

А.П. ЯЦИШИНА, О.В. ПІДПАЛА,
Т.П. РУБАН, О.В. ТІМОЩУК, Л.Л. ЛУКАШ

Інститут молекулярної біології та генетики НАНУ,
вул. Заболотного, 150, Київ-143, 03143, Україна

ЦИТОМОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОЇ КЛІТИННОЇ ЛІНІЇ МИШІ G1



Проаналізовано ростові та морфологічні властивості нової клітинної лінії G1 миші. Виявлено ознаки спонтанної трансформації клітин in vitro, а саме клітини лінії G1 мають необмежену тривалість життя у культурі, ростуть в умовах значного дефіциту ростових факторів сироватки, формують багатошарові колонії на моношарі клітин та колонії в напіврідкому агарі. За допомогою мікроядерного тесту в клітинах досліджуваної лінії виявлено різноманітні форми патології мітозу. Результати проведених досліджень вказують на їхню неопластичну трансформацію із порушенням нормального перебігу мітозу.

© А.П. ЯЦИШИНА, О.В. ПІДПАЛА, Т.П. РУБАН,
О.В. ТІМОЩУК, Л.Л. ЛУКАШ, 2006

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика. 2006. № 3

Вступ. Відкриття ембріональних стовбурових клітин — одна із найважливіших подій біології минулого століття. Різноманітні біотехнології із застосуванням стовбурових клітин здійснили переворот в медицині, надаючи нові перспективи лікування різноманітних невиліковних раніше захворювань людини, серед яких інфаркт міокарда, інсульт, хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона, цукровий діабет, дистрофія Дюшена та багато інших.

У XXI столітті істотний вклад у розвиток мікрохірургії належить трансплантації клітин. Найперспективнішим напрямком клітинної терапії є використання різних типів стовбурових клітин у заміній терапії завдяки їхній здатності до необмеженого поділу та диференціювання в потрібному напрямку.

На окремий інтерес заслуговує проблема стабільності клітинних ліній стовбурових клітин in vitro. Недостатньо досліджено, що відбувається із генетичним апаратом цих клітин при тривалому культивуванні та чи можна використовувати їх у практичній медицині. Так, у процесі культивування клітини зазнають впливу різноманітних стресових чинників, які можуть впливати на генетичну стабільність клітин [1]. До таких чинників належать біологічні (ростові фактори), фізичні (зміна температурних умов при культивуванні та зберіганні) та хімічні (компоненти середовищ). При культивуванні ембріональні стовбурові клітини поступово накопичують генетичні зміни, адаптуючись до нових умов in vitro. Серед них і мутації, які можуть сприяти трансформації [2]. Постає питання про розробку критеріїв генетичної стабільності стовбурових клітин та вивчення можливостей керування мутаційним процесом.

Метою даної роботи було дослідити цитоморфологічні зміни при становленні нової клітинної лінії G1 миші. Було досліджено ростові та морфологічні зміни клітин G1, які пов'язані з процесом їхньої спонтанної трансформації in vitro.

Матеріали та методи. Клітинну лінію G1 миші було одержано із ембріонального матеріалу лабораторної миші інбредної лінії BALB/c [3].

Для вирощування клітин лінії G1 використовували середовище DMEM («Sigma», США) із додаванням пеніциліну 100 ОД/мл, стрептоміцину 100 мкг/мл і 5% ембріональної сироватки теляти (ЕС) («Сангва», Львів). Клітини

культивували при 37 °С у скляних флаконах об'ємом 10 мл і матрацах об'ємом 50 мл, а також у чашках Петрі (Anumbra, d = 30 і 80 мм) при 5 % CO₂. Пересівали клітини 2–3 рази на тиждень при розсіві 1:3 — 1:10. Для тривалого зберігання клітини заморожували у ростовому середовищі DMEM із додаванням 10 % гліцерину, 20 % ЕС та зберігали у рідкому азоті. Після криоконсервації клітини зберігали життєздатність та свої морфогенетичні особливості.

За живими клітинами спостерігали під інвертованим мікроскопом. Для цитоморфологічного аналізу клітини вирощували на предметних скельцях (76 × 26 × 1 мм, «Marienfeld», Німеччина), фіксували в абсолютному метанолі протягом 7–10 хв, забарвлювали гематоксиліном Караччі (до 10 хв) [4] і 0,7%-ним водним розчином еозину (4 хв).

Для аналізу ростових характеристик клітини досліджуваної лінії розсівали на 10 флаконів (об'ємом 10 мл) по 100 тис. клітин на флакон і додавали по 2,5 мл ростового середовища. Для побудови кривої росту клітини знімали за допомогою суміші 0,25 % трипсин та 0,02 % ЕДТА (рН 7,5) (1:3) через кожні 24 год та підраховували їхню кількість у лічильній камері Горяєва [5]. Дослід повторювали 3–4 рази.

Для визначення ефективності клонування клітини розсівали у чашки Петрі (Anumbra, d = 80 мм) по 500, 1000 і 2000 клітин на чашку. Через два тижні колонії фіксували в абсолютному метанолі (7–10 хв) та забарвлювали 1%-вим водним розчином метиленової синьки протягом декількох хвилин. При аналізі враховували лише колонії правильної сферичної форми та з кількістю клітин у них, не меншою 50.

Для виявлення фокусів морфологічної трансформації клітин на моношарі клітини досліджуваної культури розсівали на шість чашок по 100 тис. Фіксацію та забарвлення клітин проводили через 14–17 діб [6].

Для перевірки здатності клітин лінії G1 рости в умовах дефіциту ростових факторів сироватки замінили вміст ЕС у ростовому середовищі з 5 на 1% [7]. Сублінію, одержану в умовах 1% сироватки, назвали G1-OA, а пасажи почали позначати через косу риску з моменту переведення їх у нові умови, тобто 35/1 пасаж.

