено и охарактеризовано 16 линий МСК человека разного происхождения, включающего постнатальные, эмбриональные и внезародышевые источники (Полянская, 2018; Кольцова и др., 2018, 2019; 2020; Мусорина и др, 2019).

Три линии из 16-ти имели количественные и структурные клональные хромосомные аномалии на ранних пассажах (Кольцова и др., 2015, 2017, 2019). Цитогенетический анализ 7-ми линий из 16-ти был продолжен при длительном культивировании, включая РС. Две линии из 3-х, имеющих аномалии на раннем пассаже, были проанализированы при длительном культивировании. В одной линии (MSC-GING), полученной из десны, аномальный кариотип сохранился, но с меньшей частотой, а в линии MSCWJ-2, полученной из Вартонова студня пупочного канатика, произошла нормализация кариотипа (Кольцова и др., 2017, 2019). В 2-х линиях (ADH-MSC и MSC-PL-1), полученных соответственно из жировой ткани сердца и из плаценты, в процессе РС появились новые существенные количественные и структурные хромосомные аномалии (Мусорина и др., 2019; Кольцова и др., 2020). Кроме того, в трех линиях из 16-ти было обнаружено увеличенное количество неклональных хромосомных перестроек в процессе РС (в линиях DF-1 и DF-3 на раннем 6 пассаже и в линии MSC-DP из пульпы зуба на поздних пассажах) (Кольцова и др., 2018; Полянская, 2018).

Международное общество клеточной терапии и Рабочая группа по клеточным продуктам не указывает предела неклональных хромосомных аномалий (перестройка, встречающаяся в одной клетке) с целью подтверждения нормальности линии. Тем не менее, на такие линии следует обратить внимание, т.к. есть примеры превращения неклональных нарушений в клональные хромосомные перестройки. В наших исследованиях косвенным подтверждением дальнейшего усиления кариотипической нестабильности могут служить данные о том, что при увеличении количества анализируемых клеток линии DF-1, или при увеличении длительности культивирования линии ADH-MSC, неклональная перестройка превращается в клональную, повторяющуюся в разных клетках (Крылова и др., 2016; Мусорина и др., 2019). Не исключено, что при длительном культивировании увеличение неклональных кариотипических нарушений может обеспечить промежуточные этапы канцерогенеза (Borgonovo et al., 2014).

Проведенный цитогенетический анализ показал появление специального типа хромосомных аберраций – теломерных ассоциаций (дицентриков) в про-

цессе активного РС. Это явление было обнаружено в 3-х линиях. В линии, полученной из Вартонова студня пупочного канатика человека (MSCWJ-2) были обнаружены теломерные ассоциации с низкой частотой (Кольцова и др., 2017). В линии MSC-DP наблюдается высокая частота теломерных ассоциаций на позднем пассаже с преимущественным участием в их образовании длинного плеча хромосомы 14; а в линии ADH-MSC – с преобладанием короткого плеча хромосомы 21. Ранее было показано, что теломерные ассоциации появляются в "безмаркерных" иммортализованных и в диплоидных неиммортализованных фибробластах при стрессовых ситуациях, включая старение. На основании анализа большого количества клеточных линий и разных стрессовых факторов были выявлены определенные характерные черты дицентриков, включая и преимущественное участие определенных хромосом в их образовании. По-видимому, их роль состоит не в создании кариотипической нестабильности, что связано с обычными хромосомными аберрациями, а в образовании генетических структур, обеспечивающих адаптацию клеточной популяции как целостной системы к неблагоприятным факторам (Benn et al., 1976; Полянская, 2000; Poljanskaya, Vakhtin, 2003). Обнаруженное нами образование теломерных ассоциаций в процессе РС, по-видимому, носит избирательный характер, связанный с конкретными линиями МСК, и не является обязательным свойством РС.

В настоящее время накопилось много данных, подтверждающих цитогенетическую гетерогенность МСК, которые свидетельствуют о разной судьбе хромосомных нарушений в процессе культивирования. Выше показана возможность появления новых хромосомных нарушений непосредственно в процессе РС. Но хромосомные нарушения, возникшие на ранних пассажах, в процессе длительного культивирования ведут себя по-разному. Так, число некоторых нарушений может увеличиваться, а некоторых – уменьшаться или исчезать совсем, что, возможно, связано с негативной селекцией (Redaelli et al., 2012; Kim et al., 2015; Кольцова и др., 2017; Крылова и др., 2017; Nikitina et al., 2018). По-видимому, судьба цитогенетических нарушений в процессе длительного культивирования определяется степенью адаптивности конкретного хромосомного изменения. Следует также отметить, что после выделения клеточной популяции из фрагмента ткани и потери на этом этапе многоступенчатого организменного контроля, на ранних пассажах происходит адаптация клеток к условиям *in vitro*, которые являются для них, по-видимому, стрессовой ситуацией. На этом этапе может усиливаться хромосомная нестабильность, которая постепенно нормализуется к 5-му пассажу (Stultz et al., 2016). Обнаруженные на 6–8 пассажах хромосомные нарушения могут отражать неполную нормализацию кариотипической нестабильности. Возможно также, что в клеточной популяции еще *in vivo* присутствуют в небольшом количестве аномальные клетки, число которых увеличивается при последующем культивировании *in vitro* (Wang et al., 2005). Таким образом, процесс РС может характеризоваться цитогенетическими нарушениями двух типов: 1) нарушения, исходящие из изменений, возникающих либо еще *in vivo*, либо на ранних стадиях *in vitro*; 2) цитогенетические нарушения, возникающие в процессе РС.

Надо подчеркнуть, что цитогенетический анализ разных МСК человека свидетельствует о том, что возникающие кариотипические изменения, как правило, не являются адаптивно выгодными для клеточной популяции в условиях *in vitro* и не способствуют ее иммортализации (Tarte et al., 2010; Redaelli et al., 2012; Zaman et al., 2014; Kim et al., 2015; Кольцова и др., 2017; 2019, 2020; Мусорина и др., 2019). В случае получения результатов, свидетельствующих о спонтанной трансформации МСК, необходимо проведение молекулярно-генетического анализа для исключения их контаминации опухолевыми клетками (Полянская, 2014).

