

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

УДК 576.32/.36

doi: 10.26907/2542-064X.2023.2.216-230

ИММУНОФЕНОТИП МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ РЕПЛИКАТИВНОМ СТАРЕНИИ

А.Ю. Ратушный

*ФГБУН ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем Российской академии
наук, г. Москва, 123007, Россия*

Аннотация

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) являются одной из популяций прогениторных клеток взрослого организма, участвуют в процессах физиологического обновления тканей и регенерации повреждений. В настоящее время они продолжают привлекать внимание исследователей в качестве инструмента регенеративной медицины. В то же время необходимо учитывать тканеспецифичные особенности субпопуляций МСК. МСК обладают множеством потенциально полезных свойств, которые могут значительно изменяться с возрастом. Известно, что способность клетки реагировать на внешние сигналы и регулировать свое функциональное состояние определяется репертуаром рецепторов на клеточной мембране. Таким образом, цель работы заключалась в изучении уровня экспрессии ряда поверхностных маркеров сенесцентных МСК, выделенных из жировой ткани (жтМСК). Длительная экспансия позволила получить культуру клеток, подвергнутых репликативному старению. Показано, что при клеточном старении на поверхности жтМСК повышается экспрессия CD29, CD44, CD54, CD73, CD90, HLA-ABC. Достоверных изменений по антигенам CD105 и CD51/61 в экспериментальных условиях не отмечено. При этом выявленные изменения связаны с увеличением количества маркеров на единицу площади поверхности клетки, а не только с увеличением клеточного размера или аутофлуоресценции. Обнаруженные изменения могут лежать в основе ряда модификаций свойств сенесцентных МСК, включая миграцию, адгезию, иммуномодуляторную и ангиогенную активности.

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки (МСК), клеточное старение, иммунофенотип, проточная цитофлуориметрия

Введение

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) обладают широким спектром биологических функций, участвуют в поддержании тканевого гомеостаза и регенерации. Они проявляют иммуномодулирующие, ангиогенные, противовоспалительные и антиапоптотические свойства. При возникновении повреждений в тканях МСК секретируют паракринные факторы, стимулирующие пролиферацию, миграцию, дифференцировку и др. На настоящий момент данная клеточная популяция рассматривается как потенциальный инструмент для регенеративной медицины [1, 2]. МСК были получены из целого ряда тканевых источников, включая костный мозг, жировую ткань, амниотическую жидкость, амниотическую мембрану, пульпу зуба, эндометрий, зачатки конечностей, менструальную кровь, периферическую кровь, слюнные железы, кожу, край-

ною плоть, синовиальную жидкость, Вартонов студень и др. [3]. Тем не менее, несмотря на соответствие выделяемых клеток минимальным критериям [4], что позволяет относить их к МСК, получаемые культуры в значительной степени различаются. Тканеспецифичные варианты дифференцировочной активности, состава поверхностных маркеров, протеома, транскриптома и секретома продолжают изучаться [5, 6]. Новые данные позволяют разработать стандарты для медицинских клеточных продуктов с учетом субпопуляционных особенностей клеток [6]. Одним из наиболее перспективных источников МСК является жировая ткань, позволяющая получить аутологичные клетки в большом количестве при минимальном хирургическом вмешательстве.

Возраст доноров является одним из основных факторов, определяющих качество трансплантируемых МСК [7]. С другой стороны, независимо от возраста донора клетки неизбежно приобретают сенесцентный фенотип после продолжительной экспансии *in vitro* [8, 9]. Так же, как и другие клетки, МСК изменяют свои морфофункциональные характеристики при активации сенесцентного состояния. Происходит необратимый арест клеточного цикла, изменяется морфология, активность органелл, экспрессия генов, обнаруживается ряд других маркеров клеточного старения. Подобные изменения создают необходимость контроля клеточного старения при создании клеточных продуктов для медицинского применения.

Существует необходимость изучения клеточных механизмов, лежащих в основе возрастных изменений, и вне контекста клеточной терапии. С возрастом доля сенесцентных клеток в организме увеличивается, что повышает их влияние на здоровье и может быть одним из драйверов развития различных заболеваний, ассоциированных со старением. Сенесцентные МСК продолжают взаимодействовать со своим окружением, оказывая локальное и системное влияние на многие процессы, включая канцерогенез [10–12].

Взаимодействие клеток между собой и с внеклеточным матриксом (ВКМ) осуществляется через различные поверхностные рецепторы, в том числе через CD29, CD44, CD54, CD51/61, CD73, CD90, CD105, HLA-ABC. Изменение уровня экспрессии отдельных рецепторов влияет на способность клетки реагировать на определенные сигналы и регулировать свое морфофункциональное состояние, а также влиять на свое микроокружение. В свою очередь, это может приводить к смещению тканевого гомеостаза. Известно, что клеточное старение МСК ассоциировано с модификацией их иммуномодуляторных, ангиогенных и других свойств [9, 10, 13]. В основе данного феномена, среди прочего, могут быть изменения в экспрессии мембранных рецепторов. Таким образом, цель нашей работы заключалась в изучении уровня экспрессии ряда поверхностных маркеров сенесцентных МСК, выделенных из жировой ткани.

1. Материалы и методы

МСК выделяли из стромально-васкулярной фракции жировой ткани человека (жтМСК) с использованием стандартной методики. Эксперименты проведены с соблюдением этических норм и одобрены биоэтической комиссией ГНЦ РФ – ИМБП РАН (разрешение № 550/МСК/22/07/20). ВКМ жировой ткани разрушали при помощи раствора 0.075% коллагеназы. Суспензию клеток высевали на культуральный пластик на 15–18 ч (*overnight*), после чего тщательно промывали фосфатным буферным раствором. Более подробно данная методика

описана в работе Zuk et al., 2001 [14]. Полученные клетки культивировали в среде α -MEM (Gibco, США), содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки (HyClone, США), 50 ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия), в условиях 5% CO₂, 37 °С, 100% влажности. Донорами были пять женщин 35–45 лет. На втором пассаже (P2) проводили иммунофенотипирование клеток и оценку потенциала к дифференцировке в остеогенном и адипогенном направлениях для подтверждения соответствия минимальным критериям МСК [4]. Анализируемые клетки имели характерный для МСК иммунофенотип (CD90+, CD73+, CD105+, CD44+, CD29+, HLA-ABC+, CD31-, CD34-, CD45-) и были способны к дифференцировке в канонических направлениях. Длительное культивирование продолжали до достижения лимита Хейфлика и активации репликативного старения (до 21–23 пассажей). Активацию сенесцентного состояния подтверждали по ряду признаков, что описано в предыдущих публикациях [15, 16]. В частности, экспрессию β -галактозидазы, ассоциированной со старением (SA- β -gal), оценивали с помощью набора Senescence Cells Histochemical Staining Kit (Sigma, США) согласно инструкции производителя. Анализировали клетки с использованием светового фазово-контрастного микроскопа Nikon Eclipse TiU (Nikon, Япония).

