

Цитогенетичний аналіз спонтанно іморталізованої клітинної лінії G1 миші

А. П. Яцишина, О. В. Підпала, Т. П. Кочубей, Л. Л. Лукаш

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

a.p.iatsyshyna@imbg.org.ua

Здійснено цитогенетичний аналіз спонтанно іморталізованої клітинної лінії миші G1 на 15, 24, 53, 68, 104 і 140-му пасажах культивування in vitro. Виявлено кількісні зміни хромосом та різні хромосомні аберації, особливо високу частоту робертсонівських транслокацій. Спостерігали зменшення гетерогенності клітинної популяції при тривалому культивуванні. Каріотипічна еволюція клітин на етапі становлення тривала не менше 140 пасажів.

Ключові слова: каріотипічна еволюція, хромосомні аберації, робертсонівські транслокації.

Вступ. Бурхливий розвиток сучасних новітніх біотехнологій з використанням культур клітин ссавців (включаючи різні типи стовбурових клітин) та їхнє практичне застосування у клітинній терапії зумовлюють інтенсивні цитогенетичні дослідження клітин у культурі.

Знання та розуміння загальних закономірностей каріотипічної мінливості клітин дозволяють прогнозувати поведінку кожної конкретної лінії вже на початку її культивування *in vitro*, тобто на етапі її становлення. Такий прогноз важливий при використанні постійних клітинних ліній як у різноманітних молекулярно-генетичних експериментах, так і в біотехнологічних дослідженнях. Процес каріотипічної еволюції клітинної лінії, як відомо, складається з двох якісно різних стадій: етапу становлення та етапу стабілізації [1, 2]. Перший етап є найменш вивченим, саме на ньому відбуваються адаптаційні зміни хромосомного апарату клітинної лінії: здійснюються кількісні та структурні перебудови хромосом і клітинна популяція є каріотипічно гетерогенною. Етап стабілізації ха-

рактеризується невеликою варіабельністю кількості хромосом, вираженим модальним класом числа хромосом і збалансованістю каріотипу.

Важливе значення має вивчення закономірностей каріотипічної мінливості, загальних для клітин *in vivo* та *in vitro*. Картина розподілу «гарячих» точок на хромосомах та зміна кількості певних хромосом є морфологічними проявами молекулярно-біохімічних процесів, пов'язаних зі зміною кількості та структури різних генів, у тому числі онкогенів. Ця обставина обумовлює перспективність використання клітинних ліній для вивчення ролі специфічних змін хромосом у злоякісній трансформації клітин [1, 2]. Дослідження хромосомної нестабільності при становленні клітинних ліній *in vitro* можуть бути моделлю спонтанної трансформації клітин *in vivo*.

Метою нашої роботи було дослідити цитогенетичні зміни, які виникають у мишачих стовбурових клітинах ембріонального походження, при їхньому тривалому моношаровому культивуванні *in vitro*.

Матеріали та методи. Роботу проводили на клітинній лінії G1 миші, отриманій з ембріонального матеріалу мишей лінії BALB/c [3, 4]. Клітини

культивували в середовищі DMEM («Sigma», США) із додаванням пеніциліну (100 од/мл), стрептоміцину (100 мкг/мл) і 5 %-ї ембріональної сироватки теляти (ЕС) («Сангва», Україна).

Хромосомний аналіз. Препарати хромосом готували за загальноприйнятою методикою [5], модифікованою в нашій лабораторії, зокрема, без використання колхіцину та інших мітотичних отрут, і гіпотонізували клітини протягом 30—40 хв у деіонізованій воді за температури 37 °С [3, 4]. Препарати забарвлювали протягом 10—20 хв у 5 %-му розчині барвника Гімза, приготовленому на фосфатному буфері (рН 6,8). Аналіз метафазних пластинок здійснювали на мікроскопі Jenaval («Carl Zeiss», Австрія) (об'єктиви $\times 40$ і $\times 100$).

Каріотипічний аналіз проводили на 15, 24, 53, 68, 104 і 140-му пасажах культивування клітин *in vitro*. Аналізували кількісні та якісні зміни хромосом, зокрема, розглядали два типи анеуплоїдії (гіподиплоїдію із кількістю хромосом менше 40 і гіперплоїдію із кількістю хромосом більше 40), еуплоїдію, хромосомні аберації (хроматидні та хромосомні розриви, фрагменти, кільцеві хромосоми, обміни та транслокації), міжхромосомні асоціації за типом Робертсонівських транслокацій. Для визначення модального класу та мінливості клітин за кількістю хромосом аналізували від 100 до 1000 метафазних пластинок у кожному варіанті.

Мікрофотографування. Мікрооб'єкти фотографували за допомогою фотоапаратів «Київ» і «Зеніт» із використанням кольорових фотоплівок «Kodak-100» і «Kodak-200» та чорно-білих — «Свема-64» і «Свема-100».