Для вивчення здатності клітин рости без прикріплення до субстрату застосовували селективне середовище із напіврідким агаром [6, 7]. Нижній шар такого середовища, підкладка, містив DMEM із додаванням 5 % ЕС та 0,6 % агару. Концентрація агару у верхньому шарі, напіврідкому агарі, становила 0,3 %. Клітини висівали на чотири чашки в напіврідкий агар по 100 тис. (Anumbra, d = 80 мм). При необхідності клітини підживлювали ростовим середовищем із вмістом 0,3 % агару.

При проведенні мікроядерного тесту клітини висівали на предметні скельця по 150–200 тис. на скельце та інкубували в чашках Петрі із додаванням ростового середовища при 37 °С і 5 % CO₂. Фіксацію здійснювали через 24, 48 і 72 год протягом 10 хв у абсолютному метанолі. Фіксовані препарати забарвлювали протягом 20 хв у 5%-ному розчині барвника Гімза («Merck», Німеччина), приготовленому на фосфатному буфері (рН 6,8). Аналіз мікроядер та інших типів патологій мітозу проводили на мікроскопі Jenaval («Carl Zeiss», Jena) під об'єктивом 40× та 100×. На кожному препараті аналізували від 1000 до 2000 клітин.

Препарати хромосом готували за методикою [8], модифікованою в нашій лабораторії. Зокрема, для аналізу патологічних мітозів клітини попередньо не обробляли мітотичними отрутами. Фіксацію хромосом проводили через 48 та 72 год після пересіву клітин. Для стимулювання поділів клітин за 24 год до фіксації змінювали середовище. Гіпотонію клітин здійснювали протягом 30–40 хв при 37 °С у теплій деіонізованій воді з розрахунку: до 1 мл клітинної суспензії додавали 9 мл води. Фіксували хромосоми чотири рази по 10–20 хв у свіжеприготовленій охолодженій до –10 °С суміші льодяної оцтової кислоти та метанолу (1 : 3). Препарати метафазних хромосом одержували, розкапуючи суспензію фіксованого матеріалу на поверхню знежирених охолоджених вологих предметних скелець. Висушували на повітрі та з випалюванням фіксатора. Забарвлювали протягом 10–20 хв у 5%-ному розчині барвника Гімза, приготовленому на фосфатному буфері (рН 6,8).

Мікрооб'єкти фотографували за допомогою фотоапаратів «Київ» і «Зеніт» із використанням кольорових фотоплівки «Kodak-100» і «Kodak-

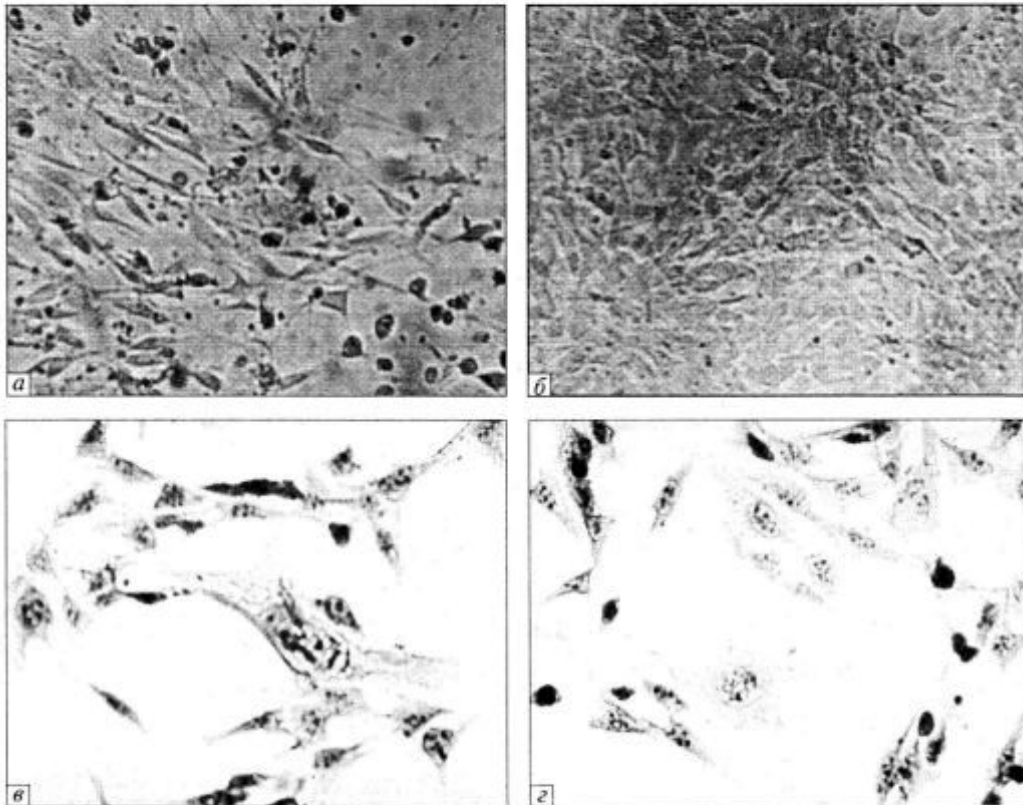


Рис. 1. Морфологія клітин лінії G1 миші: а — низька щільність; б — моношар живих незабарвлених клітин; в і з — морфологічна неоднорідність клітин у популяції (забарвлення гематоксилином і еозином). Об. 20× для а і б, 40× для в і з, ок. 10×

200» та чорно-білих — «Свема-64» і «Свема-100».

Результати опрацьовували статистично [9].

Результати досліджень та їх обговорення.