Клетки поздних (P21–23) и ранних (P2–6) пассажей в рамках каждого отдельного эксперимента изучали одновременно, чтобы минимизировать влияние сторонних факторов. Для анализа МСК снимали с пластика при помощи раствора аккутазы (Sigma, США, кат. A6964), в каждом образце оценивали не менее 10 000 живых клеток. Экспрессию поверхностных рецепторов оценивали с помощью специфических антител с флуоресцентными метками методом проточной цитофлуориметрии на приборе Accuri C6 (BD, США). Анализировали CD29 (кат. 559883, BD, США), CD44 (кат. 555479, BD, США), CD54 (кат. IM1239U, Beckman Coulter, США), CD51/61 (кат. 555505, BD, США), CD73 (кат. 550257, BD, США), CD90 (кат. IM1839U, Beckman Coulter, США), CD105 (кат. A07414, Beckman Coulter, США), HLA-ABC (кат. IM1838U, Beckman Coulter, США). Выбор этих антигенов обусловлен их наиболее выраженной экспрессией на МСК и частотой использования для характеристики данной клеточной популяции. Аутофлуоресценцию анализировали в образцах без добавления специфических антител (при длине волны 530 нм). Среднюю интенсивность флуоресценции определяли как среднее значение флуоресценции в каждой анализируемой клеточной популяции с помощью программного обеспечения BD Accuri C6 Software (BD, США).

Для оценки относительного размера и гранулярности МСК использовали метод проточной цитофлуориметрии. Датчики регистрируют поглощение и рассеяние света клеткой (прямое (Forward Scatter – FSC-A) и угловое (Side Scatter – SSC-A)). FSC-A позволяет судить о размерах клетки, а SSC-A – о гранулярности цитоплазмы.

Полученные данные подвергались статистической обработке с использованием STATISTICA 10 (StatSoft, США). В качестве характеристик полученных выборок использовали среднее значение и стандартное отклонение ($\bar{x} \pm SD$). Для определения достоверности различий между выборками применяли непараметрический критерий Манна–Уитни при выбранном уровне значимости $p \leq 0.05$.

2. Результаты и обсуждение

Одним из первых этапов работы являлось получение сенесцентных жтМСК и подтверждение их сенесцентного состояния. В данной работе клетки длительно культивировали до достижения лимита Хейфлика. Время пассирования составляло до 160 дней (до 23 пассажей). Сходное время поддержания культуры жтМСК до активации сенесцентного состояния было показано и другими исследователями [11, 17]. Сенесцентное состояние характеризуется целым рядом изменений, включая снижение пролиферации, экспрессию SA- β -gal, модификацию работы генов и др. Ранее мы подробно изучили данные изменения, проявляющиеся в среднем к двадцать первому пассажу [16]. При достижении культуры пресенесцентного состояния размораживали идентичную «молодую» культуру. Дальнейший анализ проводили одновременно для снижения влияния сторонних эффектов.

Одной из наиболее очевидных характеристик сенесцентных клеток является изменение морфологии и активация SA- β -gal, что относительно легко поддается наблюдению при помощи микроскопии и проточной цитофлуориметрии (рис. 1 а, б).

Сенесцентные клетки, полностью остановившие клеточный цикл, способны сохранять жизнеспособность и функциональную активность довольно долго, не запуская апоптотические каскады и продолжая увеличиваться в размерах и накапливать широкий спектр различных цитоплазматических включений [10, 18]. Проточная цитофлуориметрия использована для количественного сравнения морфологических показателей МСК в суспензии. Данная методика позволяет оценить показатели рассеянного света, которые обусловлены размером, формой, плотностью клеток и гранулярностью внутриклеточной структуры. Было показано, что на 21–23 пассажах увеличивался средний размер МСК и вакуолизация цитоплазмы, оценка которых осуществлялась по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию соответственно. Таким образом, основываясь на наших более ранних работах и новых данных, мы заключили, что исследуемые культуры на 21–23 пассажах проявляют признаки сенесцентности.

Далее изучали непосредственно иммунофенотип жтМСК при репликативном старении. Известно, что доля клеток, позитивных по анализируемым маркерам, является относительно стабильной. Несмотря на некоторую гетерогенность МСК при выделении в культуру по степени коммитированности, доля клеток, позитивных по наиболее характерным антигенам, остается близкой к 100% даже при длительном культивировании. Этот феномен был неоднократно описан в научной литературе и подтвержден, в том числе, в наших работах [9, 15, 19, 20]. С другой стороны, данных об изменениях экспрессии антигенов (количества белка на мембране отдельной клетки) на МСК при активации сенесцентного состояния немного. Так, в недавнем обзоре [21] автор приводит лишь две работы, в которых изучался данный параметр по CD90, CD105, CD44. Они показали, что на МСК, выделенных из костного мозга и амниотической жидкости, снижается экспрессия этих маркеров через 8 и 14 пассажей соответственно [22, 23]. Тем не менее представленные в оригинальной работе Jung et al. репрезентативные гистограммы, полученные с помощью проточной цитофлуориметрии, не могут быть интерпретированы однозначно, а полноценные количественные данные не приведены. В 2019 г. была опубликована статья, в которой авторы, в том числе, анализировали иммунофенотип МСК костного

мозга, полученных от пожилых (≥ 70 лет) и молодых (18–35 лет) доноров [24]. К сожалению, в работе не ставилась задача по анализу экспрессии маркеров и отсутствует сравнение количественных данных. Тем не менее приведенные репрезентативные диаграммы позволяют предположить повышение экспрессии CD90 у пожилых доноров и отсутствие изменений по CD73 и CD105.

