

## ХАРАКТЕРИСТИКА КУЛЬТУРЫ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ GFP

© Т. М. Гринчук,<sup>1</sup> К. М. Иванцов,<sup>1</sup> Л. Л. Алексеенко,<sup>1</sup> И. В. Кожухарова,<sup>1</sup> А. М. Зайчик,<sup>2</sup>  
Н. С. Петров,<sup>1</sup> В. М. Михайлов,<sup>1</sup> Б. В. Попов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии РАН и <sup>2</sup> Государственная медицинская академия  
последипломного образования, Санкт-Петербург;  
<sup>1</sup> электронный адрес: gmdmk@mail.cytspb.rssi.ru

Представлена характеристика культуры мезенхимных стволовых клеток (МСК) мышцы из костного мозга трансгенных мышей линии C57BL с убиквитарной экспрессией зеленого флуоресцирующего белка (GFP). Цитохимические характеристики проанализированных клеток соответствовали типичным характеристикам МСК. Данные клетки экспрессировали маркеры фибробластных клеток — гладкомышечный актин, формирующий стресс-фибриллы, и виментин — белок промежуточных филаментов, специфичный для соединительнотканых клеток. МСК были индуцибельны к дифференцировке в костные и жировые клетки. Карิโอтип МСК оказался крайне нестабилен. Уже на 6-м пассаже он был анеуполиплоидным и характеризовался существенной генетической гетерогенностью. Число хромосом варьировало от околодиплоидного до околооктаплоидного; 80 % популяции составляли клетки с числом хромосом от 50 до 85. Модальный класс не был выражен. Дифференциальная окраска метафазных хромосом на G-диски выявила генетическое разнообразие МСК по набору числа хромосомных копий и по набору атипичных, случайным образом перестроенных хромосом, образованных в результате разнотипных эктопических ассоциаций между негомологичными хромосомами. Одна из дицентрических хромосом, найденная во всех прокариотипированных клетках, была отнесена к разряду маркерных. В некоторых метафазных пластинках были выявлены сверхмелкие мини-хромосомы, рассматриваемые как одно из морфологических проявлений амплификаций генов. Кариотипическая нестабильность клеток МСК, маркированных GFP, трактуется как индуцированная внесением в геном мышцы чужеродного трансгена GFP. МСК, трансгенные по GFP, могут быть использованы в качестве модельной системы при изучении характера и направленности изменений в структуре генома в связи с его злокачественной трансформацией.

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки, хромосомы, дестабилизация карิโอ типа, клеточная дифференцировка, зеленый флуоресцирующий белок, трансгенная мышшь.

Принятые сокращения: ДМ — двойные мини-хромосомы, МСК — мезенхимные стволовые клетки, МЭФ — мышечные эмбриональные фибробласты, РТ — Робертсоновская транслокация, GFP — зеленый флуоресцирующий белок.

В области биологии стволовых клеток в последние годы большое внимание привлекают стромальные или, как их называют в настоящее время, мезенхимные стволовые клетки (МСК) костного мозга. Родоначальниками углубленного их изучения были русские исследователи А. Я. Фриденштейн и И. Л. Чертков, которые в своих работах показали существование в костном мозге небольшого пула клеточных элементов — стромальных стволовых клеток (Фриденштейн, Чертков, 1969). Существует мнение о том, что эти клетки способны в пределах организма к разнонаправленной трансдифференцировке, необходимой для восстановления поврежденных участков органов и тканей (Фриденштейн, Лалыкина 1973). Новая волна активных исследований МСК, проводимых в настоящее время, позволила говорить о том, что умение управлять дифференцировкой данных клеток в нужном направлении создает предпосылки для широкого их использования в медицинских целях. В настоящее время известно, что МСК могут дифференцироваться в клетки мезодер-

мального ряда (костные, хрящевые, мышечные, клетки сухожилий и связок), энтодермального ряда (печеночные, кишечные, панкреатические, легочные) и эктодермального ряда (нервные клетки) (Prockop, 1997; Kopen et al., 1999; Pittenger et al., 1999; Lagasse et al., 2000; Jiang et al., 2002; Ortiz et al., 2003; Shu et al., 2004; Popov et al., 2007; Serikov et al., 2007). В медицинской практике есть случаи использования МСК в восстановительном лечении дегенеративных и злокачественных заболеваний, инфаркта миокарда, диабета, неврологических и легочных заболеваний, болезней крови, печени, а также травм, при которых возникает невосполнимый со стороны внутренних источников дефицит функциональных клеток различной тканевой специфичности, включая дефекты костной ткани (Horwitz et al., 2002; Le Blanc et al., 2004; Pittenger, Martin, 2004; Phinney, Isakova, 2005; Rojaset et al., 2005; Lee et al., 2006). Текущие публикации указывают на то, что продолжительное культивирование МСК может приводить к дестабилизации их клеточного генома, причинно

связанное с превращением клеток из нормальных в злокачественные (Rubio et al., 2005; Miura et al., 2006). Эти данные не отменяют возможность терапевтического использования МСК, но предполагают необходимость всестороннего изучения их свойств в опытах *in vivo* и *in vitro*.