Морфологія. Під світловим мікроскопом клітини лінії G1 мають пластинчасту витягнену форму з відростками, крупне овальне ядро, за морфологією вони подібні до фібробластів (рис. 1).

При низькій щільності клітин у популяції переважають фібробластоподібні клітини, а також у незначній кількості трапляються видовжені веретеноподібні клітини та дрібні округлі клітини (рис. 1, в і з). Така морфологічна неоднорідність характерна для фібробластів у культурі, її пояснюють зміною морфології клітин протягом клітинного циклу. Також спостерігали клітини гігантських розмірів, які можуть бути поліплоїдними. Наявність округлих, гексагональних, трикутних клітин із зниженою адгезивністю та маловпорядкова-

ним ростом є характерною ознакою морфології іморталізованих клітин [10]. Одержані нами клітини культивуються *in vitro* вже понад 140 пасажів і здатні до субклонування, що дозволяє вважати їх іморталізованими. Іморталізація клітин, як правило, супроводжується появою у клітин ознак злоякісної трансформації. Ми дослідили прояв ознак трансформації росту в популяції клітин G1, зокрема зростання ефективності клонування, здатність рости в умовах значного дефіциту ростових факторів сироватки, втрату контактного гальмування та втрату залежності росту від адгезивного субстрату.

Для клітин лінії G1 миші характерний моношаровий тип росту. Однак, коли клітини даної лінії ще не утворили суцільного моношару, під мікроскопом спостерігали накладання псевдоподій клітин на тіло сусідніх клітин. Таке нашарування клітин може бути пов'язане із втратою клітинами контактного гальмування.

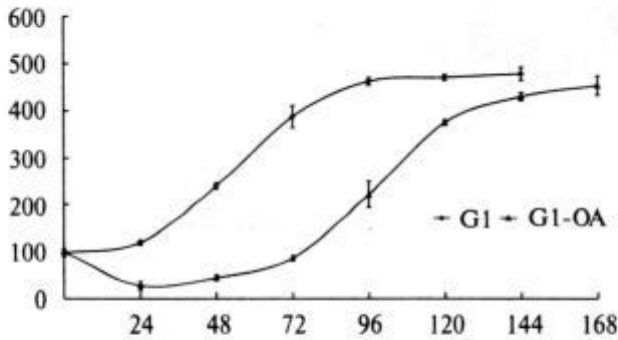


Рис. 2. Динаміка росту клітин лінії G1 та сублінії G1-OA: по вертикалі — кількість клітин, тис.; по горизонталі — тривалість культивування, год

Ростові властивості. Як видно на кривій росту клітин лінії G1 в середовищі DMEM із додаванням 5% ЕС, стаціонарна фаза тривала протягом перших 24 год після пересіву та час подвоєння кількості клітин у популяції припадає приблизно на 41 год після пересіву (рис. 2). Експоненційний ріст тривав протягом трьох діб, під час якого спостерігали другий пік подвоєння популяції — приблизно на 74 год після пересіву (рис. 2). Динаміка росту клітин сублінії G1-OA в умовах значного дефіциту сироватки відрізнялась від динаміки росту при звичайних умовах культивування клітин даної лінії (рис. 2). Їхній ріст був тривалішим у часі та залежав від щільності висіву клітин. На ранніх пасажах тривалість стаціонарної фази була понад 72 год, а час подвоєння популяції починався з 93 год після пересіву, другий пік подвоєння популяції спостерігався на 130 год (рис. 2). Протягом перших 20 пасажів після переведення клітин на сироваткове голодування клітини сублінії G1-OA росли лише при розсіві 1:2, тоді як на 5% сироватки клітини витримували розсів 1:10. Лише після 21-го пасажу клітини почали краще рости, витримуючи розсів 1:3. Гарний ріст тривав з 21-го по 25-й пасаж, після чого спостерігали зниження ростової активності клітин сублінії G1-OA. Приблизно із 37-го пасажу клітини почали рости навіть при розсіві 1:10, а з 65-го пасажу — при 1:20.

Результати тестування на ознаки трансформованого фенотипу. Клітини досліджуваної нами клітинної лінії виявили ознаки злоякісної трансформації у культурі. Вони здатні куль-

тивуватися необмежено довго *in vitro* та рости в умовах значного дефіциту ростових факторів сироватки (рис. 2). У досліджах із визначення ефективності клонування виявили, що клітини лінії G1 можуть клонуватися при низькій щільності висіву. Так, при посіві по 500 клітин на чашку ефективність клонування була на порядок вище, ніж при посіві по 1000 і 2000 клітин. Вона становила понад 20% порівняно із близько 7% при зазначених висівах клітин. Кількість багатошарових клонів вірогідно не відрізнялась при таких кількостях висіяних клітин.

При клонуванні клітин також спостерігали утворення клонів клітин різної морфології, зокрема моношарових і різного ступеня багатошарових (рис. 3, а і б). Таким чином, втрата клітинами контактного гальмування виникає в окремих клітинах у різний час. Із окремого багатошарового клону лінії G1 на 66-му пасажі виділили сублінію G1-T, для якої характерний виражений багатошаровий ріст і підвищена швидкість росту.

Клітини досліджуваної лінії виявили також й такі типові ознаки трансформованих клітин — утворювали багатошарові колонії на моношарі (так звані фокуси морфологічної трансформації) та росли у напіврідкому агарі. Дослідження здатності клітин рости в напіврідкому агарі було проведено на 53-му пасажі культивування клітин лінії G1. Клітини сформували колонії через два тижні після висіву.

Фотографії фокусів трансформації та колоній клітин подано на рис. 3. Ріст клітин в агарі характерний для клітин, які перебувають на більш пізній стадії малігнізації [10].