Резюмируя полученные нами результаты по анализу ряда клеточных линий при длительном культивировании можно заключить, что очевидны корреляции между цитогенетической нестабильностью и характером РС. Так, в линии SC6-MSC, выделенной из ЭСК человека, а также в линиях, упомянутых выше (MSCWJ-2, MSC-GING, ADH-MSC, MSC-PL-1), имеет место как преждевременное РС, так и увеличение интенсивности РС по сравнению с линиями, не имеющими кариотипических аномалий (Кольцова и др., 2015, 2017, 2019, 2020; Мусорина и др., 2019). Но в целом, цитогенетическая нестабильность не является обязательной характеристикой РС.

ХАРАКТЕРИСТИКА АКТИВНОСТИ ММП И СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКОВ ВКМ В МСК ЧЕЛОВЕКА В ПРОЦЕССЕ РС

Известно, что клетки в условиях *in vivo* и *in vitro* контактируют с сетью макромолекул, образующих ВКМ, который состоит из разных белков, синтезируемых самими клетками. ВКМ является одним из важнейших регуляторов клеточных процессов и представляет собой микроокружение или нишу, в которой существуют клетки. Регуляция клеточных процессов осуществляется через взаимодействие металлопротеиназ (ММП) с белками ВКМ. ММП представляют собой семейство Ca- и Zn-зависимых эндопептидаз, которые регулируют активность многих биологических молекул, расщепляя или блокируя их. ММП и их специфические ингибиторы влияют на такие фундаментальные клеточные процессы, как пролиферация, апоптоз, дифференцировка и др. Они участвуют в процессах ремоделирования тканей и развития органов, специфически модулируя сигнальные пути посредством взаимодействия с субстратами разной природы, включая перестройки ВКМ (Nagase, Woessner, 1999; Page-McCaw et al., 2007, Kessenbrock et al., 2010).

Есть ряд работ, свидетельствующих об активном участии ММП и ВКМ в процессе старения разных клеточных типов (Moon et al., 2004; Vigetti et al., 2006; Bertram, Hass, 2009; Pitiyage et al., 2011; Makpol et al., 2013; Malaquin et al., 2013; Lynch, Pei., 2014; Gutierrez-Fernandez et al., 2015; Noh et al., 2017). Представленные исследования носят разрозненный характер, поскольку пока только накапливаются данные по анализу участия разных ММП в РС разных клеточных линий.

Недавно впервые было проведено подробное сравнительное исследование динамики активности ММП и содержания белков ВКМ в 3-х линиях МСК человека, полученных из разных источников: из Вартонова студня пупочного канатика (MSCWJ-1), из кожи век (DF-2), и из эпикардиальной жировой ткани (ADH-MSC) в процессе длительного культивирования, включая РС (Воронкина и др., 2020).

В результате анализа содержания белков ВКМ коллагена I типа и фибронектина, а также активностей ММП-1, -2 и -9 в процессе РС были показаны изменения на поздних пассажах по сравнению с ранними. Полученные результаты свидетельствуют как о различиях между линиями по активности одной ММП, так и о различиях в одной линии разных ММП. В целом, в процессе РС между 3-мя линиями обнаружены различия по характеру изменений содержания коллагена I типа, фибронектина, а также активностей ММП. Таким образом, РС, помимо перечисленных выше факторов, может характеризоваться еще и изменениями состава ВКМ и активностей ММП. Полученные межлинейные различия, по-видимому, зависят от разного микроокружения, в котором находились клетки до их перевода в культуру. Это косвенно подтверждается предыдущим исследованием, где показаны межлинейные различия по активности разных ММП в процессе остеогенной и адипогенной дифференцировок двух клеточных линий (FetMSC и M-FetMSC), полученных из костного мозга и мышцы конечности одного донора – 5–6-ти недельного эмбриона (Воронкина и др., 2016).

Еще одним свидетельством в пользу роли микроокружения в наблюдаемых межлинейных различиях могут быть результаты, полученные на линии ADH-MSC. Важно отметить, что клетки линии ADH-MSC существенно отличались от двух других линий по скорости старения, содержанию белков ВКМ и по активностям ММП. Возможно, причиной такого расхождения является то, что клетки получены от донора с заболеванием сердца в процессе аортокоронарного шунтирования, т.е. имело место не только другое микроокружение, связанное с локализацией выделенных клеток, но и нездоровое микроокружение, в котором они находились еще до перевода в состояние *in vitro*. Эти данные косвенно подтверждают исследования других авторов, показавших, что на характер РС могут оказывать влияние стрессовые факторы, включая болезни (Yin, Pickering., 2016; Cardenes et al., 2018; Shakeri et al., 2018; Stein et al., 2018).

РЕОРГАНИЗАЦИЯ ЦИТОСКЕЛЕТА В ПРОЦЕССЕ РС

Одним из признаков, характеризующих РС, является уменьшение клеточной миграции. Клеточная миграция происходит при тесном контакте с ВКМ, на котором распластаны клетки, и зависит от организации актинового цитоскелета. В связи с этим представляется существенным изучение связи РС с организацией цитоскелета. Есть ряд работ, описывающих молекулярные механизмы и функциональные изменения в результате реорганизации цитоскелета в процессе РС в разных клеточных типах человека и животных (Larsen et al., 2003; Le Clainche, Carlier., 2008; Kasper et al., 2009; Wang, Jang., 2009; Geissler et al., 2012; Özcan et al., 2016; Turinetto et al., 2016; Moujaber et al., 2019; Bobkov et al., 2020). Надо отметить, что проводимые в настоящее время исследования молекулярных механизмов реорганизации цитоскелета в процессе длительного культивирования, включая РС клеточных линий, находятся на этапе накопления экспериментальных результатов и имеют разрозненный характер.

При постановке и интерпретации экспериментов надо учитывать возможные различия между стресс-индуцированным преждевременным старением (СИПС) и физиологическим РС. Эти 2 типа старения имеют много общих черт, поэтому СИПС часто используют в качестве модели РС. Тем не менее, обнаружены различия между этими типами старения. Так, методами сравнительной протеомики на культуре фибробластов крайней плоти человека было показано, что несмотря на общие признаки, свойственные обоим типам клеточного старения, они различаются по концентрации некоторых белков в молодых и старых клетках. В частности, в процессе физиологического РС в клетках увеличивается концентрация гамма-актина, кофилина 1, филамина С, виментина, альфа-актинина-4. При СИПС, вызванном длительным культивированием (2 нед.) в присутствии 20 мкМ пероксида водорода, старение сопровождалось увеличением концентрации бета-3 цепи тубулина (Aan et al., 2013).