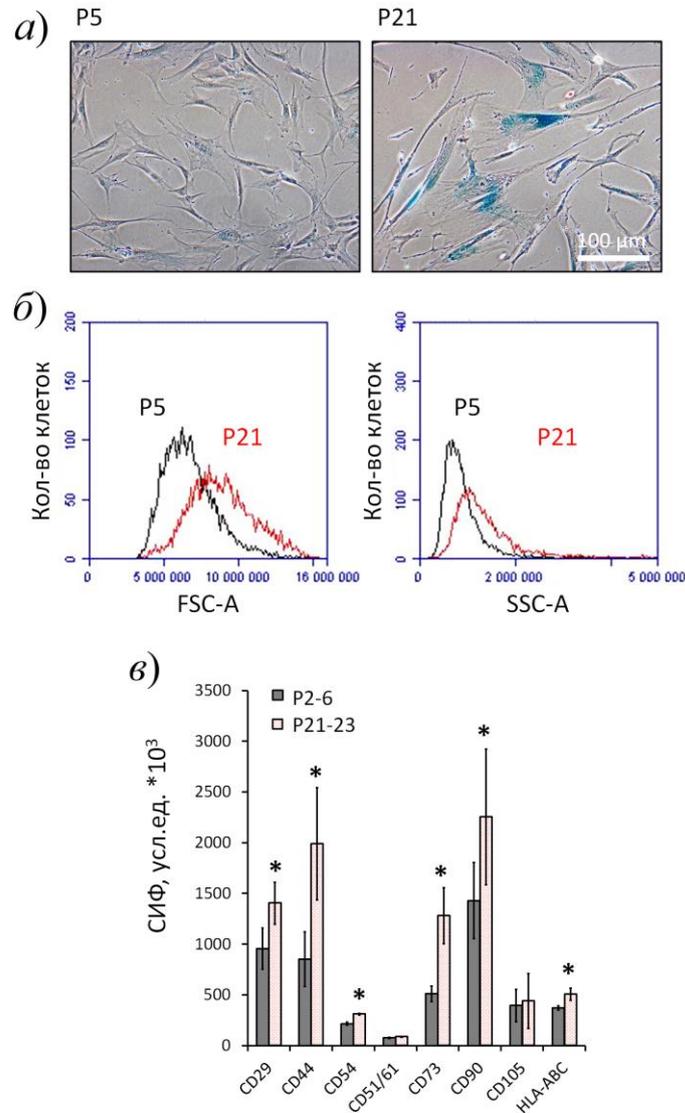


Рис. 1. Признаки клеточного старения МСК и экспрессия поверхностных маркеров при длительном культивировании: а) – выявление активной β -галактозидазы (SA- β -gal), ассоциированной со старением, в МСК на ранних (P5) и поздних (P21) пассажах методом световой микроскопии; б) – распределение МСК по размеру (FSC-A) и гранулярности (SSC-A) по данным проточной цитофлуориметрии. Представлены результаты репрезентативного эксперимента; в) – средняя интенсивность флуоресценции (СИФ), отражающая экспрессию антигенов на поверхности МСК, на ранних (P2–6) и поздних (P21–23) пассажах. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение, $n \geq 5$, * – $p \leq 0.05$

В настоящей работе также использована проточная цитофлуориметрия с применением специфических антител с флуоресцентной меткой. Показано, что при клеточном старении на поверхности жтМСК повышается экспрессия CD29, CD44, CD54, CD73, CD90, HLA-ABC (рис. 1, в). При этом по маркерам CD44, CD73 отмечено увеличение экспрессии более чем в 2 раза. Достоверных изменений по антигенам CD105 и CD51/61 в экспериментальных условиях не выявлено. В исследовании на эндотелиальных клетках CD44 был определен как один из «генов клеточной адгезии, индуцированных старением». Повышенная экспрессия способствовала адгезии моноцитов, что может быть связано с развитием атеросклероза [25]. В исследованиях на МСК показано, что CD44 вместе с CD29 участвует в VEGF-индуцированной миграции [26]. CD73 способствует повышению уровня внеклеточного аденозина, который оказывает мощный иммуносупрессивный эффект. Острое CD73-зависимое повышение уровня аденозина в нормальных тканях в основном оказывает тканезащитное действие, тогда как хроническое увеличение концентрации при терапии рака способствует патологическим процессам ремоделирования и фиброзу [27]. CD90 играет роль во взаимодействиях клетка – клетка и клетка – матрикс, участвует в регенерации нервов, активации Т-клеток, адгезии и миграции лейкоцитов и клеток меланомы, пролиферации и миграции фибробластов при заживлении ран [28]. Таким образом, обнаруженные изменения могут лежать в основе целого ряда изменений в функциональной активности МСК при клеточном старении.

Одной из причин обнаруженных изменений в экспрессии поверхностных молекул могло быть изменение субпопуляционного состава культуры при длительном культивировании. Как уже было отмечено выше, МСК представляют собой гетерогенную популяцию клеток со сходными свойствами. При выделении их в культуру *in vitro* баланс сигналов от клеточной ниши нарушается, в том числе исчезает фактор контактного ингибирования. В таких условиях клетки начинают активно делиться и с увеличением числа пассажей неизбежно происходит выщепление наиболее активно пролиферирующей субпопуляции. Другие субпопуляции будут вытесняться. Для проверки гипотезы о влиянии на исследуемые параметры иммунофенотипа мы анализировали клетки не только на ранних (P2–6) и поздних (P21–23), но и на средних (P10–15) пассажах (рис. 2). Показано, что экспрессия CD29, CD44, CD54, CD73, CD90, HLA-ABC, CD105 и CD51/61 на средних и ранних пассажах не отличалась.

Другая причина обнаруженных изменений могла быть связана с клеточной морфологией. Так как активация сенесцентного состояния сопряжена с увеличением размера клетки, то логично предположить увеличение количества клеточных рецепторов из-за увеличения площади поверхности клеточной мембраны. Количество мембранных антигенов на единицу площади при этом может не изменяться. Поэтому следующим шагом нашего исследования стало исключение влияния на исследуемые параметры такого фактора, как размер жтМСК. Для этого клетки ранних и поздних пассажей при оценке морфологии с помощью проточной цитометрии были выделены в отдельные узкие гейты R1 (клетки малого размера), R3 (клетки среднего размера), R4 (клетки большого размера) (рис. 3).