Іморталізація клітин пов'язана із генетичними змінами. Каріотип іморталізованих клітин характеризується аномаліями кількості хромосом, а також хромосомними абераціями [10]. Такі зміни пов'язані із порушенням нормального перебігу мітозу, неправильним розподілом хромосом між дочірніми клітинами, що, в свою чергу, призводить до виникнення клітин із незбалансованими каріотипами та різними формами патології мітозу [11].

Порушення мітозу виникають при пошкодженні структур, які беруть участь у поділі клітини, наприклад, хромосом, мітотичного апарату, а також при пошкодженні пов'язаних із

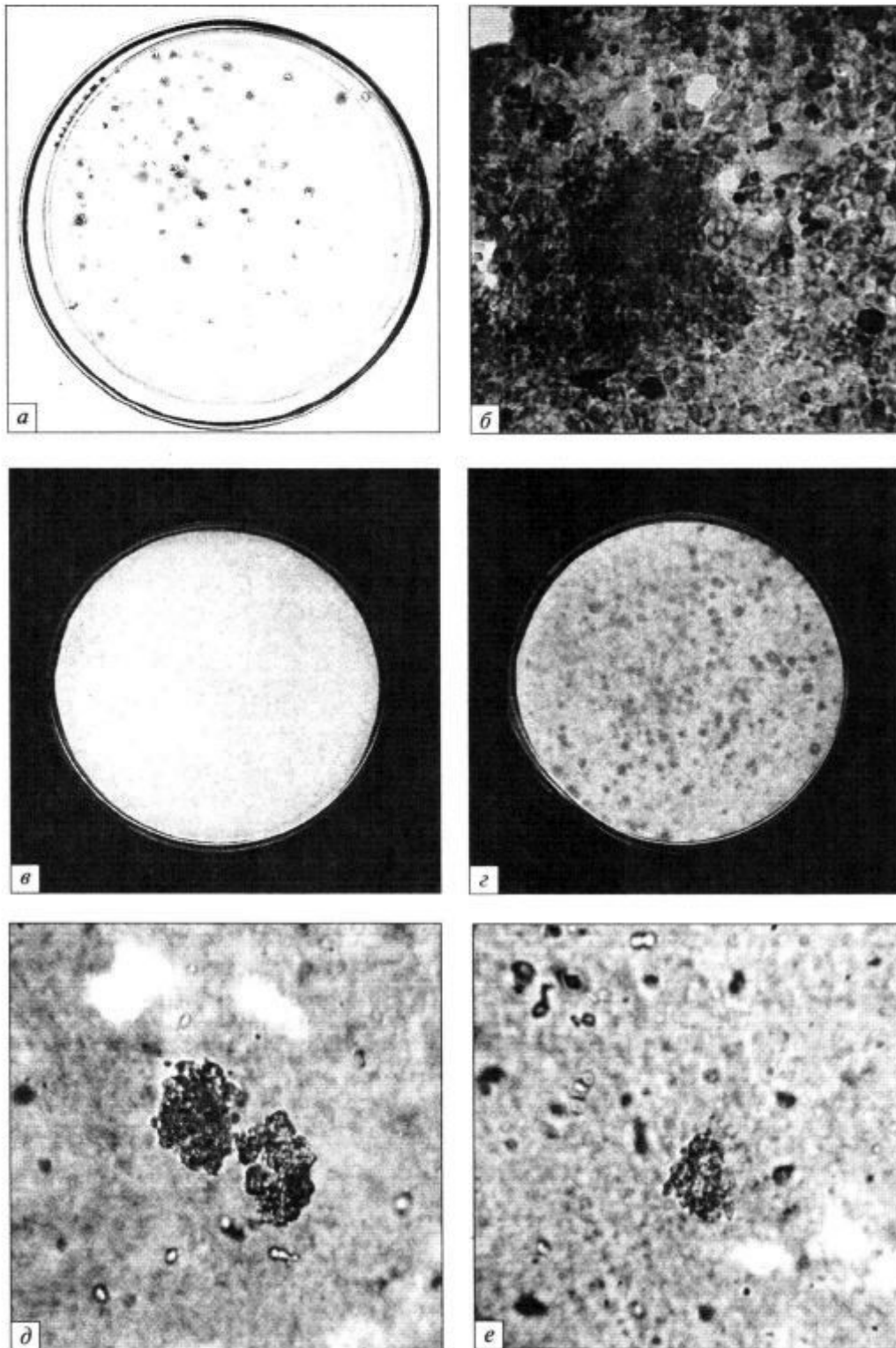


Рис. 3. Ознаки трансформованого фенотипу клітин лінії G1 миші: *a* — колонії різної морфології; *б* — фрагмент багат шарового клону; *в* — моношар клітин; *з* — фокуси трансформації на ньому; *д* і *е* — колонії клітин, які виростили в напіврідкому агарі

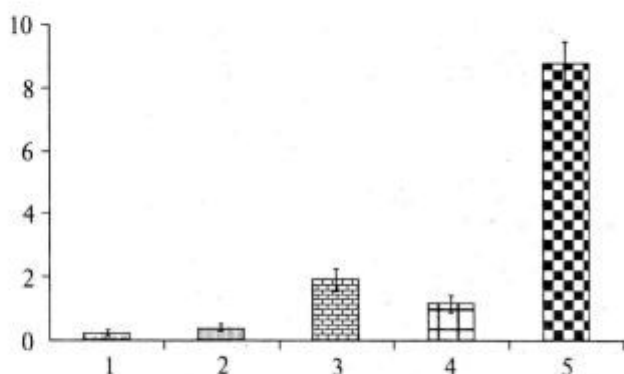


Рис. 4. Кількість мікроядерних клітин (по вертикалі, %) у клітинних культурах (по горизонталі): 1 — 3Т3; 2 — FM, 3-й пасаж; 3 — G1, 104-й пасаж; 4 — G1-T, 66/33-й пасаж; 5 — G1-OA, 35/59-й пасаж

цими структурами процесів — редуплікації ДНК, поляризації клітини, що ділиться, руху хромосом, цитотомії тощо [11].