Несмотря на то, что разные типы СИПС различаются между собой по механизмам индукции, все они приводят к сходным изменениям ряда молекулярных систем, включая актиновый цитоскелет и ВКМ. В этой связи представляет интерес недавняя работа на фибробластах легкого человека линии IMR-90, выполненная методами сравнительной секретомики (Basisty et al., 2020). Авторы показали, что при индукции старения различными факторами (ионизирующим облучением, оверэкспрессией онкогена *ras*, ингибитором протеаз атазанивиром) среди молекулярных секреторных фенотипов, ассоциированных со старением, обнаруживаются общие для всех этих индукторов, в которых выделяются белки, отвечающие за поддержание структуры клеток и тканей, в том числе компоненты ВКМ, актинового цитоскелета, интегриновые рецепторы и регуляторы пептидаз.

Организация и целостность актинового цитоскелета являются определяющими факторами для такой важной клеточной функции, как миграция (клеточная подвижность). Методы анализа изображений, полученных в ходе прижизненной микроскопии, позволяют количественно оценить клеточную подвижность *in vitro*. При изучении культивируемых МСК человека, полученных из костного мозга, было обнаружено, что клеточная подвижность коррелирует с размером клеток: крупные клетки двигаются медленнее, а также медленнее двигаются клетки, находящиеся на более поздних стадиях РС (Bertolo et al., 2015). Эти авторы предлагают использовать прижизненную микроскопию и контроль клеточной подвижности для оценки дифференцировочного потенциала образцов МСК, полученных от разных доноров, поскольку в разнородной популяции клеток максимальным дифференцировочным потенциалом обладают МСК, двигающиеся со средней скоростью, по сравнению с медленно и быстро двигающимися клетками. Есть работа, в которой на МСК крысы, выделенных из костного мозга молодых и старых животных, было показано, что РС сопровождается снижением динамики актинового цитоскелета (Kasper et al., 2009).

В наших исследованиях на клетках линии MSCWJ-1 показано, что на поздних стадиях РС в клетках увеличивается структурная целостность акто-миозиновой сократительной системы, усиливается цитоплазматическое присутствие RhoA, но средняя скорость движения клеток по культуральному пластику, измеренная на 36-м пассаже, оказывается такой же, как и на пассаже 15. Тем не менее, наблюдаются изменения характера этого движения, которое на поздних стадиях РС становится более прямолинейным по сравнению с ранними пассажами (Bobkov et al., 2020). Еще ранее на МСК человека было продемонстрировано, что СИПС, вызванное ионизирующим излучением, сопровождается реорганизацией цитоскелета, в частности, увеличением количества стресс-фибрилл и, как следствие, увеличением размера клеток (Wang, Jang, 2009). Авторы считают, что такие эффекты обусловлены снижением экспрессии киназы CK2, которое приводит к уменьшению фосфорилирования миозина-9 по Ser1943 и его перераспределению из цитоскелета в цитоплазму, а также снижению экспрессии миозина-10 и секреции профилина-1 (Wang, Jang, 2009). Таким образом, на основании ряда косвенных данных можно предположить, что РС в МСК и некоторых других фибробластоподобных клеточных линиях сопровождается увеличением экспрессии структурных и регуляторных белков цитоскелета.

Учитывая, что РС является свойством всех неиммортализованных клеточных линий, а также немногочисленность исследований, проведенных на МСК человека и на фибробластоподобных клетках с неподтвержденным статусом МСК, необходимо отметить работы, проведенные на неиммортализованных клеточных линиях других морфологических типов, в которых демонстрируются вызванные клеточным старением нарушения в работе цитоскелетных систем. Например, на клеточной модели почечного эпителия было показано, что СИПС, индуцированное бутиратом натрия (30 мМ), ассоциировано с изменениями системы и микротрубочек, и микрофиламентов (Moujaber et al., 2019). Согласно данным этой работы, через 5 сут действия бутирата натрия снижается уровень гистоновой деацетилазы HDAC6, что приводит к гиперацетилированию альфа-тубулина и увеличению стабильности микротрубочек; значительно снижается концентрация Rho-ассоциированной киназы Rock1, актиновый цитоскелет становится менее выраженным и полностью нарушается способность клеток к миграции (Moujaber et al., 2019).

Важность RhoA/ROCK-пути в регуляции цитоскелета и клеточной подвижности подчеркивается тем, что его активность может изменяться не только под влиянием внутренних процессов, свойственных стареющим клеткам, но и в молодых клетках под паракринным влиянием SASP клеток других линий. Например, в ходе экспериментов, направленных на оценку влияния SASP фибробластов легкого человека линии WI-38 на опухолевые эпителиоподобные клеточные линии T47D и MCF 7, было обнаружено, что фибробласты с СИПС могут вызывать у эпителиоподобных клеток эпителиально-мезенхимный переход посредством ингибирования RhoA/ROCK-пути (Aifuwa et al., 2015).

Сравнительный протеомный анализ компонентов SASP, полученных от стареющих репликативно и стресс-индуцированно МСК, с последующим применением методов генной онтологии позволил выявить четыре основных класса компонентов SASP, характерных для клеточного старения в целом: 1) межклеточные контакты ВКМ–цитоскелет; 2) метаболические процессы; 3) окислительно-восстановительные факторы; 4) регуляторы генной экспрессии (Özcan et al., 2016). Таким образом, белки цитоскелета принимают самое активное участие в формировании характеристик, свойственных стареющим МСК, но многие конкретные механизмы их действия еще предстоит открыть.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммируя рассмотренные данные, можно сделать несколько выводов, касающихся как общих характеристик МСК человека, так и некоторых характеристик РС МСК.

Между линиями МСК, выделенными из разных источников, существуют различия по характеристикам, определяющим статус МСК, но не нарушающих его, а также характеристикам, ответственным за важнейшие клеточные процессы. Причинами этих различий могут быть: 1) эпигенетические факторы, связанные с условиями культивирования или с микроокружением, в котором существовали эти клетки до помещения их в условия *in vitro*; 2) генетические

факторы, связанные с генетическими различиями между донорами.