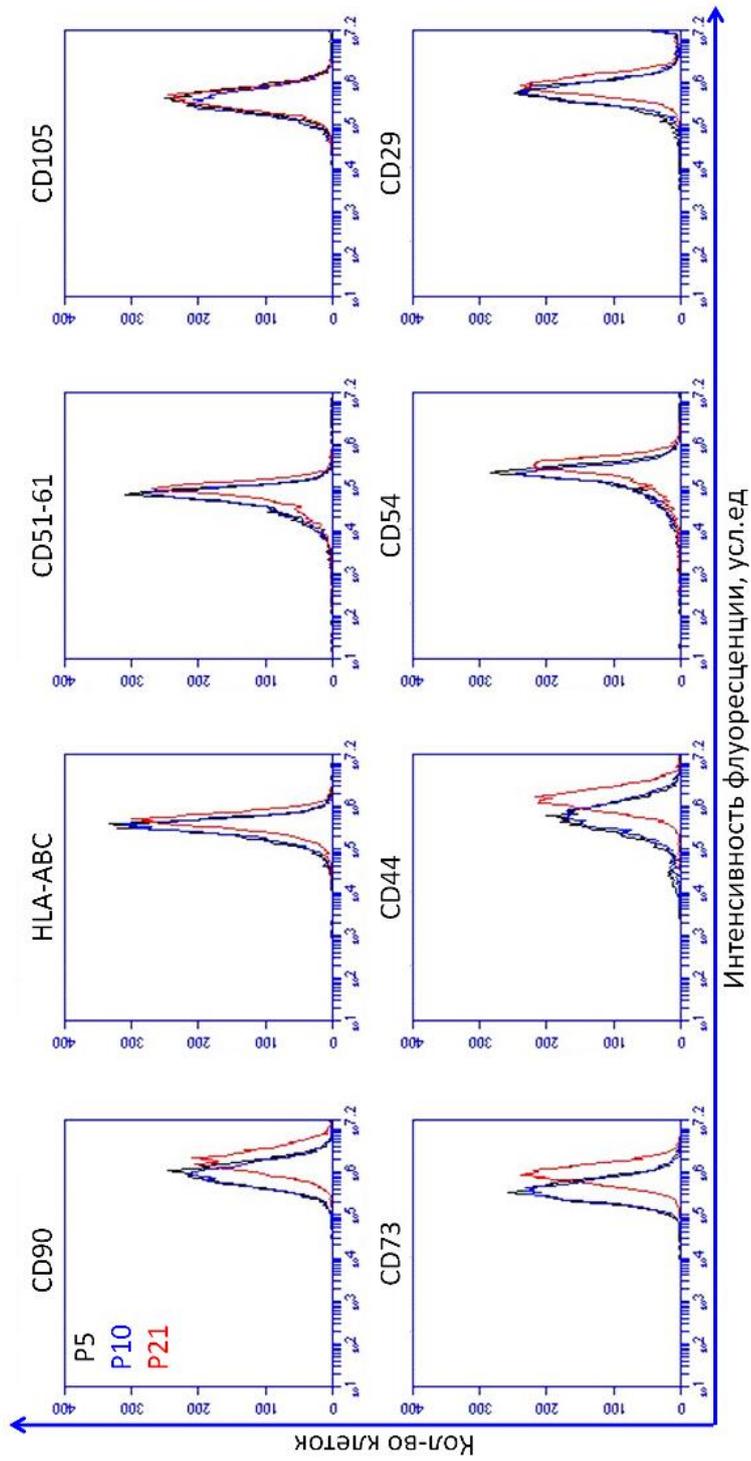


Рис. 2. Экспрессия поверхностных маркеров на МСК при длительном культивировании на различных пассажах: P5 и P10, а также P21 (при подтвержденном сенесцентном состоянии). Представлены данные репрезентативного эксперимента