Целью настоящей работы было оценить степень стабильности кариотипа клеток МСК, выделенных из костного мозга трансгенных мышей с убиквитарной экспрессией зеленого флуоресцирующего белка (GFP), на начальном этапе их культивирования вне организма. Клетки МСК, маркированные GFP, представляют собой удобную модель для изучения широкого спектра биологических процессов, в частности процессов, связанных с дифференцировкой и заместительной терапией.

### Материалы и методика

Объектом исследования служили МСК из костного мозга мышей C57BL/6-Tg(ACt<sup>1</sup>EGF)10sb/J, экспрессирующие GFP. Трансгенные по GFP мыши были приобретены в коммерческой лаборатории Jackson Labs (Bar Harbor, США).

Получение и культивирование мезенхимных клеток. Для приготовления первичной культуры МСК мышцей забивали путем дислокации шейных позвонков и костный мозг вымывали шприцем из большеберцовых и бедренных костей ростовой средой (DMEM/F12), содержащей 10 % фетальной бычьей сыворотки. Клетки костного мозга отмывали дважды в 10 мл фосфатного буфера, не содержащего  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  (PBS), центрифугировали при 1000 об/мин 5 мин, ресуспендировали в 50 мл ростовой среды и в концентрации  $5 \cdot 10^6$ /мл помещали в 6-луночные культуральные пластины из расчета 4 мл на 1 лунку. Конфлюентные первичные культуры дважды отмывали PBS. Клетки отделяли от пластика смесью растворов трипсина (0.25 %) и ЭДТА (1 мМ) в соотношении 1 : 1, ресуспендировали в ростовой среде и культивировали в 100-миллиметровых культуральных чашках. На 2 первых пассажах при достижении насыщающей плотности около 90 % клетки пересевали в соотношении 1 : 1. В ходе последующих 4 пассажей культуру пересевали в соотношении 1 : 3, на 7—9-м пассажах — в соотношении 1 : 4 (Роров et al., 2007). Для индукции дифференцировки клетки высевали в концентрации  $2 \cdot 10^5$  мл в 5 мл ростовой среды в 60-миллиметровые культуральные чашки, содержащие покровные стекла, для последующей микроскопии.

Жировую дифференцировку вызывали культивированием МСК в течение 3 нед в ростовой среде, содержащей 1 мМ дексаметазона и 5 мкг/мл инсулина. Клетки, содержащие капли жира, выявляли после их фиксации в 4%-ном параформальдегиде в PBS в течение 1 ч при комнатной температуре и последующей окраски 3.75%-ным масляным красным в изопропанол, разведенном дистиллированной водой в соотношении 1 : 3 (Meirelles, Nardi, 2003).

Костную дифференцировку вызывали при культивировании МСК в течение 3 нед в ростовой среде, содержащей 10 мМ  $\beta$ -глицерофосфата, 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты и 0.1 мМ дексаметазона. Клетки, содержащие кальциевые преципитаты, визуализировали после 2-кратной отмывки PBS с последующей окраской в течение 5 мин раствором 2%-ного ализарина красного, pH которого доводили до 4.2 с помощью гидроксида аммония (Phinney et al., 1999).

Для иммунофлуоресцентного окрашивания клетки высевали в концентрации  $2 \cdot 10^5$  мл в 5 мл ростовой среды в 60-миллиметровые культуральные чашки, содержащие покровные стекла, и культивировали в течение ночи. На следующий день покровные стекла с распластанными клетками помещали в 35-миллиметровые культуральные чашки, отмывали 1 раз PBS, фиксировали в 4%-ном параформальдегиде на PBS (pH 7.4) в течение 15 мин и в 70%-ном дистиллированном этаноле в течение ночи при 4 °С, отмывали 1 раз PBS, обрабатывали 0.2%-ным Тритоном X-100 в течение 10 мин, затем «блокирующим» раствором, содержащим 3 % бычьего сывороточного альбумина и 0.1 % Tween 20 в PBS, для предотвращения неспецифического связывания. Первичные антитела (против гладкомышечного актина, виментина и GFP) в блокирующем растворе наносили на 1 ч при комнатной температуре, затем препараты дважды отмывали PBS, обрабатывали раствором красителя DAPI в концентрации 0.1 мкг/мл 10 мин, отмывали его дважды PBS и переносили для микроскопии на предметные стекла, содержащие реактив Anti-Fade. Иммунофлуоресцентные изображения получали на электронном сканирующем микроскопе Pascal с использованием лазеров с длинами волн 488 и 543 нм и объектива 100 $\times$ . Изображения клеток, индуцированных к дифференцировке, получены на микроскопе Zeiss Axiovert 40.