МСК человека относятся к неиммортализованным клеточным линиям, одной из важнейших характеристик которых является ограниченный срок жизни, обусловленный наступлением РС в процессе длительного культивирования. РС представляет собой комплексный динамичный процесс, в ходе которого изменяется ряд клеточных и молекулярных характеристик.

Данные по цитогенетической нестабильности, реорганизация ВКМ и структур цитоскелета, рассмотренные нами, а также сравнительный анализ цитогенетической нестабильности в разных линиях МСК позволили сделать следующий вывод. Процесс РС характеризуется двумя типами цитогенетических нарушений: 1) нарушения, возникающие еще *in vivo*, либо на ранних стадиях *in vitro*; 2) нарушения, возникающие уже в процессе РС. Резюмируя полученные результаты по анализу ряда клеточных линий при длительном культивировании, можно заключить, что существует корреляции между цитогенетической нестабильностью и характером РС. Но в целом, цитогенетическая нестабильность не является обязательной характеристикой РС.

Несмотря на немногочисленность и разрозненность данных о реорганизации ВКМ в разных МСК человека и участия ММП в РС, их анализ все-таки позволяет сделать вывод о том, что изменения состава ВКМ и активностей ММП являются характеристиками РС.

Исследования молекулярных механизмов реорганизации цитоскелета в процессе длительного культивирования, включая РС клеточных линий, находятся на этапе накопления экспериментальных результатов. Организация и целостность актинового цитоскелета являются определяющими факторами для такой важной клеточной функции, как миграция. На основании немногочисленных данных, полученных не только на линиях МСК, но и на некоторых других неиммортализованных линиях фибробластоподобных клеток, можно сделать вывод о том, что РС сопровождается увеличением экспрессии генов структурных и регуляторных белков цитоскелета. Выявлена важность RhoA/ROCK-пути в процессе РС не только в МСК, но и в эпителиоподобных клетках человека.

Сравнительные исследования характеристик МСК человека, полученных из разных источников, активно продолжаются. Эти работы важны как для углубления знания механизмов биологических процессов в клетке, так и для расширения возможностей использования МСК в регенеративной медицине.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Госзадания (№ АААА-А19-119020-190093-9) Института цитологии РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей авторы не проводили.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Воронкина И.В., Смагина Л.В., Бильдюг Н.Б., Мусорина А.С., Полянская Г.Г. 2020. Динамика активности матриксных металлопротеиназ и содержания белков внеклеточного матрикса в процессе репликативного старения линий мезенхимных стволовых клеток человека. Цитология. Т. 62. № 3. С. 210. (*Voronkina I.V., Smagina L.V., Bildyug N.V., Musorina A.S., Poljanskaya G.G.* 2020. Dinamics of matrix metalloproteinases activity and extracellular matrix proteins content of human mesenchymal stem cell lines during replicative senescence. Tsitologiia. V. 62. P. 210).

Воронкина И.В., Смагина Л.В., Крылова Т.А., Мусорина А.С., Полянская Г.Г. 2016. Сравнительный анализ динамики активности матриксных металлопротеиназ в процессе дифференцировки мезенхимных стволовых клеток человека, выделенных из разных тканей одного донора. Цитология. Т. 58. № 11. С. 865. (*Voronkina I.V., Smagina L.V., Krylova T.A., Musorina A.S., Poljanskaya G.G.* 2017. Analysis of matrix metalloproteinase activity during differentiation of mesenchymal stem cells isolated from different tissues of one donor. Cell Tiss. Biol. V. 11. P. 95).

Гаврилов Л.А., Гаврилова Н.С. 1991. Биология продолжительности жизни. М.: Наука. 280 с. (*Gavrilov L.A., Gavrilova N.S.* 1991. Bbiology lifetime. M.: Nauka. 280 p.).

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.* 2016. Characterization of a Novel Mesenchymal Stem Cell Line Derived from Human Embryonic Stem Cells. Cell Tiss. Biol. V. 10. P. 1).

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., Musorina A.S., Zenin V.V., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G.* 2018. The Dynamics of Cell Properties during Long-Term Cultivation of Two Lines of Mesenchymal Stem Cells Derived from Wharton's Jelly of Human Umbilical Cord. Cell Tiss. Biol. V. 12. P.7).

Кольцова А.М., Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2018. Получение и характеристика линии мезенхимных стволовых клеток, выделенной 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. Tsitologiia. V. 60. P. 955).

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.* 2020. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human gingiva. Cell Tiss. Biol. V.61. P. 658).

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. 1. (*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 lines from different parts of placenta of the same donor. Tsitologiia. V. 62. P. 1.)

Костюк Н.В., Белякова М.Б., Черноруцкий М.В., Павлова Н.В., Харитонова Е.А., Лещенко Д.В., Янковский В.Л., Егорова Е.Н., Петрова М.Б. 2016. Морфологические особенности популяций мезенхимальных стромальных клеток человека в зависимости от свойств культурального пластика. Современные проблемы науки и образования. № 2. С. 18. (*Kostyuk N.V., Belyakova M.B., Chernorutskiy M.V., Pavlova N.V., Kharitonova E.A., Leschenko D.V., Yankovskiy V.L., Egorova E.N., Petrova M.B.* 2016. Morphological features of populations of human mesenchymal stromal cells depending on cultural plastic. Modern problems of science and education. V. 2. P. 18.)

Крылова Т.А., Мусорина А.С., Зенин В.В., Полянская Г.Г. 2015. Характеристика клеточных сфероидов, полученных из линий мезенхимных стволовых клеток, выделенных из костного мозга и зачатка конечности раннего эмбриона человека. Цитология. Т. 57. № 7. С. 480. (*Krylova T.A., Musorina A.S., Zenin V.V., Poljanskaya G.G.* 2015. Cellular Spheroids Obtained from Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow and Limb Muscle of Early Human Embryo. Cell Tiss. Biol. V. 9. P. 431).

Крылова Т.А., Мусорина А.С., Зенин В.В., Кольцова А.М., Кропачева И.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2016. Получение и характеристика неиммортализованных клеточных линий дермальных фибробластов человека, выделенных из кожи век взрослых доноров разного возраста. Цитология. Т. 58. № 11. С. 850. (*Krylova T.A., Musorina A.S., Zenin V.V., Koltsova A.M., Kropacheva I.V., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G.* 2016. Derivation and characteristic of a non-immortalized cell lines of human dermal fibroblasts, generated from skin of the eyelids of adult donors of different age. Tsitologiya. V. 58. P. 850).