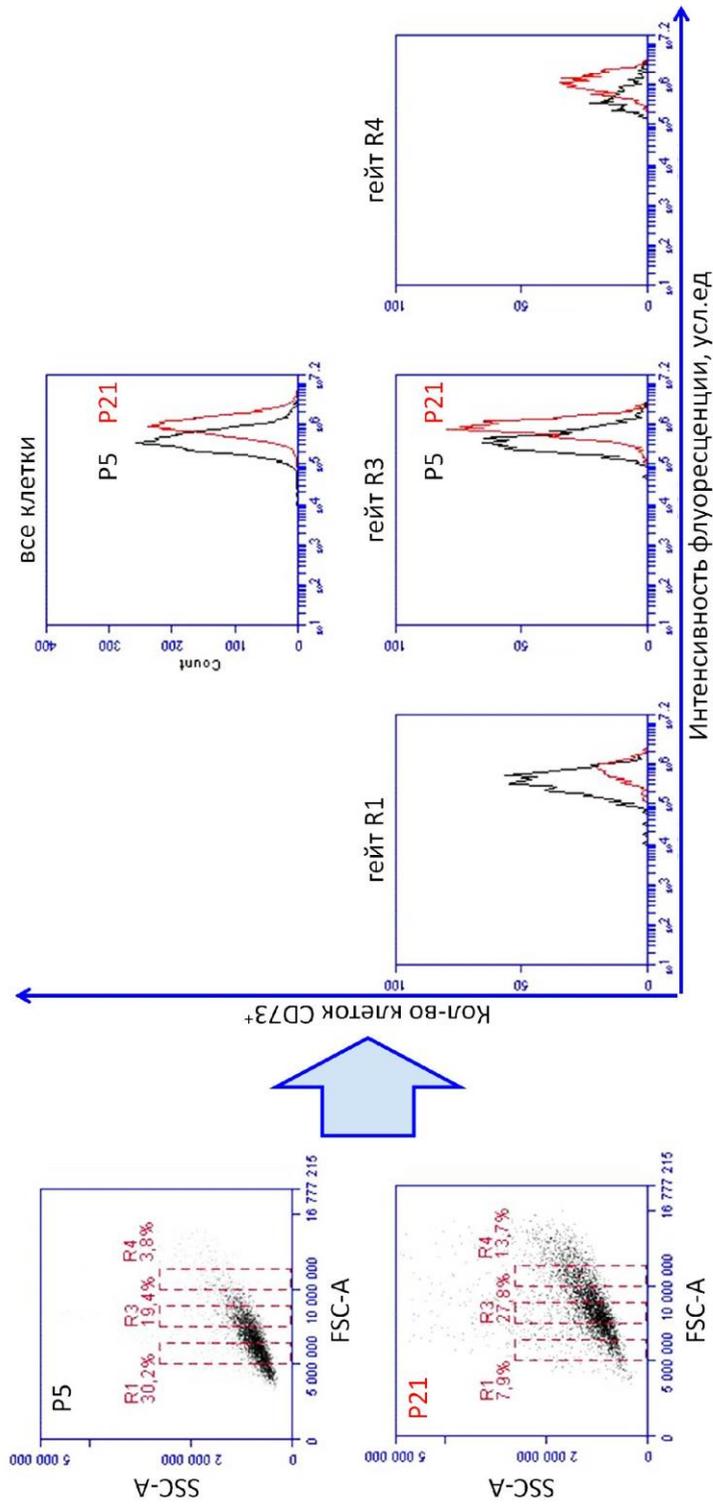


Рис. 3. Гейтирование МСК разных пассажей по размеру (гейт R3). Данный подход позволяет исключить из дальнейшего анализа все клетки, которые больше или меньше заданного диапазона. Протоочная цитофлуориметрия, данные репрезентативного эксперимента

Данный подход позволил взять для дальнейшего анализа МСК одного размера и проводить сравнение между изучаемыми группами, минимизируя влияние морфологии до пренебрежимо малых величин. Сравнение МСК разных пассажей показывало сходные результаты несмотря на гейт, поэтому далее представлены данные только по среднему гейту – R3. На примере CD73 показано, что разница между сенесцентными и «молодыми» клетками по интенсивности флуоресценции сохраняется.

Проведено сравнение по всем исследуемым антигенам (табл. 1).

Табл. 1

Размер, аутофлуоресценция и экспрессия мембранных антигенов МСК при длительном культивировании. Коэффициент изменений отражает соотношение параметра на поздних и ранних пассажах. * – $p \leq 0.05$

Показатель	Гейт	Данные репрезентативного эксперимента			Коэффициент изменений по пяти экспериментам, среднее значение \pm SD
		P2–6, усл. ед. $\times 10^3$	P21–23, усл. ед. $\times 10^3$	Коэффициент изменений (P21–23/P2–6)	
Средний FSC-A	Все клетки	7296	9454	1.30	1.31 \pm 0.02*
	Гейт R3	7629	7732	1.01	1.01 \pm 0.01
Аутофлуоресценция	Все клетки	11	19	1.67	1.62 \pm 0.06*
	Гейт R3	12	14	1.18	1.16 \pm 0.03
CD29	Все клетки	941	1362	1.45	1.45 \pm 0.01*
	Гейт R3	920	1122	1.22	1.25 \pm 0.04*
CD44	Все клетки	688	1805	2.62	2.93 \pm 0.44*
	Гейт R3	682	1397	2.05	2.24 \pm 0.27*
CD54	Все клетки	220	325	1.48	1.74 \pm 0.37*
	Гейт R3	229	265	1.16	1.30 \pm 0.20*
CD51/61	Все клетки	72	87	1.21	1.29 \pm 0.21
	Гейт R3	77	74	0.97	1.00 \pm 0.04
CD73	Все клетки	481	1089	2.26	2.88 \pm 0.87*
	Гейт R3	468	888	1.90	2.28 \pm 0.53*
CD90	Все клетки	1124	2415	2.15	2.12 \pm 0.04*
	Гейт R3	1117	1764	1.58	1.50 \pm 0.12*
CD105	Все клетки	489	503	1.03	1.49 \pm 0.65
	Гейт R3	498	408	0.82	1.10 \pm 0.39
HLA-ABC	Все клетки	355	497	1.40	1.59 \pm 0.27*
	Гейт R3	365	415	1.14	1.32 \pm 0.26*

По представленным данным репрезентативного эксперимента хорошо видно, что показатель FSC-A, отражающий размер клетки, увеличивается при репликативном старении на 30%. Гейтирование по R3 позволяет почти полностью нивелировать данный фактор. Также представлены данные по аутофлуоресценции. Средний уровень аутофлуоресценции МСК увеличивается при репликативном старении более чем на 60%. В теории этот фактор тоже мог бы

оказывать влияние на результаты, дополнительно повышая уровень флуоресценции в группе P21–23. Тем не менее абсолютные значения аутофлуоресценции относительно малы, что позволяет пренебречь этим фактором. Гейтирование еще больше снижает разницу между клетками ранних и поздних пассажей. Клеточное старение ассоциировано с накоплением липофусцина, который и вносит основной вклад в повышение уровня флуоресценции.

К сожалению, пока сложно говорить о конкретных механизмах, лежащих в основе наблюдаемых изменений экспрессии поверхностных молекул. Вероятно, одним из индукторов может выступать так называемый секреторный фенотип, ассоциированный со старением (Senescence-Associated Secretory Phenotype, SASP). Известно, что он может отличаться в зависимости от типа клеток и при различных способах индукции клеточного старения, но для него характерно увеличение провоспалительной составляющей. Изменение содержания цитокинов в среде может модулировать внутриклеточные сигнальные пути, приводя к альтерациям в фенотипе. Тем не менее эту гипотезу еще предстоит проверить.

Таким образом, сравнение данных по гейтированным и негейтированным клеткам указывает на то, что размер МСК действительно оказывает значимое влияние на исследуемые параметры. В то же время обнаруженные закономерности сохраняются и при гейтировании по R3. Таким образом, клеточное старение приводит к значимому увеличению экспрессии CD29, CD44, CD54, CD73, CD90, HLA-ABC на поверхности жтМСК. При этом данный эффект обусловлен не только увеличением размера клетки, но и увеличением количества исследуемых антигенов на единицу площади клеточной мембраны. Наибольшее увеличение показано для антигенов CD44 и CD73. Обнаруженные изменения могут лежать в основе ряда модификаций свойств сенесцентных МСК, включая миграцию, адгезию, иммуномодуляторную и ангиогенную активности.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-75-10117).