Для иммунофлуоресцентного окрашивания были использованы мышинные моноклональные антитела против гладкомышечного актина, мышинные моноклональные антитела против виментина, кроличьи поликлональные антитела против GFP NeoMarkers, Sigma, США; видоспецифичные антитела, меченные Alexa Fluor®568, Fab-фрагмент кроличьих антител к IgG мыши и фрагмент козлиных антител против легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов кролика, меченный Alexa Fluor® 633 Fab (Invitrogen, США).

Препараты метафазных хромосом готовили по общепринятой схеме. Для накопления митотирующих клеток в активно пролиферирующую клеточную культуру добавляли 0.04%-ный колхицин в конечной концентрации 2.8 мкг/мл на 1.0—1.5 ч. Гипотоническую обработку проводили 0.56%-ным KCl, время подбирали экспериментально. Фиксировали клетки смесью этанола и ледяной уксусной кислоты (3 : 1). Клеточную суспензию раскапывали на мокрые охлажденные предметные стекла. Высушивали препараты при комнатной температуре.

Для окрашивания хромосом на G-диски использовали 2%-ный раствор красителя Гимза в фосфатном буфере, pH 6.4, окрашивали в течение 5—7 мин после предварительной обработки 0.25%-ным раствором трипсина. Метафазные пластинки с хорошим разбросом хромосом фотографировали с использованием иммерсионного объектива 100 $\times$  (Carl Zeiss, Германия), анализировали хромосомы по микрофотографиям. Идентифицировали их в соответствии со стандартной номенклатурой (Committee on Standardized..., 1972; Cowell, 1984).

В работе использовали следующие реактивы и материалы: среду для культуры клеток DMEM/F12, содержащую 25 мМ HEPES, фетальную бычью сыворотку и трипсин с 1 мМ ЭДТА (Invitrogen, США); краситель DAPI, инсулин, параформальдегид, Тритон X-100, краситель масляный красный, изопропанол,  $\beta$ -глицерофосфат, аскорбиновую кислоту, ализарин красный, гидроксид аммония и колхицин (Sigma, США); дексаметазон (KRKA, Словения); бычий сывороточный альбумин (Fluka,

США); Twin 20 (Bio Chemica, Германия); Anti-Fade (Bio-Rad, США); культуральные пластиковые чашки (Sarstedt, Германия); краситель Гимза и таблетки для приготовления фосфатного буфера, рН 6.4 (BDH, Англия); иммерсионное масло нефлуоресцирующее (Carl Zeiss, Германия); KCl, метиловый спирт и ледяную уксусную кислоту (Реахим, Россия).

## Результаты и обсуждение

МСК первых 9 пассажей представляли собой большие, распластанные, медленно делящиеся клетки с низкой плотностью насыщения. После 3-го пассажа наблюдали активацию клеточного деления. Большинство клеток экспрессировало GFP, что определяли по флуоресценции и с помощью специфических антител (рис. 1, а). Подобно фибробластам, МСК продуцировали гладкомышечный актин, формирующий стресс-фибриллы, и виментин — белок промежуточных филаментов, специфичный для соединительнотканых клеток (рис. 1, а). МСК, культивируемые в адипогенной или остеогенной ростовой среде, аккумулировали жир или кальциевые преципитаты (рис. 1, б). Цитохимические характеристики полученной нами культуры МСК-GFP соответствовали типичным характеристикам МСК (Friedenstein, 1976).

Кариотип культуры МСК-GFP оказался крайне нестабилен. Уже на 6-м пассаже число хромосом в метафазных пластинках варьировало в широких пределах — от околодиплоидного до околооктаплоидного, модальный класс не был выражен. Популяция была представлена клетками 4 типов. Около 15 % популяции составляли околодиплоидные клетки с числом хромосом от 39 до 45. Около 80 % клеток имели околотри- и околотетраплоидное числа хромосом в интервале от 50 до 85. Околотри- и околотетраплоидные клетки были представлены приблизительно в равном соотношении. Около 5 % клеток характеризовали как суперполиплоиды. Максимальное число хромосом в

них достигало 160. Детальный анализ кариотипа с привлечением метода дифференциальной окраски хромосом на G-диски показал, что каждая клетка по своему хромосомному набору уникальна (рис. 2). Число копий каждой негомологичной хромосомы варьировало как в пределах клетки, так и от клетки к клетке (от 0 до 5 копий). Наряду с нормальными хромосомами в кариотипическом наборе выявлялись различные по происхождению атипичные хромосомы, возникшими в результате так называемых Робертсоновских транслокаций (РТ) — эктопических ассоциаций между негомологичными хромосомами в области центромер, ди- и трицентрическими хромосомами, образованными путем последовательного транслоцирования (эктопического связывания) разнотипных хромосом, перестроенными телоцентрическими хромосомами. Одна из дицентрических хромосом (превосходящая в 2 раза длину хромосомы 1) была обнаружена во всех метафазных пластинках, в результате чего она была отнесена к разряду маркерных. В некоторых клетках наблюдали наличие дополнительного генетического материала в виде сверхмелких мини-хромосом (рис. 3).