Крылова Т.А., Кольцова А.М., Мусорина А.С., Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2017. Характеристика двух линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из Вартонова студня пупочного канатика человека. Цитология. Т. 59. № 5. С. 315. (*Krylova T.A., Koltsova A.M., Musorina A.S., Zenin V.V., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G.* 2016. Derivation and characteristic of two lines of human mesenchymal stem cells, generated from the Wharton's jelly of the human umbilical cord. Tsitologiia. V.59. P. 315).

Мусорина А.С., Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2019. Характеристика неиммортализованной линии мезенхимных стволовых клеток, выделенных из эпикардиальной 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. Bioly. V. 13. P. 247).

Полянская Г.Г. 2000. Закономерности кариотипической изменчивости в клеточных культурах при длительном культивировании в разных условиях (Обзор). Успехи совр. биол. Т. 120. № 6. С. 529. (*Poljanskaya G.G.* 2000. Regularities of karyotypic variability in cell cultures in long-term cultivation under various conditions. Uspekhi Sovremennoi Biol. V. 120. P. 529).

Полянская Г.Г. 2014. Проблема нестабильности генома культивируемых стволовых клеток человека. Цитология. Т. 56. № 10. С. 697. (*Poljanskaya G.G.* 2014. The problem of genomic instability of cultivated human stem cells. Tsitologiya. V. 56. P. 697).

Полянская Г.Г. 2018. Сравнительный анализ характеристик линий мезенхимных стволовых клеток человека, полученных в коллекции культур клеток позвоночных (обзор). Сб. "Клеточные культуры". Вып. 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". № 34. P. 3).

Полянская Г.Г., Ефремова Т.Н., Кольцова А.М., Мусорина А.С., Шарлаимова Н.С., Яковлева Т.К. 2019. Методическое пособие по работе с клеточными культурами человека и животных. Спб. Изд-во Политех. ун-та, 114 с. (*Poljanskaya G.G., Efremova T.N., Koltsova A.M. Musorina A.S., Sharlaimova N.S., Yakovleva T.K.* 2019. Methodical handbook for working with cell cultures of humans and animals. SPb, Polytech. Univ. Publishing House. P. 114).

Прайс К.М. 1997. Синтез теломерной С-цепи. Биохимия. Т.62. № 11. С. 1423. (*Price C.M.* 1997. Synthesis of telomeric C-strand. Biochemistry. V. 62. P. 1423).

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. P. 1380).

Aan G.J., Hairi H.A., Makpol S., Rahman M.A., Karsani S.A. 2013. Differences in protein changes between stress-induced premature senescence and replicative senescence states. Electrophoresis.V. 34. №. 15. P. 2209.

Aifuwa I., Giri A., Longe N., Lee S.H., An S.S., Wirtz D. 2015. Senescent stromal cells induce cancer cell migration via inhibition of RhoA/ROCK/myosin-based cell contractility. Oncotarget. V. 6. № 31. P. 30516.

Alessio N., Pipino C., Mandatori D., Di Tomo P., Ferone A., Marchiso M., Melone M.A.B., Peluso G., Pandolfi A., Galderisi U. 2018. Mesenchymal stromal cells from amniotic fluid are less prone to senescence compared to those obtained from bone marrow: An in vitro study. J Cell Physiol. 2018. https://doi.org/10.1002/jcp.26845

Ando Y., Matsubara K., Ishikawa J., Fujio M., Shohara R., Hibi H., Ueda M., Yamamoto A. 2014. Stem cell-conditioned medium accelerates distraction osteogenesis through multiple regenerative mechanisms. Bone. V. 61. P. 82.

Barkholt L., Flory E., Jekerle V., Lucas-Samuel S., Ahnert P., Bisset L., Büscher D., Fibbe W., Foussat A., Kwa M., Lantz O., Mačiulaitis R., Palomäki T., Schneider C.K., Sensebé L., Tachdjian G., Tarte K., Tosca L., Salmikangas P. 2013. Risk of tumorigenicity in mesenchymal stromal cell-based therapies—bridging scientific observations and regulatory viewpoints. Cytother. V. 15. P. 753.

Basisty N., Kale A., Jeon O.H., Kuehnemann C., Payne T., Rao C., Holtz A., Shah S., Sharma V., Ferrucci L., Campisi J., Schilling B. 2020. A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development. PLoS Biology. V. 18. № 1. P. e3000599.

Ben-David U., Mayshar Y., Benvenisty N. 2011. Large-scale analysis reveals acquisition of lineage-specific chromosomal aberrations in human adult stem cells. Cell Stem Cell. V. 92. P. 97.

Benn P.A. 1976. Specific chromosome aberrations in senescent fibroblast cell lines derived from human embryos. Am. J. Hum. Genet. V. 28. P. 465.

Bertolo A., Gemperli A., Gruber M., Gantenbein B., Baur M., Pötzel T., Stoyanov J. 2015. In vitro cell motility as a potential mesenchymal stem cell marker for multipotency. Stem Cells Transl. Med. V. 4. P. 84.

Bertram C., Hass R. 2009. Cellular senescence of human mammary epithelial cells (HMEC) is associated with an altered MMP-7/HB-EGF signaling and increased formation of elastin-like structures. Mech. Ageing Dev. V. 130. P. 657.

Bobkov D., Polyanskaya A., Musorina A., Lomert E., Shabelnikov S., Poljanskaya G. 2020. Replicative senescence in MSCWJ-1 human umbilical cord mesenchymal stem cells is marked by characteristic changes in motility, cytoskeletal organization, and RhoA localization. Molecular Biol. Reports. V. 47. P. 3867.

Bodnar A.G, Ouellette M., Frolkis M., Holt S.E., Chiu C.P., Morin G.B., Harley C.B., Shay J.W., Lichtsteiner S., Wright W.E. 1998. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. Science. V. 279. P. 349.

Borgonovo T., Vaz I.M., Senegaglia A.C., Rebelatto C.L., Brofman P.R. 2014. Genetic evaluation of mesenchymal stem cells by G-banded karyotyping in a Cell Technology Center. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. V. 36. P. 202.