Статистичний аналіз. Результати опрацьовували статистично за Плохінським [6].

Результати та обговорення. Раніше нами досліджено морфологічні та ростові характеристики нової клітинної лінії G1 миші [3, 4]. Виявлено морфологічну гетерогенність цієї лінії з домінуючим клітинним типом — фібробластоподібні клітини — та ознаки неопластичної трансформації клітин. У популяції клітин згаданої лінії зафіксовано значний відсоток багатоядерних клітин та клітин із мікроядрами, а також різні форми патологічних мітозів, що свідчить про підвищену хромосомну нестабільність клітин лінії G1 і дерегуляцію клітинного поділу [4].

Аналіз розподілу клітин лінії G1 за кількістю хромосом на різних етапах культивування *in vitro* виявив значну гетерогенність клітинної популяції

та поступове зменшення її при тривалому культивуванні. Зокрема, на 15-му пасажі культивування клітинна популяція була високогетерогенною за кількісним складом хромосом, що виявлялося наявністю біля 15 класів клітин за кількістю хромосом (рис. 1, а). Така висока гетерогенність клітин за каріотипічними ознаками є характерною особливістю культур клітин на самих ранніх етапах культивування, однак при подальшому культивуванні, як правило, вона зменшується та відбувається виокремлення модального класу хромосом [7].

На 15-му пасажі кількість хромосом значно варіювала від гіподиплоїдів до високоплоїдів (мають понад 100 хромосом), однак серед такої кількісної гетерогенності хромосом можна виокремити домінуючі клони клітин із гіподиплоїдними (28—30), гіпердиплоїдними (46), гіпертетраплоїдними (88) і біляпентаплоїдними (102) хромосомами та групи клітин білягексаплоїдного ряду (112—124). Саме ці шість груп домінуючих клітин, скоріш за все, мають тенденцію до утворення модального класу при становленні клітинної лінії G1 миші *in vitro*. Відсутність вираженого модального класу та модального числа хромосом свідчить про те, що клітини на 15-му пасажі культивування ще знаходяться на етапі становлення клітинної лінії.

На 24-му пасажі культивування *in vitro* популяція клітин лінії G1 також була високогетерогенною за кількістю хромосом, зокрема, в ній нараховувалося до 20 модальних класів (рис. 1, б). Проте кількість груп клітин, які мають тенденцію до утворення модального класу, зменшилася до чотирьох, а саме: білядиплоїдна (42—48), білятетраплоїдна (80—88), біляпентаплоїдна (94—98) і білягексаплоїдна (118—122) (рис. 1, б). Варто зазначити, що й на 24-му пасажі культивування клітин, як і на 15-му, виявлено значну варіабельність за кількістю хромосом (від білягаплоїдів до гіпергексаплоїдів із значною кількістю клітин біляпентаплоїдного ряду) та відсутність вираженого модального числа хромосом і модального класу.

У популяції клітин лінії G1 на 53-му пасажі культивування *in vitro* нараховувалося вже біля 13 модальних класів клітин за кількістю в них хромосом (рис. 1, в). Каріотипічна гетерогенність тут зберігалась, однак спостерігали зменшення кількості груп клітин із тенденцією до утворення модального класу — домінування клітин біляпентаплоїдного ряду, серед яких дві біляпентаплоїдні групи (92—98 і 108—112) та клітини білягекса-