В природе кариотип мыши настолько стабилен, что может быть использован в целях таксономической диагностики. Он представлен 19 парами аутосом и 1 парой половых хромосом. Все хромосомы акроцентрические, каждая пара имеет специфическое дифференциальное окрашивание (Committee on Standardized..., 1972; Cowell, 1984). Известно, что при переводе мышечных клеток в условиях *in vitro* их кариотипическая стабильность относительно быстро нарушается (Cowell, 1981; Ginis et al., 2004).

Так, при анализе нормальных эмбриональных фибробластов мыши (МЭФ) было установлено, что после введения в условия *in vitro* клетки очень быстро становились генетически гетерогенными, что на уровне кариотипа проявлялось в появлении случайным образом перестроенных хромосом и в нарушении копияности гомологов.

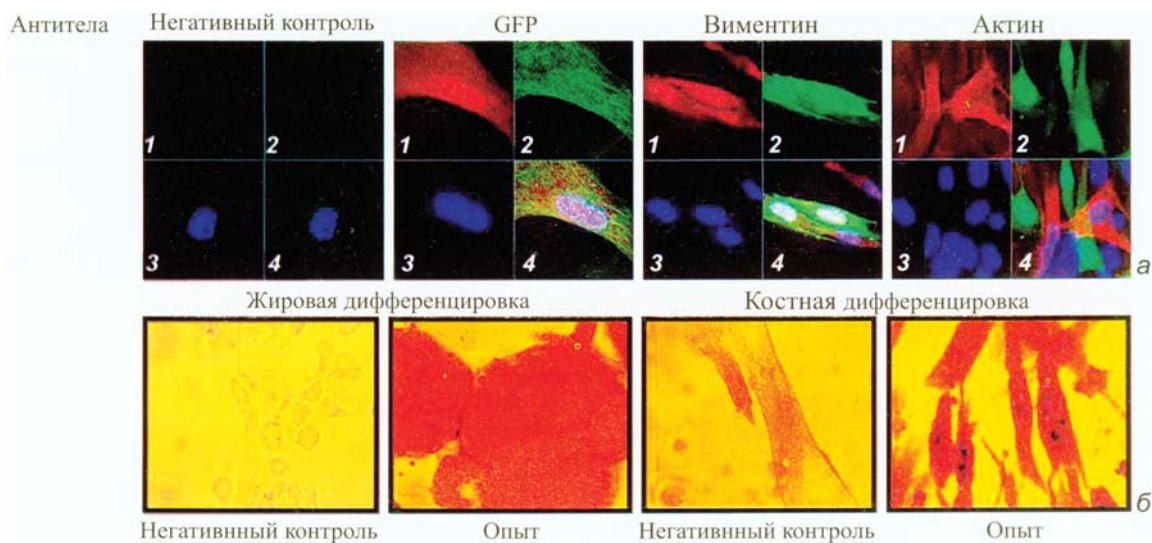


Рис. 1. Цитохимические характеристики мезенхимных стволовых клеток мыши, экспрессирующих зеленый флуоресцирующий белок (МСК-GFP) *in vitro*.

а — иммунофлуоресцентная характеристика экспрессии виментина, гладкомышечного актина и зеленого флуоресцирующего белка (GFP). В качестве негативного контроля использовали мезенхимные стволовые клетки, не экспрессирующие GFP. 1 — специфические антитела, 2 — естественная флуоресценция, 3 — окраска на ДНК DAPI, 4 — совмещение всех изображений; увеличение 100×. б — индуцированная дифференцировка МСК в клетки жировой (окраска масляным красным) и костной (окраска ализариновым красным) тканей. Об. 10×.