Borodkina A.V., Deryabin P.I., Nikolsky N.N. 2018. "Social Life" of senescent cells: what is SASP and why study it? Acta Naturae. V. 10. P. 36.

Caplan A.I., Dennis J.E. 2006. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. J. Cell Biochem. V. 98. P. 1076.

Cárdenes N., Álvarez D., Sellarés J., Peng Y., Corey C., Wecht S., Nouraie S.M., Shanker S., Sembrat J., Bueno M., Shiva S., Mora A.L., Rojas M. 2018. Senescence of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. Stem Cell. Res. Ther. V. 9. P. 257.

Carvalho M.M., Teixeira F.G., Reis R.L., Sousa N., Salgado A.J. 2011. Mesenchymal stem cells in the umbilical cord: phenotypic characterization, secretome and applications in central nervous system regenerative medicine. Curr. Stem Cell Res. Ther. V. 6. P. 221.

Danieli P., Malpasso G., Ciuffreda M.C., Gnecchi M. 2016. Testing the paracrine properties of human mesenchymal stem cells using conditioned medium. Methods Mol. Biol. V. 1416. P. 445.

Danisovic L., Oravcova L., Krajciova L., Varchulova Novakova Z., Bohac M., Varga I., Vojtassak J. 2017. Effect of long-term culture on the biological and morphological characteristics of human adipose tissue-derived stem Cells. J. Physiol. Pharmacol. V. 68. P. 149.

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.

Edwards D.R., Handsley M.M., Pennington C.J. 2008. The ADAM metalloproteinases. Molecular Aspects of Medicine. V. 29. № 5. P.258.

Facchin F., Bianconi E., Romano M., Impellizzeri A., Alviano F., Maioli M., Canaider S., Ventura C. 2018. Comparison of oxidative stress effects on senescence patterning of human adult and perinatal tissue-derived stem cells in short and long-term cultures. Int. J. Med Sci. V. 15. P. 1486.

Geissler S., Textor M., Kühnisch J., Könnig D., Klein O., Ode A., Pfitzner T., Adjaye J., Kasper G., Duda G.N. 2012. Functional comparison of chronological and in vitro aging: differential role of the cytoskeleton and mitochondria in mesenchymal stromal cells. PLoS One. V. 7. № 12. P. e52700. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052700

Gruenloh W., Kambal A., Sondergaard C., McGee J., Nacey C., Kalomoiris S., Pepper K., Olson S., Fierro F., Nolta J.A. 2011. Characterization and *in vivo* testing of mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cells. Tissue Eng. (A). V. 17. P. 1517.

Guan Y.T., Xie Y., Li D.S., Zhu Y.Y., Zhang X.L., Feng Y.L., Chen Y.P., Xu L.J., Liao P.F., Wang G. 2019. Comparison of biological characteristics of mesenchymal stem cells derived from the human umbilical cord and decidua parietalis. Mol. Med. Rep. V. 20. P. 633. https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10286

Guiducci S., Manetti M., Romano E., Mazzanti B., Ceccarelli C., Dal Pozzo S., Milia A.F., Bellando-Randone S., Fiori G., Conforti M.L., Saccardi R., Ibba-Manneschi L., Matucci-Cerinic M. 2011. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells from early diffuse systemic sclerosis exhibit a paracrine machinery and stimulate angiogenesis *in vitro*. Ann. Rheum. Dis. V. 70. P. 2011.

Gutiérrez-Fernández A., Soria-Valles C., Osorio F.G., Gutiérrez-Abril J., Garabaya C., Aguirre A., Fueyo A., Fernández-García M.S., Puente X.S., López-Otín C. 2015. Loss of MT1-MMP causes cell senescence and nuclear defects which can be reversed by retinoic acid. EMBO J. V. 34. P. 1875.

Hayflick L. 1965. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. Exp. Cell Res. V. 37. P. 614.

Hendijani F., Javanmard Sh.H., Rafiee L., Sadeghi-Aliabadi H. 2015. Effect of human Wharton's jelly mesenchymal stem cell secretome on proliferation, apoptosis and drug resistance of lung cancer cells. Res. Pharm. Sci. V. 10. P. 134.

Hernandez-Segura A., Nehme J., Demaria M. 2018. Hallmarks of cellular senescence. Trends in cell biology. V. 28. № 6. P. 436.

Huang G.T.J., Gronthos S., Shi S. 2009. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. J. Dental Research. V. 88. № 9. P. 792.

Huang Y.C., Leung V.Y., Lu W.W., Luk K.D. 2013. The effects of microenvironment in mesenchymal stem cell-based regeneration of intervertebral disc. Spine J. V. 13. P. 352.

Jiang C.F., Hsu S.H., Sun Y.M., Tsai M.H. 2020. Quantitave bioimage analysis of passaging effect on the migratory behavior of human mesenchymal stem cells during spheroid formation. Cytometry. (A). V. 97. P. 394.

Julianto I., Rindastuti Y. 2016. Topical delivery of mesenchymal stem cells "secretomes" in wound repair. Acta Med. Indones. V. 48. P. 217.

Kasper G., Mao L., Geissler S., Draycheva A., Trippens J., Kühnisch J., Tschirschmann M., Kaspar K., Perka C., Duda G.N., Klose J. 2009. Insights into mesenchymal stem cell aging: involvement of antioxidant defense and actin cytoskeleton. Stem Cells. V. 27. № 6. P. 1288.

Kessenbrock K., Plaks V., Werb Z. 2010. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. Cell. V. 141. P. 52.

Khasawneh R.B., Al Sharie A.H., Abu-El-Rub E., Serhan A.O., Obeidat H.N. 2019. Addressing the impact of different fetal bovine serum percentages on mesenchymal stem cells biological performance. Mol. Biol. Rep. V. 46. P. 4437. https://doi.org/10.1007/s11033-019-04898-1

Kim J.A., Im K.O., Park S.N., Kwon J.S., Kim S.Y., Oh K., Lee D.S., Kim M.K., Kim S.W., Jang M., Lee G., Oh Y.M., Lee S.D., Lee D.S. 2015. Cytogenetic heterogeneity and their serial dynamic changes during acquisition of cytogenetic aberrations in cultured mesenchymal stem cells. Mutat. Res. V. 777. P. 60.