Результати мікроядерного тесту. За допомогою мікроядерного тесту та на препаратах метафазних хромосом у популяціях клітин лінії G1 та її субліній G1-T і G1-OA виявили багатоядерні клітини, клітини з мікроядрами та інші форми патології мітозу (рис. 4–6). Для аналізу враховували одноядерні та багатоядерні клітини, а також клітини з мікроядрами. Серед багатоядерних клітин спостерігали від двох до десяти ядер і більше на одну клітину (до 14 ядер). Оскільки двоядерні клітини можуть бути проліферуючими або мати затримку цитотомії, то як багатоядерні враховували клітини, що мали від 3 до 10 ядер і більше. Як контроль брали ембріональні фібробласти (FM) лінії миші BALB/c на 3-му пасажі культивування та умовно нормальні фібробласти клітинної лінії 3Т3 миші. Результати даного аналізу подано в таблиці та на рис. 4.

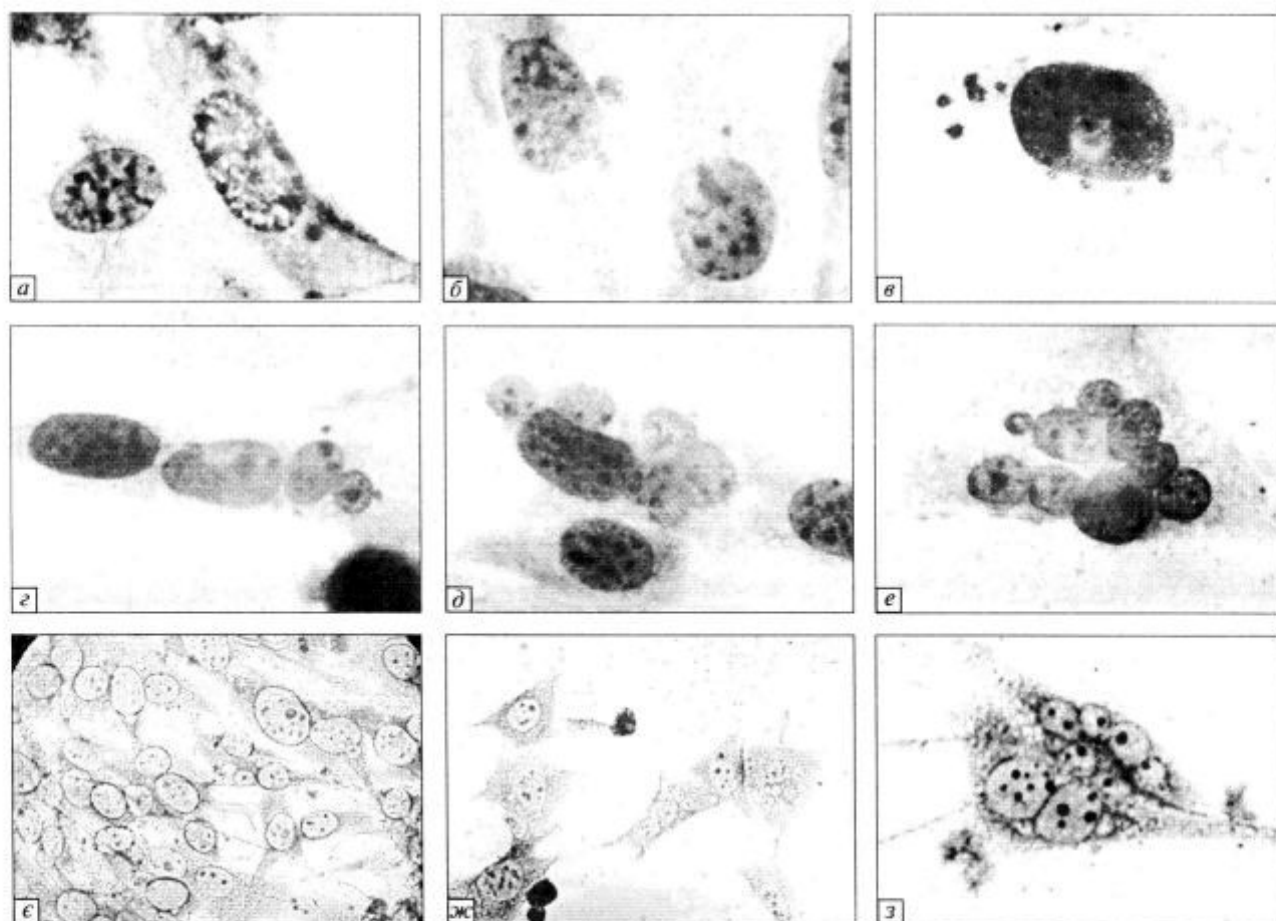


Рис. 5. Багатоядерні клітини та клітини з мікроядрами: а–е — клітини G1, об. 100×, ок. 10×; е–з — клітини G1-OA, об. 40×, ок. 10×

Визначили, що загальний відсоток багатоядерних клітин у FM становив $0,35 \pm 0,14$, а у клітинах лінії 3T3 таких клітин взагалі не спостерігали. Значної різниці між клітинами лінії G1 і сублінії G1-T за мітотичними порушеннями не виявили, в той час як клітини сублінії G1-OA мали статистично вірогідно вищий відсоток багатоядерних клітин. Зокрема, в них спостерігали клітини з різною кількістю ядер — від 3 до 10 включно та понад 10 ядер (таблиця, рис. 5, *є—з*). Також у клітинах даної сублінії виявили найвищий відсоток клітин із мікроядрами порівняно із клітинами вихідної лінії G1, сублінії G1-T та обома контролями (рис. 4). У клітинах лінії 3T3 та FM спостерігали, як правило, по одному мік-

роядру на клітину, в той час як у клітинах лінії G1, сублінії G1-T і G1-OA — як по одному, так і по декілька мікроядер на клітину (рис. 5, *а—в*). Інколи їхня кількість досягала до 10 у клітинах сублінії G1-OA.