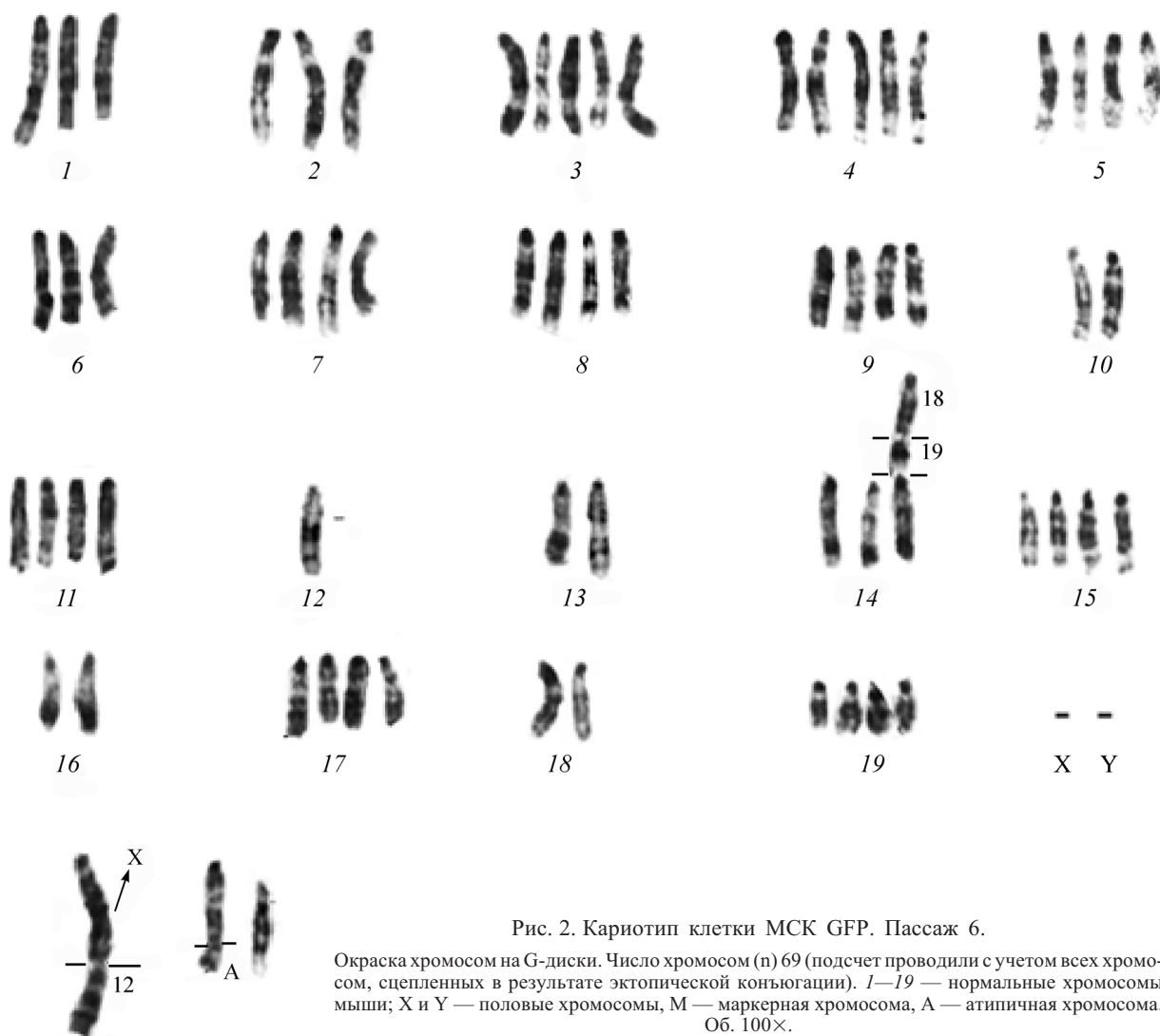


Рис. 2. Кариотип клетки МСК GFP. Пассаж 6.

Окраска хромосом на G-диски. Число хромосом (n) 69 (подсчет проводили с учетом всех хромосом, сцепленных в результате эктопической конъюгации). 1–19 — нормальные хромосомы мышцы; X и Y — половые хромосомы, M — маркерная хромосома, A — атипичная хромосома. Об. 100×.