Larsen M., Tremblay M.L., Yamada K.M. 2003. Phosphatases in cell-matrix adhesion and migration. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. V. 4. P 700.

Le Clainche C., Carlier M.F. 2008. Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. Physiol. Rev. V. 88. P. 489.

Li Y., Wu Q., Wang Y., Li L., Bu H., Bao J. 2017. Senescence of mesenchymal stem cells. Int. J. Mol. Med. V. 39. P. 775.

Liang X., Zhang L., Wang S., Han Q., Zhao C. 2016. Exosomes secreted by mesenchymal stem cells promote endothelial cell angiogenesis by transferring mir-125a. J. Cell Science. V. 129. P. 2182.

Liu Y., Wang H., Wang J. 2018. Exosomes as a novel pathway for regulating development and diseases of the skin. Biomed Rep. V. 8. P. 207.

Luo J., Zhao X., Tan Z., Su Z., Meng F., Zhang M. 2013. Mesenchymal-like progenitors derived from human embryonic stem cells promote recovery from acute kidney injury via paracrine actions. Cytotherapy. V. 15. P. 649.

Lynch K., Pei M. 2014. Age associated communication between cells and matrix: a potential impact on stem cell-based tissue regeneration strategies. Organogenesis. V. 10. P. 289.

Makpol S., Jam F.A., Khor S.C., Ismail Z., Mohd Yusof Y.A., Ngah W.Z. 2013. Comparative effects of biodynes, tocotrienol-rich fraction, and tocopherol in enhancing collagen synthesis and inhibiting collagen degradation in stress-induced premature senescence model of human diploid fibroblasts. Oxid. Med. Cell Longev. 2013. 298574. https://doi.org/10.1155/2013/298574

Malaquin N., Vercamer C., Bouali F., Martien S., Deruy E., Wernert N., Chwastyniak M., Pinet F., Abbadie C., Pourtier A. 2013. Senescent fibroblasts enhance early skin carcinogenic events via a paracrine MMP-PAR-1 axis. PLoS One. V. 8:e63607. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063607

Matsumura T., Zerrudo Z., Hayflick L. 1979. Senescent human diploid cells in culture: survival, DNA synthesis and morphology. J. Gerontol. V. 34. P. 328.

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

Moon S.K., Cha B.Y., Lee Y.C., Nam K.S., Runge M.S., Patterson C., Kim C.H. 2004. Age-related changes in matrix metalloproteinase-9 regulation in cultured mouse aortic smooth muscle cells. Exp. Gerontol. V. 39. P. 123.

Moujaber O., Fishbein F., Omran N., Liang Y., Colmegna I., Presley J.F, Stochaj U. 2019. Cellular senescence is associated with reorganization of the microtubule cytoskeleton. Cell Mol. Life Sci. V. 76. P. 1169.

Musina R.A., Bekchanova E.S., Sukhikh G.T. 2005. Comparison of mesenchymal stem cells obtained from different human tissues. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. V. 139. № 4. P. 504.

Mutlu L., Hufnagel D., Taylor H.S. 2015. The endometrium as a source of mesenchymal stem cells for regenerative medicine. Biol. Reprod. V. 92. № 6. P. 138.

Nagase H., Woessner J.F. 1999. Matrix metalloproteinases. J. Biological Chemistry. V. 274. P. 21491.

Niedernhofer L.J., Gurkar A.U., Wang Y., Vijg J., Hoeijmakers J.H.J., Robbins P.D. 2018. Nuclear Genomic Instability and Aging. Ann. Rev. Biochem. V. 87. P. 295.

Nikitina V., Astrelina T., Nugls V., Ostashkin A., Karaseva T., Dobrovolskaya., Suchkova Y., Lomonosova E., Rodin S., Brunchukov V., Lauk-Dubitskiy S., Brumberg V., Machova A., Kobzeva I., Bushmanov A., Samoilov A. 2018. Clonal chromosomal and genomic instability during human multipotent mesenchymal stromal cells long-term culture. PLoS One 13. e0192445. https://doi.org/10.1371/jornal.pone.0192445

Noh E.M., Kim J.M., Hong O.Y., Song H.K., Kim J.S., Kwon K.B., Lee Y.R. 2017. PTEN inhibits replicative senescence-induced MMP-1 expression by regulating NOX4-mediated ROS in human dermal fibroblasts. J. Cell. Mol. Med. V. 21. P. 3113.

Özcan S., Alessio N., Acar M.B., Mert E., Omerli F., Peluso G., Galderisi U. 2016. Unbiased analysis of senescence associated secretory phenotype (SASP) to identify common components following different genotoxic stresses. Aging (Albany NY). V. 8. P. 1316.

Page-McCaw A., Ewald A.J., Werb Z. 2007. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. V. 8. P. 221.

Phinney D.G., Prockop D.J. 2007. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views. Stem Cells. V. 25. P. 2896.

Pitiyage G.N., Slijepcevic P., Gabrani A., Chianea Y.G., Lim K.P., Prime S.S., Tilakaratne W.M., Fortune F., Parkinson E.K. 2011. Senescent mesenchymal cells accumulate in human fibrosis by a telomere-independent mechanism and ameliorate fibrosis through matrix metalloproteinases. J. Pathol. V. 223. P. 604.

Poljanskaya G.G., Vakhtin Y.B. 2003. The karyotypic structure of cell populations *in vitro* as integral system. Tsitologiia. V. 45. P. 115.

Ratushnyy A., Ezdakova M., Buravkova L. 2020. Secretome of senescent adipose-derived mesenchymal stem cells negatively regulates angiogenesis. Int. J. Mol. Sci. V. 21. P. 1802. https://doi.org/10.3390/ijms21051802

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

Savickienė J., Baronaitė S., Zentelytė A., Treigytė G., Navakauskienė R. 2016. Senescence-associated molecular and epigenetic alterations in mesenchymal stem cell cultures from amniotic fluid of normal and fetus-affected pregnancy. Stem Cells Int. 2016: 2019498. https://doi.org/10.1155/2016/2019498

Sensebé L., Krampera M., Schrezenmeier H., Bourin P., Giordano R. 2010. Mesenchymal stem cells for clinical application. Vox Sang. V. 98. P. 93.

Shaffer I.G., Slovak M.L., Campbell L.J. (Eds). 2009. An international system for human cytogenetic nomenclature. Basel: S. Karger. 138 p.