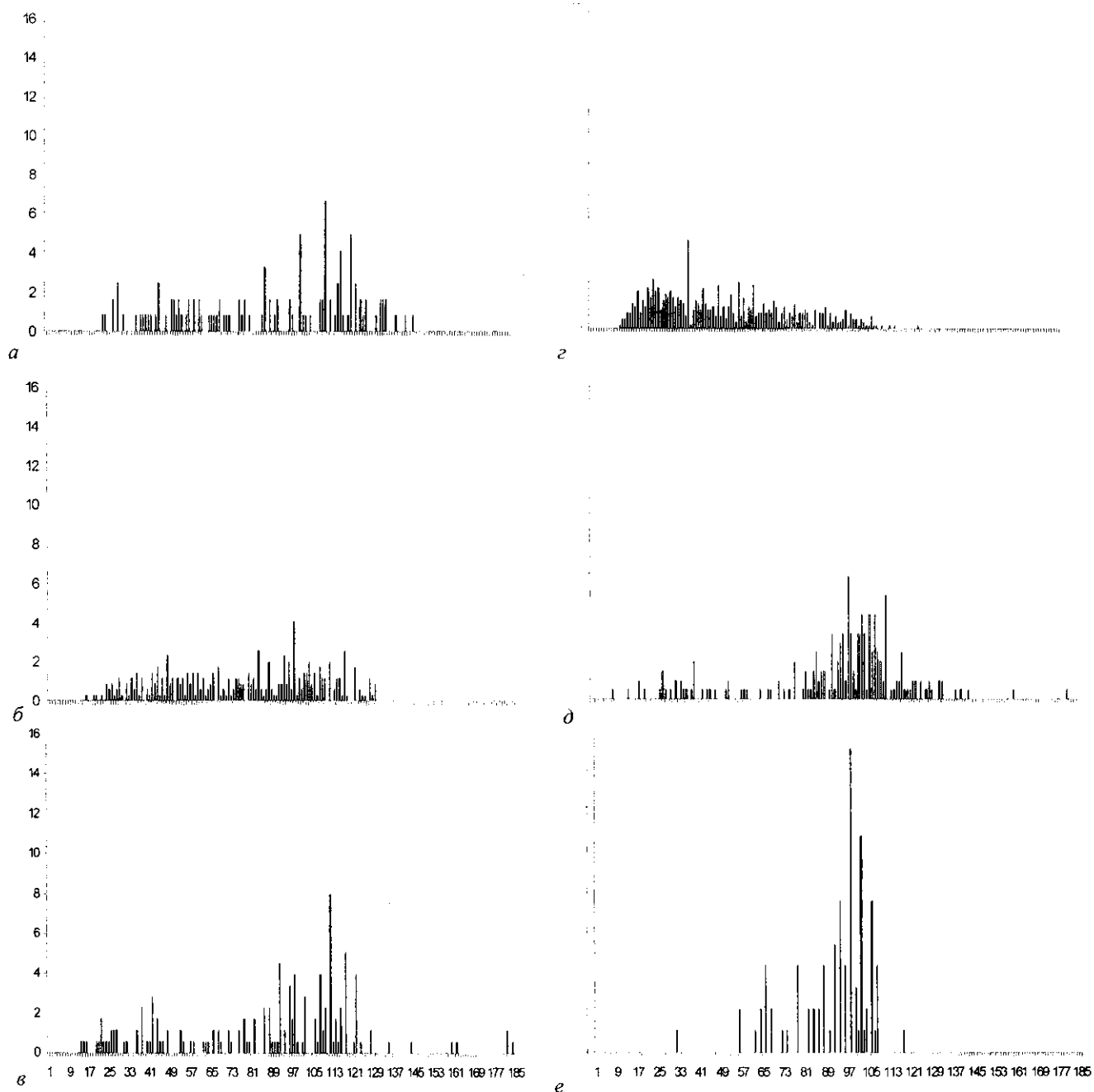


Рис. 1. Розподіл кількості хромосом у клітинах лінії G1 миші при культивуванні *in vitro*: а — 15; б — 24; в — 53; г — 68; д — 104; е — 140-й пасажі. По осі абсцис — кількість хромосом; по осі ординат — частота клітин із даною кількістю хромосом (%)

плоїдної групи (118—122). Також виокремилася група біядиплоїдних клітин (38—44).

На 68-му пасажі культивування *in vitro* відбулася зміна домінуючих популяцій біяпента- та біягексаплоїдних клітин. Таке явище не є рідкіс-

ним при тривалому культивуванні [7]. Кількість модальних класів зменшилася до дев'яти, та домінували популяції клітин біягаплоїдної (18—28), гіподиплоїдної (30—38), гіпердиплоїдної (46—57) та біятриплоїдної (60—66) груп із значною пере-

Таблиця 1
Розподіл клітин лінії G1 миші за кількістю хромосом на різних пасажах

Пасаж	Кількість проаналізованих метафаз	Кількість клітин, %				
		Диплоїдний набір хромосом ($2n = 40$)	Еуплоїди	Анеуплоїди		Високоплоїди ($2n > 100$)
				Плодіплоїди ($2n < 40$)	Гіперплоїди ($2n > 40$)	
15-й	121	0,83±0,83	4,13±1,82	8,26±2,51	86,78±3,09	47,93±4,56
					95,04±1,98	
24-й	345	0,58±0,41	4,06±1,06	11,59±1,73	83,77±1,99	30,14±2,47
					95,36±1,13	
53-й	176	0,57±0,57	1,14±0,80	14,20±2,64	84,09±2,76	41,48±3,72
					98,30±0,98	
68-й	635	4,41±0,82	3,31±0,71	35,43±1,90	56,85±1,97	6,93±1,01
					92,28±1,06	
104-й	221	1,81±0,90	4,07±1,33	8,14±1,84	85,97±2,34	52,04±3,37
					94,12±1,59	
140-й	93	—	3,23±1,84	1,08±1,08	95,70±2,11	33,33±4,91
					96,77±1,84	

Примітка. «—» — Не спостерігали.