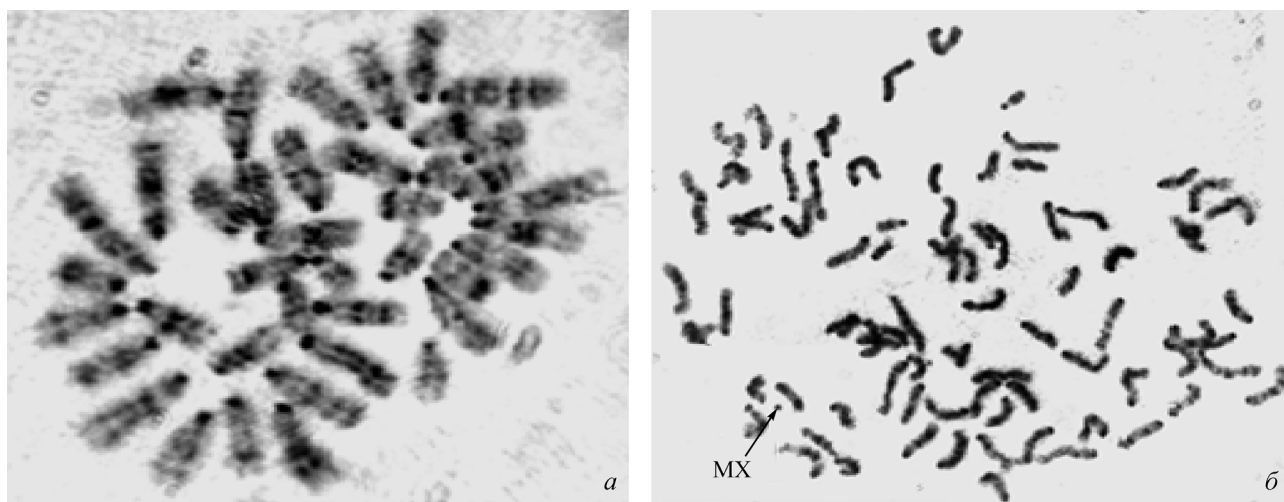


Рис. 3. Два варианта мышечных эмбриональных фибробластов, экспрессирующих зеленый флуоресцирующий белок. Пассаж 2. а — клетка с околодиплоидным набором хромосом (n = 41); б — клетка с околотетраплоидным набором хромосом (n = 82); MX — мини-хромосома.

Анализ клеток на 2-м пассаже показал, что подавляющая часть изученной популяции была представлена псевдодиплоидными и околдиплоидными вариантами, клетки с перестроенным кариотипом были единичными (Гринчук и др., 2006).

При анализе хромосомной нестабильности МСК из костного мозга мышей C57BL/6 было показано, что к 15-му пассажу клетки становились иммортализованными. К 27-му пассажу они характеризовались как анеуплоидные и имели, судя по наличию в некоторых клетках ДМ, некоторые признаки опухолевой трансформации. На 55-м пассаже помимо существенной анеуплоидизации и хромосомных перестроек в проанализированных МСК наблюдали аккумуляцию ДМ, которые представляют собой морфологические проявления амплификации онкогена *c-myc*. При этом клетки проявляли признаки малигнизированного генотипа, образуя *in vivo* фибросаркомы (Miura et al., 2006). Данные о дестабилизации кариотипа МСК-GFP, полученные в настоящей работе, не противоречат, но и не со всем совпадают с этими данными. В нашем случае отсутствует первый этап кариотипических изменений МСК — переход клеток из нормального состояния в иммортализованное, сопряженный с незначительными спонтанными кариотипическими изменениями (Miura et al., 2006). Все изменения, зафиксированные нами при культивировании МСК-GFP уже на 6-м пассаже (большой разброс числа хромосом в клетках в связи с их существенной анеуплоидизацией, наличие маркерной хромосомы, супермелких мини-хромосом, наличие которых мы рассматриваем как одно из морфологических проявлений амплификации генов), позволяют охарактеризовать исследованную нами культуру как трансформированную. Ранее при изучении трансфицированных клеток и клеток трансгенного происхождения нами было показано, что введение в клеточный геном чужеродного гена приводит при культивировании клеток *in vitro* к их генетической гетерогенности, связанной с количественными и качественными изменениями в хромосомном наборе (Гринчук и др., 2000, 2004). Кариотипирование МЭФ, трансгенных по GFP, выявило также их геномную неоднородность: уже на 2-м пассаже в исследованной популяции наряду с околдиплоидными клетками (рис. 3, а), которые составляли более 90 % популяции, были обнаружены гетерогенные по набору хромосом анеуплоидные клетки (рис. 3, б), число хромосом в которых варьировало в интервале от околотриплоидного до околотетраплоидного (50—75 хромосом). Каждая прокариотипированная клетка имела уникальный набор, представленный нормальными хромосомами в разном числе копий и разнообразными по происхождению атипичными хромосомами.

Известно, что любые клетки млекопитающих при переводе в условия *in vitro*, претерпевая адаптационные изменения на уровне генетического аппарата, на популяционном уровне становятся гетерогенными, что влечет за собой отбор селективно выгодных вариантов. Характер этих изменений может быть разным, но скорость изменений на первых этапах культивирования невелика. Данные о повышенной кариотипической гетерогенности МЭФ-GFP (по сравнению с аналогичными данными для обычных МЭФ) позволили нам предположить, что в клетках трансгенного происхождения она исходно индуцирована внесением чужеродного гена *gfp* в клеточный геном мыши, из потомства которой данные клетки были получены (Гринчук и др., 2006). Если это так, можно предполо-

жить, что геном МСК-GFP *in vivo* в силу своего трансгенного происхождения оказался генетически запрограммирован на дестабилизацию. Клетки с «расшатым» геномом при переводе в условия *in vitro* получили селективное преимущество, вследствие чего клеточная культура МСК-GFP уже на 1-х пассажах оказалась настолько генетически гетерогенной, что была охарактеризована нами как трансформированная.