І багатоядерні клітини, і клітини з мікроядрами є лише окремими прикладами патологічних мітозів, тому їхня частка повною мірою не відображає рівень порушень мітозу. Однак знаючи, що незначна кількість таких мітозів спостерігається у нормальних клітинах ссавців (від 0,3 % в епідермісі мишей до 2 % в епітеліальних тканинах людини), а підвищена — у клітинах неопластичного походження (10—25% у клітинах ліній HeLa, Нер-2 тощо) [10], можна зробити висновок, що рівень неоплас-

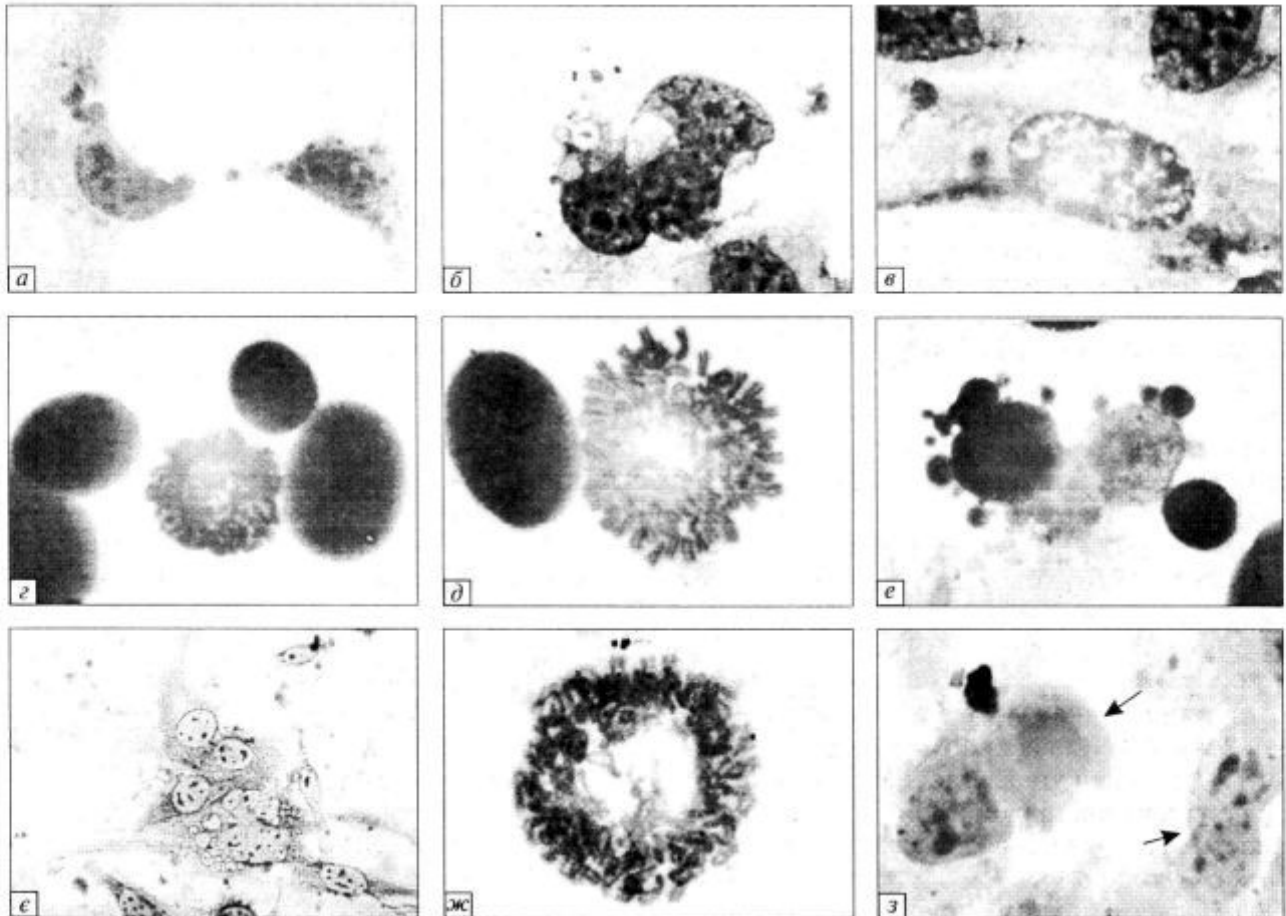


Рис. 6. Патологія мітозу у клітинах: *а* — міст і мікроядра у клітинах лінії G1; *б* — міст і мікроядра у клітинах сублінії G1-OA; *в* — склеєні хромосоми у клітинах сублінії G1-OA; *з* і *д* — К-мітози у клітинах лінії G1; *е* і *є* — пікноз ядра та вибрунькування апоптозних тілець у клітинах лінії G1; *ж* — порожня метафаза у клітинах сублінії G1-OA; *з* — порушення цитотомії (чорна стрілка) та вибрунькування апоптозних тілець (біла стрілка) у клітинах лінії G1. Об. 100×, окрім *є* — об. 40×, ок. 10×