Stultz B.G., McGinnis K., Thompson E.E., Lo Surdo J.L., Bauer S.R., Hursh D.A. 2016. Chromosomal stability of mesenchymal stromal cells during in vitro culture. Cytother. V. 18. P. 336.

Shakeri H., Lemmens K., Gevaert A.B., De Meyer G.R.Y., Segers V. 2018. Cellular senescence links aging and diabetes in cardiovascular disease. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. V. 315. P. H448.

Stein J. Y., Levin Y., Uziel O., Abumock H., Solomon Z. 2018. Traumatic stress and cellular senescence: The role of war-captivity and homecoming stressors in later life telomere length. J. Affect Disord. V. 238. P.129.

Tarte K., Gaillard J., Lataillade J.J., Fouillard L., Becker M., Mossafa H., Tchirkov A., Rouard H., Henry C., Splingard M., Dulong J., Monnier D., Gourmelon P., Gorin N.C., Sensebé L. on behalf of Société Française de Greffe de Moelle et Thérapie Cellulaire. 2010. Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. Blood. V. 115. P. 1549.

Terunuma A., Ashiba K., Takane T., Sakaguchi Y., Terunuma H. 2019. Comparative transcriptomic analysis of human mesenchymal stem cells derived from dental pulp and adipose tissues. J. Stem Cells Regen. Med. V. 15. P. 8.

Turinetto V., Vitale E., Giachino C. 2016. Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells: Functional Changes and Implications in Stem Cell-Based Therapy. Int. J. Mol. Sci. 17. pii: E1164. https://doi. org/ https://doi.org/10.3390/ijms17071164

Truong N.C., Bui K.H., Van Pham P. 2018. Characterization of senescence of human adipose-derived stem cells after long-term expansion. Adv. Exp. Med. Biol. V. 1084. P. 109. https://doi.org/10.1007/5584_2018_235

Vassilieva I.O., Reshetnikova G.F., Shatrova A.N., Tsupkina N.V., Kharchenko M.V., Alekseenko L.L., Nikolsky N.N., Burova E.B. 2018. Senescence-messaging secretome factors, trigger premature senescence in human endometrium-derived stem cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. V. 496. P. 1162.

Vigetti D., Moretto P., Viola M., Genasetti A., Rizzi M., Karousou E., Pallotti F., De Luca G., Passi A. 2006. Matrix metalloproteinase 2 and tissue inhibitors of metalloproteinases regulate human aortic smooth muscle cell migration during in vitro aging. FASEB J. V. 20. P. 1118.

Vulcano F., Milazzo L., Ciccarelli C., Eramo A., Sette G., Mauro A., Macioce G., Martinelli A., La Torre R., Casalbore P., Hassan H.J., Giampaolo A. 2016. Wharton's jelly mesenchymal stromal cells have contrasting effects on proliferation and phenotype of cancer stem cells from different subtypes of lung cancer. Exp. Cell Res. V. 345. P. 190.

Wagner W., Horn P., Castoldi M., Diehlmann A., Bork S., Saffrich R., Benes V., Blake J., Pfister S., Eckstein V., Ho A.D. 2008. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. PLoS One. 3: e2213. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002213

Wang Y., Huso D.L., Harrington J., Kellner J., Jeong D.K., Turney J., McNiece I.K. 2005. Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. Cytotherapy. V. 7. P. 509.

Wang D., Jang D.J. 2009. Protein kinase CK2 regulates cytoskeletal reorganization during ionizing radiation-induced senescence of human mesenchymal stem cells. Cancer Res. V. 69. P. 8200.

Yang C., ChenY., Zhong L., You M., Ya Z., Luo M., Zhang B., Yang B., Chen Q. 2019. Homogeneity and heterogeneity of biological characteristics in mesenchymal stem cells from human umbilical cords and exfoliated deciduous teeth. https://doi.org/10.1139/bcb-2019-0253

Yin H., Pickering J. G. 2016. Cellular senescence and vascular disease: novel routes to better understanding and therapy. Can. J. Cardiol. V. 32. P. 612.

Yu J., Shi J., Zhang Y., Zhang Y., Huang Y., Chen Z., Yang J. 2018. The replicative senescent mesenchymal stem / stromal cells defect in DNA damage response and anti-oxidative capacity. Int. J. Med. Sci. V. 15. P. 771.

Zachar L., Bačenková D., Rosocha J. 2016. Activation, homing, and role of the mesenchymal stem cells in the inflammatory environment. J. Inflamm. Res. V. 9. P. 231.

Zaman W. S., Makpol S., Sathapan S., Chua K. H. 2014. Long-term *in vitro* expansion of human adipose-derived stem cells showed low risk of tumourigenicity. J. Tissue Eng. Regen. Med. V. 8. P. 67.

Zhang X., Soda Y., Takahashi K., Bai Y., Mitsuru A., Igura K., Satoh H., Yamaguchi S., Tani K., Tojo A., Takahashi T.A. 2006. Successful immortalization of mesenchymal progenitor cells derived from human placenta and the differentiation abilities of immortalized cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. V. 351. P. 853.

Zhang M., Wang Z., Zhao Y., Zhang L., Xu L., Cao L., He W. 2018. The effect of age on the regenerative potential of human eyelid adipose-derived stem cells. Stem Cells Int. 2018. 5654917. https://doi.org/10.1155/2018/5654917

CELLULAR AND MOLECULAR CHARACTERISTICS OF REPLICATIVE SENESCENCE OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS

D. E. Bobkov[a, b, *] and G. G. Poljanskaya[a]

[a] *Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064 Russia*

[b] *Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, 197376 Russia*

**e-mail: bobkov@incras.ru*

The widespread use of human mesenchymal stem cells (MSCs) in biomedical technologies necessitates a detailed study of the various properties characteristic of these cells at different periods of their life. The review is devoted to the general and comparative characteristics of different human MSCs, the analysis of various cellular processes accompanying the replicative senescence of MSCs, which is an integral part of the vital activity of these cells during long-term cultivation. Cytogenetic instability, as well as some molecular mechanisms involved in the process of replicative aging of cells, including the reorganization of the extracellular matrix and structures of the cytoskeleton, are considered in more detail in the review.

Keywords: mesenchymal stem cells, replicative senescence, karyotype, extracellular matrix, cytoskeleton