Из литературы известно, что степень прогрессии кариотипической нестабильности является тестом на опухоленность (Вахтин и др., 1980; Levan, Mitelman, 1980; Швембергер, 1987). В связи с тем что проанализированный нами материал оказался генетически нестабильным и существенно перестроенным, мы предполагаем, что, во-первых, процесс злокачественной трансформации МСК-GFP по сравнению со спонтанной трансформацией МСК нормальной мыши *in vitro* (Miura et al., 2006) должен протекать быстрее и выявляться на более ранних пассажах. Во-вторых, дифференцировка МСК-GFP, вступивших на путь трансформации, может быть разнонаправленной и приводить в конечном счете к возникновению у мышей опухолей разного фенотипа. Таким образом, культура МСК, маркированных геном *gfp*, может рассматриваться как лабораторная модель, удобная для изучения характера и направленности изменений в структуре клеточного генома в связи с его злокачественной трансформацией.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-48439) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

#### Список литературы

- Вахтин Ю. Б., Пинчук В. Г., Швембергер И. Н., Бутенко З. А. 1987. Клонально-селекционная концепция опухолевого роста. Киев: Наукова думка. 216 с.
- Гринчук Т. М., Иванцов К. М., Кожухарова И. В., Михайлов В. М., Алексеенко Л. Л., Зенин В. В. 2006. Кариотипическая характеристика первичной культуры фибробластов из эмбрионов мыши, прародители которой были трансгенными по *gfp*. Цитология. 48 (9) : 759.
- Гринчук Т. М., Павленко М. А., Пуговкина Н. А., Алексеенко Л. Л., Ковалева З. В., Меликсетян М. Б. 2000. Влияние эктопической сверхэкспрессии антиапоптотического гена *bcl-2* на уровень и характер кариотипической нестабильности в клетках китайского хомячка линии CHL V-79. Цитология. 42 (10) : 1004—1014.
- Гринчук Т. М., Пуговкина Н. А., Тарунина М. В., Сорокина Е. А., Игнатова Т. Н. 2004. Имортализованные линии клеток, полученные из трансгенных эмбрионов мышей, характеризующихся прогрессирующей дестабилизацией структуры кариотипа. Цитология. 46 (1) : 62—68.
- Фриденштейн А. Я., Лалыкина К. С. 1973. Индукция костной ткани и остеогенные клетки-предшественники. М.: Медицина. 222 с.
- Фриденштейн А. Я., Чертков И. Л. 1969. Клеточные основы иммунитета. М. 256 с.
- Швембергер И. Н. 1987. Нормализация опухолевых клеток. Л.: Наука. 142 с.
- Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice. 1972. Standard karyotype of the mouse, *Mus musculus*. Heredity. 63 : 69—72.
- Cowell J. K. A. 1984. A photographic representation of the G-banded structure of the chromosomes in the mouse karyotype. Chromosoma (Berlin). 89 : 298—320.