Розподіл клітин різних культур за кількістю ядер

Культура клітин	Пасаж	Вибірка	Кількість клітин із певною кількістю ядер, %			
			1	2	3–10	понад 10
ЗТЗ	*	1672	99,16 ± 0,22	0,66 ± 0,20	0	0
FM	3	1702	96,06 ± 0,47	3,23 ± 0,43	0,35 ± 0,14	0
G1	41	1532	91,91 ± 0,70	4,11 ± 0,51	2,35 ± 0,39	0,33 ± 0,15
	52	1575	95,05 ± 0,55	1,52 ± 0,31	0,44 ± 0,17	0
	104	1567	96,62 ± 0,46	1,02 ± 0,25	0,45 ± 0,17	0
G1-T	66/33	1574	97,59 ± 0,39	0,89 ± 0,24	0,38 ± 0,16	0
G1-OA	35/4	1541	72,74 ± 1,13	8,57 ± 0,71	14,28 ± 0,89	1,30 ± 0,29
	35/15	1621	81,86 ± 0,96	2,53 ± 0,39	11,17 ± 0,78	1,79 ± 0,33
	35/35	1542	81,78 ± 0,98	5,12 ± 0,56	6,42 ± 0,62	0,65 ± 0,20
	35/59	1570	85,61 ± 0,89	3,63 ± 0,47	1,78 ± 0,33	0,19 ± 0,11

* Пасажі не зазначаються.

тичної трансформації клітин сублінії G1-OA вищий від аналогічного показника у вихідній лінії клітин G1. Результати дослідження вказують на те, що клітини досліджуваної лінії є генетично нестабільними і можна передбачити високий рівень хромосомних аберацій — і кількісних, і якісних.

Окрім зазначених патологій мітозу, значно рідше спостерігали інші форми порушень клітинного циклу. У поодиноких клітинах спостерігали раннє розділення хроматид та фрагментацію хромосом із утворенням як поодиноких, так і численних фрагментів. Ацентричні фрагменти хромосом утворюються під час малігнізації клітин при тривалому культивуванні *in vitro* та складають біля 44 % від кількості усіх патологічних мітозів [11]. Такі ацентричні фрагменти можуть потрапити в одну із дочірніх клітин, резорбуватися або утворити додаткове мікроядро. Фрагменти здатні об'єднуватися своїми кінцями випадково та призводити до хромосомних аберацій — делеції, інверсії, дуплікації та транслокації. Як у клітинах вихідної лінії G1, так і в клітинах субліній G1-OA і G1-T виявили утворення мостів (рис. 6, а, б). Їхнє утворення цілком закономірне, оскільки мости утворюються внаслідок об'єднання фрагментів хромосом, які містять центромери. В результаті цього утворюється дицентрична хромосома, яка зазнає впливу обох мітотичних центрів і, розтягуючись між дочірніми групами хромосом, утворює міст [11].

Досить часто спостерігали мости між клітинами, що містили також і мікроядра (рис. 6, а,

б). Такі клітини є дочірніми від клітин, у яких відставали хромосоми в метакінезі й при розходженні до полюсів і які мали центричні та ацентричні фрагменти хромосом. Виявляли мікроядра із ядерецями та без них, що залежало від того, які хромосоми та фрагменти хромосом сформували мікроядро (рис. 5, с–з; 6, а–в).

Іноді траплялися клітини із грудочками склеєних набухлих хромосом (рис. 6, в). У таких клітинах хромосоми не здатні розходитись, і вони гинуть [11].

Усі зазначені патології мітозу пов'язані із пошкодженнями хромосом. Серед патологічних мітозів, які пов'язані із пошкодженнями мітотичного апарату, найчастіше спостерігали К-мітоз (рис. 6, з, д). Серед них часто траплялися К-мітози із хромосомами, склеєними в неправильну грудкувату метафазну пластинку (рис. 6, з), шаровидні зірки, «зірки»-метафази та метафази із кількома групами хромосом (рис. 6, д). Такі порушення мітозу пов'язані із пошкодженням і дезорганізацією різних компонентів мітотичного апарату — центріолей, веретена поділу та кінетохорів [11]. При К-мітозі також змінюються й самі хромосоми. Описано, що при К-мітозі, спричиненому дією мітотичних отрут, посилюється спіралізація хромосом і порушуються процеси цитотомії. К-мітоз призводить до пікнозу ядра та загибелі клітини або у випадку обробки клітин отрутами — до поліплоїдизації клітини чи до відновлення мітотичного апарату та завершення мітозу. На досліджуваних препаратах спостерігали пікнотичні ядра та вибрунькування

апоптичних тілець (рис. 6, e, e), а також гігантські ядра, які можуть бути поліплоїдними. Трапляються метафази із невпорядкованим розсіюванням хромосом без утворення типової екваторіальної пластинки. Спонтанне розсіювання хромосом у метафазі пов'язане із пошкодженням або повною дезорганізацією мітотичного апарату при патологічних процесах й відрізняється від аналогічної картини К-мітозу відсутністю гіперспіралізації хромосом та нерозділення кінетохор [11].

Дуже рідко траплялися порожні метафази (рис. 6, ж).

Значна частка патологічних мітозів у клітинах лінії G1 припадає на порушення цитотомії, зокрема відставання (або спізнення) цитотомії (рис. 6, e, з). Така патологія може призводити до виникнення двоядерних клітин або одноядерної поліплоїдної [11].

Порушення мітозу, які призводять до змін каріотипу, спричиняють виникнення інших патологій цього процесу та призводять до каскаду патологічних мітозів у ряду наступних поколінь [11]. Це підвищує генетичну нестабільність клітинної популяції та посилює неопластичну трансформацію.