Литература

1. Pittenger M.F., Discher D.E., Péault B.M., Phinney D.G., Hare J.M., Caplan A.I. Mesenchymal stem cell perspective: Cell biology to clinical progress // *npj Regen. Med.* 2019. V. 4, No 1. art. 22. doi: 10.1038/s41536-019-0083-6.
2. Jovic D., Yu Y., Wang D., Wang K., Li H., Xu F., Liu C., Liu J., Luo Y. A brief overview of global trends in MSC-based cell therapy // *Stem Cell Rev. Rep.* 2022. V. 18, No 5. P. 1525–1545. doi: 10.1007/s12015-022-10369-1.
3. Ullah I., Subbarao R.B., Rho G.J. Human mesenchymal stem cells – current trends and future prospective // *Biosci. Rep.* 2015. V. 35, No 2. art. e00191. doi: 10.1042/BSR20150025.
4. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop Dj., Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // *Cytotherapy.* 2006. V. 8, No 4. P. 315–317. doi: 10.1080/14653240600855905.

5. *Elahi K.C., Klein G., Avci-Adali M., Sievert K.D., MacNeil S., Aicher W.K.* Human mesenchymal stromal cells from different sources diverge in their expression of cell surface proteins and display distinct differentiation patterns // *Stem Cells Int.* 2016. V. 2016. art. 5646384. doi: 10.1155/2016/5646384.
6. *Wright A., Arthaud-Day M.L., Weiss M.L.* Therapeutic use of mesenchymal stromal cells: The need for inclusive characterization guidelines to accommodate all tissue sources and species // *Front. Cell Dev. Biol.* 2021. V. 9. art. 632717. doi: 10.3389/fcell.2021.632717.
7. *Baker N., Boyette L.B., Tuan R.S.* Characterization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in aging // *Bone.* 2015. V. 70. P. 37–47. doi: 10.1016/j.bone.2014.10.014.
8. *Dimmeler S., Leri A.* Aging and disease as modifiers of efficacy of cell therapy // *Circ. Res.* 2008. V. 102, No 11. P. 1319–1330. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.175943.
9. *Li Y., Wu Q., Wang Y., Li L., Bu H., Bao J.* Senescence of mesenchymal stem cells (Review) // *Int. J. Mol. Med.* 2017. V. 39, No 4. P. 775–782. doi: 10.3892/ijmm.2017.2912.
10. *Turinetto V., Vitale E., Giachino C.* Senescence in human mesenchymal stem cells: Functional changes and implications in stem cell-based therapy // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. V. 17, No 7. art. 1164. doi: 10.3390/ijms17071164.
11. *Legzdina D., Romanauska A., Nikulshin S., Kozlovskaya T., Berzins U.* Characterization of senescence of culture-expanded human adipose-derived mesenchymal stem cells // *Int. J. Stem Cells.* 2016. V. 9, No 1. P. 124–136. doi: 10.15283/ijsc.2016.9.1.124.
12. *Ratushnyy A.Yu., Buravkova L.B.* Cell senescence and mesenchymal stromal cells // *Hum. Physiol.* 2020. V. 46, No 1. P. 85–93. doi: 10.1134/S0362119720010132.
13. *Ratushny A., Ezdakova M., Buravkova L.* Secretome of senescent adipose-derived mesenchymal stem cells negatively regulates angiogenesis // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21, No 5. art. 1802. doi: 10.3390/ijms21051802.
14. *Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J.W., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz H.P., Hedrick M.H.* Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies // *Tissue Eng.* 2001. V. 7, No 2. P. 211–228. doi: 10.1089/107632701300062859.
15. *Ratushnyy A., Lobanova M., Buravkova L.* Expansion of adipose tissue-derived stromal cells at “physiologic” hypoxia attenuates replicative senescence // *Cell Biochem. Funct.* 2017. V. 35, No 4. P. 232–243. doi: 10.1002/cbf.3267.
16. *Ratushnyy A.Yu., Rudimova Y.V., Buravkova L.B.* Replicative senescence and expression of autophagy genes in mesenchymal stromal cells // *Biochemistry (Moscow).* 2020. V. 85, No 10. P. 1169–1177. doi: 10.1134/S0006297920100053.
17. *Chen J.-Y., Mou X.-Z., Du X.-C., Xiang C.* Comparative analysis of biological characteristics of adult mesenchymal stem cells with different tissue origins // *Asian Pac. J. Trop. Med.* 2015. V. 8, No 9. P. 739–746. doi: 10.1016/j.apjtm.2015.07.022.
18. *Campisi J., d’Adda di Fagagna F.* Cellular senescence: When bad things happen to good cells // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007. V. 8, No 9. P. 729–740. doi: 10.1038/nrm2233.
19. *Wagner W., Horn P., Castoldi M., Diehlmann A., Bork S., Saffrich R., Benes V., Blake J., Pfister S., Eckstein V., Ho A.D.* Replicative senescence of mesenchymal stem cells: A continuous and organized process // *PLoS ONE.* 2008. V. 3, No 5. art. e2213. doi: 10.1371/journal.pone.0002213.
20. *Safwani W.K.Z.W., Makpol S., Sathapan S., Chua K.H.* The impact of long-term in vitro expansion on the senescence-associated markers of human adipose-derived stem cells // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2012. V. 166, No 8. P. 2101–2113. doi: 10.1007/s12010-012-9637-4.