- Friedenstein A. J. 1976. Precursor cells of mechanocytes. *Int. Rev. Cytol.* 47 : 327—359.
- Ginis I., Luo Y., Takumi M., Thies S., Brandenberger R., Ge-recht-Nir S., Amit M., Hekt A., Carpenter M. K., Itskovitz-Eldor J., Rao M. S. 2004. Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Develop. Biol.* 269 : 360—380.
- Horwitz E. M., Gordon P. L., Koo W. K., Marx J. C., Neel M. D., McNall R. Y., Muul L., Hofmann T. 2002. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 99 : 8932—8937.
- Jiang Y., Jahagirdar B. N., Reinhardt R. L., Schwartz R. E., Keene C. D., Ortiz-Gonzalez X. R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low W. C., Largaespa-da D. A., Verfaillie C. M. 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* 418 : 41—49.
- Kopen G. C., Prockop D. J., Phinney D. G. 1999. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 96 : 10 711—10 716.
- Lagasse E., Connors H., Al-Dhalimy M., Reitsma M., Doh-se M., Osborne L., Wang X., Finegold M., Weissman I. L., Grom-pe M. 2000. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat. Med.* 6 : 1229—1234.
- Le Blanc K., Rasmusson I., Sundberg B., Götherström C., Has-san M., Uzunel M., Ringdén O. 2004. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchy-mal stem cells. *Lancet.* 363 : 1439—1441.
- Lee R. H., Seo M. J., Reger R. L., Spees J. L., Pulin A. A., Ol-son S. D., Prockop D. J. 2006. Multipotent stromal cells from hu-man marrow home to and promote repair of pancreatic islets and re-nal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 103 : 17 438—17 443.
- Levan G., Mitelman F. 1980. Specific routes of chromosoma evolution in chronic myeloid leukemia and other human neoplastic disorders. *Hereditas.* 84 : 224—245.
- Miura M., Miura Y., Padilla-Nash H. M., Molinolo A. A., Fu B., Patel V., Seo B. M., Sonoyama W., Zheng J. J., Baker C. C., Chen W., Ried T., Shi S. 2006. Accumulated chromosomal instabili-ty in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malig-nant transformation. *Stem Cells.* 24 : 1095—1103.
- Ortiz L. A., Gambelli F., McBride C., Gaupp D., Baddoo M., Kaminski N., Phinney D. G. 2003. Mesenchymal stem cell engraft-ment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 100 : 8407—8411.
- Phinney D. G., Isakova I. 2005. Plasticity and therapeutic po-tential of mesenchymal stem cells in the nervous system. *Curr. Pharm. Des.* 11 : 1255—1265.
- Phinney D. G., Kopen G., Isaacson R. L., Prockop D. J. 1999. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and diffe-rentiation. *J. Cell. Biochem.* 72 : 570—585.
- Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C., Jaiswal R. K., Do-uglas R., Mosca J. D., Moorman M. A., Simonetti D. W., Craig S., Marshak D. R. 1999. Multilineage potential of adult human mesen-chymal stem cells. *Science.* 284 : 143—147.
- Pittenger M. F., Martin B. J. 2004. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ. Res.* 95 : 9—20.
- Popov B. V., Serikov V. B., Petrov N. S., Izusova T. V., Gup-ta N., Matthey A. 2007. Lung epithelial cells A549 induce epithelial differentiation in mouse mesenchymal BM stem cells by paracrine mechanism. *Tissue Engineering.* 13 : 2445—2450.
- Prockop D. J. 1997. Marrow stromal cells as stem for nonhe-matopoietic tissues. *Science.* 276 : 71—74.
- Rojaset M., Xu J., Woods C. R., Mora A. L., Spears W., Ro-man J., Brigham K. L. 2005. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Amer. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 33 : 145—152.
- Rubio D., Garcia-Castro J., Martin M. C., de la Fuente R., Ci-gudosa J. C., Lloyd A. C., Bernad A. 2005. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res.* 65 : 3035—3039.
- Serikov V. B., Popov B. V., Mikhaylov V. M., Gupta N., Mat-thay M. A. 2007. Evidence of temporary epithelial repopulation and rare clonal formation by BM-derived cells following naphthalene injury in mice. *Anat. Rec.* 290 : 1033—1046.
- Shu S. N., Wei L., Wang J. H., Zhan Y. T., Chen H. S., Wang Y. 2004. Hepatic differentiation capability of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells. *World J. Gastroenterol.* 10 : 2818—2822.

Поступила 20 VIII 2008

#### CHARACTERIZATION OF CULTURED MURINE MESENCHYMAL STEM CELL LINE EXPRESSING GFP

T. M. Grinchuk,<sup>1</sup> K. M. Ivantsov,<sup>1</sup> L. L. Alekseenko,<sup>1</sup> I. V. Kozhukharova,<sup>1</sup> A. M. Zaichik,<sup>2</sup>  
N. S. Petrov,<sup>1</sup> V. M. Mikhailov,<sup>1</sup> B. V. Popov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, and <sup>2</sup> St. Petersburg State Medical Academy of Postgraduate Education;  
<sup>1</sup> e-mail: gmdmk@mail.cytspb.rssi.ru

We have developed and characterized a murine mesenchymal stem cell line from the bone marrow of trans-genic mouse C57BL ubiquitously expressing GFP. Immunostaining analysis revealed the presence of several markers typically found in fibroblasts such as smooth muscle cells actin in the form of stress fibrils and vimen-tin — the protein of intermediate filaments. These cells maintained capability to differentiate into adipocytes or osteoblasts under appropriate conditions. Karyotypic features include changes in the ploidy level between 2n and 8n and multiple chromosomal aberrations. After six passages 80 % of the cell population was aneuploid with chromosomal numbers between 50 and 85 without well defined modal class. Differential G-staining of me-taphase spreads showed variability in copy numbers of individual chromosomes and the presence of aberrations such as ectopic associations of non-homologous chromosomes. All analyzed cells contained unique dicentric marker chromosome and some of them also had numerous microchromosomes which might indicate gene amp-lification. These cells could be useful in the future work directed at the investigation of stem cells spontaneous oncogenic transformation *in vivo* and *in vitro*.

Key words: mesenchymal stem cells, chromosomes, karyotypic destabilization, cell differentiation, green fluorescence protein, transgene mouse.