У популяції клітин лінії G1 виявили геномні та хромосомні мутації, а також у значній кількості міжхромосомні асоціації за типом Робертсонівських транслокацій [3, 14]. Надалі плануємо здійснити детальний цитогенетичний аналіз клітинної лінії G1 миші та її субклонів на різних етапах культивування із метою каріотипічної характеристики нової клітинної лінії та особливостей її хромосомної нестабільності. Одержана нова клітинна лінія може бути зручним об'єктом для дослідження молекулярних особливостей порушення нормального перебігу мітозу та хромосомної нестабільності при спонтанній трансформації клітин миші *in vitro*.

Висновок. Ростові особливості, морфологічні зміни та різні форми патологій мітозу досліджуваної клітинної лінії G1 вказують на її неопластичну трансформацію та пов'язану з нею хромосомну нестабільність.

Висловлюємо щире подяку за корисні поради канд. біол. наук С.С. Кіреєвій та канд. біол. наук С.П. Шпильовій, за допомогу в проведенні мікрофотографування канд. біол. наук В.І. Андрієнку.

SUMMARY. Growth and morphological properties of a novel mouse cell line G1 have been investigated. It has been shown that cells of this cell line possess the ability of spontaneous transformation *in vitro*: the cells have unlimited growth in culture, grow in medium with a low serum content and form multilayer colonies on a cell monolayer and cell colonies inside agar. Using micronucleus test it has been revealed that cells of the G1 cell line possess different forms of aberrant mitosis. The results indicate the neoplastic G1 cell transformation with aberrant mitosis.

РЕЗЮМЕ. Проведен аналіз ростових і морфологічних свойств нової клітинної лінії G1 миші. Виявлено признаки спонтанної трансформації кліток *in vitro*, а именно клітки лінії G1 обладують неограниченною продовжителюстю життя в культурі, способны к росту в условиях значительного дефицита ростовых факторов сыворотки, образуют многослойные колонии на монослое клеток и колонии в полужидком агаре. С помощью микроядерного теста в клетках исследуемой линии выявлены разные формы патологии митоза. Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о неопластической трансформации клеток с нарушением нормального течения митоза.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Мамаева С.Е.* Закономерности каріотипической эволюции клеток в культуре // *Цитология*. — 1996. — 36, № 8. — С. 787—814.
2. *Maitra A., Arking D.E., Shivapurkar N., Ikeda M., Stastny V., Kassaei K., Sui G., Cutler D.J., Liu Y., Brimble S.N., Noaksson K., Hyllner J., Schulz T.C., Zeng X., Freed W.J., Crook J., Abraham S., Colman A., Sartipy P., Matsui S., Carpenter M., Gazdar A.F., Rao M., Chakravarti A.* Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells // *Nature Genet.* — 2005. — 37, № 10. — P. 1099—1103.
3. *Лукаш Л.Л., Яцишина А.П., Підпала О.В., Вагіна І.М., Кочубей Т.П.* Одержання нових ліній стовбурових клітин миші і вивчення впливу мікрооточення на їхню каріотипічну мінливість *in vitro* // *Физиология и биохимия культур. растений*. — 2006. — 38, № 2. — С. 140—148.
4. *Практикум по цитологии* : Учеб. пособие для студентов биол. спец. вузов / Под ред. Ю.С. Ченцова. — М.: Изд-во Моск. гос. ун-та, 1988. — 295 с.
5. *Топчий М.К., Корнюшенко Н.П.* Руководство к практическим занятиям по вирусологии. — К.: Изд-во Киев. ун-та, 1967. — 93 с.
6. *Леликова Г.П., Раевская Г.Б., Варшавер Н.Б.* Изучение спонтанного темпа возникновения двух признаков трансформированного фенотипа в культуре фибробластов мыши // *Генетика*. — 1985. — 21, № 6. — С. 945—953.
7. *Раевская Г.Б., Варшавер Н.Б., Шапиро Н.И.* Обра-

- тимось злокачественной трансформации под влиянием онкогенного вируса SV40 // Генетика. — 1987. — 23, № 12. — С. 2196—2203.
8. Moorhead P.S., Nowell P.C., Mellman W.I., Battips D., Hugerford D.A. Chromosome preparation of leukocytes cultured from human peripheral blood // Exp. Cell Res. — 1960. — 20, № 3. — P. 613—616.
9. Плохинский Н.А. Алгоритмы биометрии / Под ред. Б.В. Гнеденко. — М.: Изд-во Моск. гос. ун-та, 1980. — 150 с.
10. Гривенников И.А., Бобрышева И.В., Варшавер Н.Б., Григоренко А.П., Иноземцева Л.С., Мануилова Е.С. Молекулярные механизмы дифференцировки, злокачественной трансформации и гибели соматических клеток млекопитающих *in vitro* // Проблемы и перспективы молекулярной генетики / Отв. ред. Е.Д. Свердлов. — М.: Наука, 2003. — Т.1. — С. 248—289.
11. Алов И.А. Цитофизиология и патология митоза. — М.: Медицина, 1972. — 264 с.
12. Lou C.-Y., Feng Y.-M., Qian A.-R., Tang H., Shang P., Chen Z.-N. Establishment and characterization of human hepatocellular carcinoma cell line FHCC-98 // World J. Gastroenterol. — 2004. — 10, № 10. — P. 1462—1465.
13. Strickland F.D., Pathak S., Multani A.S., Pelley R.P. Molecular characterization of new melanoma cell lines from C3H mice induced by ethanol plus ultraviolet radiation // Cancer Res. — 2003. — 63, № 13. — P. 3503—3510.
14. Яцишина А.П., Підпала О.В., Кочубей Т.П., Лукаш Л.Л. Спонтанна каріотипічна еволюція клітин миші *in vitro* // Фактори експериментальної еволюції організмів. — Київ: Аграр. наука, 2004. — С. 88—92.

Надійшла 27.12.05