21. *Liu J., Ding Y., Liu Z., Liang X.* Senescence in mesenchymal stem cells: Functional alterations, molecular mechanisms, and rejuvenation strategies // *Front. Cell Dev. Biol.* 2020. V. 8. art. 258. doi: 10.3389/fcell.2020.00258.
22. *Savickienė J., Baronaitė S., Zentelytė A., Treigyte G., Navakauskienė R.* Senescence-associated molecular and epigenetic alterations in mesenchymal stem cell cultures from amniotic fluid of normal and fetus-affected pregnancy // *Stem Cells Int.* 2016. V. 2016. art. 2019498. doi: 10.1155/2016/2019498.
23. *Jung E.M., Kwon O., Kwon K.S., Cho Y.S., Rhee S.K., Min J.K., Oh D.B.* Evidences for correlation between the reduced VCAM-1 expression and hyaluronan synthesis during cellular senescence of human mesenchymal stem cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011. V. 404, No 1. P. 463–469. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.12.003.
24. *Gnani D., Crippa S., della Volpe L., Rossella V., Conti A., Lettera E., Ravis S., Ometti M., Fraschini G., Bernardo M.E., Di Micco R.* An early-senescence state in aged mesenchymal stromal cells contributes to hematopoietic stem and progenitor cell clonogenic impairment through the activation of a pro-inflammatory program // *Aging Cell.* 2019. V. 18, No 3. art. e12933. doi: 10.1111/accel.12933.
25. *Mun G.I., Boo Y.C.* Identification of CD44 as a senescence-induced cell adhesion gene responsible for the enhanced monocyte recruitment to senescent endothelial cells // *Am. J. Physiol.: Heart Circ. Physiol.* 2010. V. 298, No 6. P. H2102–2111. doi: 10.1152/ajpheart.00835.2009.
26. *Ke C., Chen J., Guo Y., Chen Z.W., Cai J.* Migration mechanism of mesenchymal stem cells studied by QD/NSOM // *BBA, Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 2015. V. 1848, No 3. P. 859–868. doi: 10.1016/j.bbamem.2014.12.013.
27. *de Leve S., Wirsdörfer F., Jendrossek V.* Targeting the immunomodulatory CD73/adenosine system to improve the therapeutic gain of radiotherapy // *Front. Immunol.* 2019. V. 10. art. 698. doi: 10.3389/fimmu.2019.00698.
28. *Sauzay C., Voutetakis K., Chatziioannou A., Chevet E., Avril T.* CD90/Thy-1, a cancer-associated cell surface signaling molecule // *Front. Cell Dev. Biol.* 2019. V. 7. art. 66. doi: 10.3389/fcell.2019.00066.

Поступила в редакцию 05.10.2022
Принята к публикации 21.11.2022

Ратушный Андрей Юрьевич – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории клеточной физиологии

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт медико-биологических проблем Российской академии наук

Хорошевское шоссе 76 А, Москва, 123007, Россия

E-mail: ratushkin@mail.ru

Immunophenotype of Replicative Senescent Mesenchymal Stromal Cells*A.Yu. Ratushnyy**SSC RF – Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences,
Moscow, 123007 Russia*E-mail: *ratushkin@mail.ru*

Received October 5, 2022; Accepted November 21, 2022

Abstract

Mesenchymal stromal cells (MSCs), a population of progenitor cells in adult tissues, are involved in the processes of physiological tissue renewal and damage-induced regeneration. MSCs have been widely studied as regenerative medicine agents. In this regard, the tissue-specific features of MSC subpopulations should be taken into account. MSCs have many potentially beneficial properties that can alter significantly with age. The ability of a cell to respond to external signals and regulate its functional state is commonly attributed to the repertoire of receptors on the cell membrane. This article considers the surface marker expression of senescent adipose-derived MSCs (AD-MSCs). Replicative senescence was caused by long-term cultivation. An increase in the expression of CD29, CD44, CD54, CD73, CD90, and HLA-ABC on the AD-MSCs was shown. The expression of CD105 and CD51/61 did not change reliably under the experimental conditions. The revealed effects are related not only to the larger cell size or higher autofluorescence, but also to the increased number of markers per unit area of the cell surface. The detected changes may underlie a number of modifications in the properties of senescent MSCs, including migration, adhesion, and immunomodulatory and angiogenic activities.

Keywords: mesenchymal stromal cells (MSCs), cell senescence, immunophenotype, flow cytometry

Acknowledgements. This study was supported by the Russian Science Foundation (project no. 21-75-10117).

Figure Captions

Fig. 1. Signs of MSC senescence and surface marker expression in long-term cultivation: a) – senescence-associated active β -galactosidase (SA- β -gal) in MSCs at early (P5) and late (P21) passages detected by light microscopy; b) – distribution of MSCs by size (FSC-A) and granularity (SSC-A) based on flow cytometry data. The results of a representative experiment are shown; c) – mean fluorescence intensity (MFI), which is associated with antigen expression on the MSC surface, at early (P2–6) and late (P21–23) passages. All data are reported as the mean value \pm standard deviation, $n \geq 5$, * – $p \leq 0.05$.

Fig. 2. Expression of surface markers on MSCs in long-term cultivation at different passages: P5 and P10, as well as P21 (with confirmed senescence). The results of a representative experiment are shown.

Fig. 3. Size gating of MSCs at different passages (gate R3). In this approach, cells outside the specified size range, i.e., either larger or smaller, are excluded from further analysis. Flow cytometry, the results of a representative experiment.

References

1. Pittenger M.F., Discher D.E., Péault B.M., Phinney D.G., Hare J.M., Caplan A.I. Mesenchymal stem cell perspective: Cell biology to clinical progress. *npj Regener. Med.*, 2019, vol. 4, no. 1, art. 22. doi: 10.1038/s41536-019-0083-6.
2. Jovic D., Yu Y., Wang D., Wang K., Li H., Xu F., Liu C., Liu J., Luo Y. A brief overview of global trends in MSC-based cell therapy. *Stem Cell Rev. Rep.*, 2022, vol. 18, no. 5, pp. 1525–1545. doi: 10.1007/s12015-022-10369-1.
3. Ullah I., Subbarao R.B., Rho G.J. Human mesenchymal stem cells – current trends and future prospective. *Biosci. Rep.*, 2015, vol. 35, no. 2, art. e00191. doi: 10.1042/BSR20150025.
4. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop Dj., Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006, vol. 8, no. 4, pp. 315–317. doi: 10.1080/14653240600855905.
5. Elahi K.C., Klein G., Avci-Adali M., Sievert K.D., MacNeil S., Aicher W.K. Human mesenchymal stromal cells from different sources diverge in their expression of cell surface proteins and display distinct differentiation patterns. *Stem Cells Int.*, 2016, vol. 2016, art. 5646384. doi: 10.1155/2016/5646384.
6. Wright A., Arthaud-Day M.L., Weiss M.L. Therapeutic use of mesenchymal stromal cells: The need for inclusive characterization guidelines to accommodate all tissue sources and species. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2021. vol. 9. art. 632717. doi: 10.3389/fcell.2021.632717.
7. Baker N., Boyette L.B., Tuan R.S. Characterization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in aging. *Bone*, 2015, vol. 70, pp. 37–47. doi: 10.1016/j.bone.2014.10.014.
8. Dimmeler S., Leri A. Aging and disease as modifiers of efficacy of cell therapy. *Circ. Res.*, 2008, vol. 102, no. 11, pp. 1319–1330. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.175943.
9. Li Y., Wu Q., Wang Y., Li L., Bu H., Bao J. Senescence of mesenchymal stem cells (Review). *Int. J. Mol. Med.*, 2017, vol. 39, no. 4, pp. 775–782. doi: 10.3892/ijmm.2017.2912.
10. Turinetti V., Vitale E., Giachino C. Senescence in human mesenchymal stem cells: Functional changes and implications in stem cell-based therapy. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, vol. 17, no. 7, art. 1164. doi: 10.3390/ijms17071164.
11. Legzdina D., Romanuska A., Nikulshin S., Kozlovska T., Berzins U. Characterization of senescence of culture-expanded human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Int. J. Stem Cells*, 2016, vol. 9, no. 1, pp. 124–136. doi: 10.15283/ijsc.2016.9.1.124.
12. Ratushnyy A.Yu., Buravkova L.B. Cell senescence and mesenchymal stromal cells. *Hum. Physiol.*, 2020, vol. 46, no. 1, pp. 85–93. doi: 10.1134/S0362119720010132.
13. Ratushnyy A., Ezdakova M., Buravkova L. Secretome of senescent adipose-derived mesenchymal stem cells negatively regulates angiogenesis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, vol. 21, no. 5, art. 1802. doi: 10.3390/ijms21051802.
14. Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J.W., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz H.P., Hedrick M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.*, 2001, vol. 7, no. 2, pp. 211–228. doi: 10.1089/107632701300062859.
15. Ratushnyy A., Lobanova M., Buravkova L. Expansion of adipose tissue-derived stromal cells at “physiologic” hypoxia attenuates replicative senescence. *Cell Biochem. Funct.*, 2017, vol. 35, no. 4, pp. 232–243. doi: 10.1002/cbf.3267.
16. Ratushnyy A.Yu., Rudimova Y.V., Buravkova L.B. Replicative senescence and expression of autophagy genes in mesenchymal stromal cells. *Biochemistry (Moscow)*, 2020, vol. 85, no. 10, pp. 1169–1177. doi: 10.1134/S0006297920100053.
17. Chen J.-Y., Mou X.-Z., Du X.-C., Xiang C. Comparative analysis of biological characteristics of adult mesenchymal stem cells with different tissue origins. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, 2015, vol. 8, no. 9, pp. 739–746. doi: 10.1016/j.apjtm.2015.07.022.

18. Campisi J., d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: When bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2007, vol. 8, no. 9, pp. 729–740. doi: 10.1038/nrm2233.
19. Wagner W., Horn P., Castoldi M., Diehlmann A., Bork S., Saffrich R., Benes V., Blake J., Pfister S., Eckstein V., Ho A.D. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: A continuous and organized process. *PLoS ONE*, 2008, vol. 3, no. 5, art. e2213. doi: 10.1371/journal.pone.0002213.
20. Safwani W.K.Z.W., Makpol S., Sathapan S., Chua K.H. The impact of long-term in vitro expansion on the senescence-associated markers of human adipose-derived stem cells. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2012, vol. 166, no. 8, pp. 2101–2113. doi: 10.1007/s12010-012-9637-4.
21. Liu J., Ding Y., Liu Z., Liang X. Senescence in mesenchymal stem cells: Functional alterations, molecular mechanisms, and rejuvenation strategies. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2020, vol. 8, art. 258. doi: 10.3389/fcell.2020.00258.
22. Savickienė J., Baronaitė S., Zentelytė A., Treigyte G., Navakauskienė R. Senescence-associated molecular and epigenetic alterations in mesenchymal stem cell cultures from amniotic fluid of normal and fetus-affected pregnancy. *Stem Cells Int.*, 2016, vol. 2016, art. 2019498. doi: 10.1155/2016/2019498.
23. Jung E.M., Kwon O., Kwon K.S., Cho Y.S., Rhee S.K., Min J.K., Oh D.B. Evidences for correlation between the reduced VCAM-1 expression and hyaluronan synthesis during cellular senescence of human mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2011, vol. 404, no. 1, pp. 463–469. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.12.003.
24. Gnani D., Crippa S., della Volpe L., Rossella V., Conti A., Lettera E., Rivis S., Ometti M., Fraschini G., Bernardo M.E., Di Micco R. An early-senescence state in aged mesenchymal stromal cells contributes to hematopoietic stem and progenitor cell clonogenic impairment through the activation of a pro-inflammatory program. *Aging Cell*, 2019, vol. 18, no. 3, art. e12933. doi: 10.1111/acel.12933.
25. Mun G.I., Boo Y.C. Identification of CD44 as a senescence-induced cell adhesion gene responsible for the enhanced monocyte recruitment to senescent endothelial cells. *Am. J. Physiol.: Heart Circ. Physiol.*, 2010, vol. 298, no. 6, pp. H2102–2111. doi: 10.1152/ajpheart.00835.2009.
26. Ke C., Chen J., Guo Y., Chen Z.W., Cai J. Migration mechanism of mesenchymal stem cells studied by QD/NSOM. *BBA, Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 2015, vol. 1848, no. 3, pp. 859–868. doi: 10.1016/j.bbamem.2014.12.013.
27. de Leve S., Wirsdörfer F., Jendrossek V. Targeting the immunomodulatory CD73/adenosine system to improve the therapeutic gain of radiotherapy. *Front. Immunol.*, 2019, vol. 10, art. 698. doi: 10.3389/fimmu.2019.00698.
28. Sauzay C., Voutetakis K., Chatziioannou A., Chevet E., Avril T. CD90/Thy-1, a cancer-associated cell surface signaling molecule. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2019, vol. 7, art. 66. doi: 10.3389/fcell.2019.00066.

⟨ **Для цитирования:** Ратушный Ю.А. Иммунофенотип мезенхимальных стромальных клеток при репликативном старении // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2023. Т. 165, кн. 2. С. 216–230. doi: 10.26907/2542-064X.2023.2.216-230. ⟩

⟨ **For citation:** Ratushnyy A.Yu. Immunophenotype of replicative senescent mesenchymal stromal cells. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2023, vol. 165, no. 2, pp. 216–230. doi: 10.26907/2542-064X.2023.2.216-230. (In Russian) ⟩