вагою клітин із диплоїдною кількістю хромосом (40) (рис. 1, г). Однак у цьому разі в невеликій кількості ще були присутні клітини більшої плоїдності, а саме: білятетраплоїдного, біляпентаплоїдного ряду та незначна кількість білягексаплоїдів.

При дослідженні наступних пасажів спостерігали відновлення домінування популяцій клітин біляпента- та білягексаплоїдного рядів, зменшення гетерогенності клітин за кількістю в них хромосом. При цьому зменшилася частка клітин, у яких менше 80 хромосом, і стрімко зросла частка біляпентаплоїдів (рис. 1, д, е). Зокрема, на 104-му пасажі у популяції клітин лінії G1 домінували біляпентаплоїдні клітини та нараховувалося біля п'яти модальних класів (рис. 1, д), а на 140-му пасажі виокремилися два модальних класи з кількістю хромосом 94—98 і 102—108 (рис. 1, е) та два модальних числа хромосом — 98 і 102. Це можна розглядати як початковий етап стабілізації клітинної лінії G1.

Досліджувана клітинна лінія, незважаючи на своє клональне походження [3], виявила каріотипічну гетерогенність у дуже широких межах та характеризувалася частою зміною домінуючих клонів. Саме тому процес її становлення був дуже тривалим у часі і початок стабілізації припав аж на 140-й пасаж порівняно з іморталізацією клітин-

них ліній, одержаних з 14-денних ембріонів мишей лінії BALB/c, яка відбувалася до 20-го пасажу, а також з початком стабілізації клітинних ліній, одержаних при тривалому культивуванні *in vitro* клітин рабдоміосаркоми мишей, що проходила на 30—50-му пасажах [7, 8].

Розподіл клітин лінії G1 миші на великі групи за плоїдністю виявив значний відсоток гіперплоїдних клітин ($2n > 40$) на всіх етапах становлення нової клітинної лінії G1 миші (табл. 1). Проте спостерігали коливання вмісту високоплоїдних клітин ($2n > 100$) з надто різким зменшенням їхньої кількості на 68-му пасажі (табл. 1). Саме на цьому пасажі виявлено домінування клітин білядиплоїдного ряду та найвищу кількість клітин із диплоїдним набором хромосом — біля 4 % порівняно з менш ніж 1 % на більш ранніх пасажах та їхньою відсутністю на початок стабілізації клітинної лінії. Кількість euploidних клітин ($\times 20$) у процесі культивування не зазнала суттєвих коливань, незначні зміни у їхньому вмісті спостерігали на 53-му пасажі культивування *in vitro*, зокрема, біля 1 % відносно 3—4 % на інших пасажах (табл. 1).

У процесі культивування популяції клітин лінії G1 миші виявлено значний відсоток клітин із транслокаціями хромосом за Робертсонівським типом (табл. 2). У клітинах спостерігали від однієї до

Таблиця 2

Розподіл клітин лінії G1 миші за кількістю робертсонівських транслокацій (РТ)

Пасаж	Кількість проаналізованих метафаз	Кількість клітин із РТ, %					
		Всього	Кількість РТ на одну метафазну пластинку				
			1	2	3	4	5
15-й	96	64,58±4,91	55,21±5,10	8,33±2,84	1,04±1,04	—	—
24-й	222	36,47±3,24	31,53±3,13	4,05±1,33	0,45±0,45	—	0,45±0,45
53-й	176	23,30±3,20	21,02±3,08	1,70±0,98	0,57±0,57	—	—
68-й	635	18,11±1,53	15,43±1,43	1,42±0,43	0,94±0,38	0,31±0,22	—
104-й	213	53,99±3,42	37,56±3,33	15,02±2,45	0,94±0,66	0,47±0,47	—
140-й	93	74,19±4,56	38,71±5,08	24,73±4,50	8,60±2,92	1,08±1,08	1,08±1,08

Примітка. «—» — Не спостерігали.

п'яти робертсонівських транслокацій (РТ) на метафазу (рис. 2). Так, уже на 15-му пасажі знайдено понад 60 % клітин із РТ. При подальшому культивуванні спостерігали зменшення кількості клітин із РТ до близько 18 % на 68-му пасажі. Однак їхня кількість знову стрімко зросла до понад 70 % на 140-му пасажі. Отже, висока частота клітин із РТ є характерною особливістю клітинної лінії G1.

Відомо, що для мишей лінії BALB/c цитогенетичні аномалії, пов'язані із внутрішньохромосомними пошкодженнями, є типовими, наприклад, хромосомні аберації та РТ.

Так, за даними Вагіної та співавт., у клітинах кісткового мозку мишей лінії BALB/c, із яких одержано досліджувану клітинну лінію, частота РТ становила біля 7 % [9]. Відомо також, що міжхромосомні асоціації гомологічних і негомологічних хромосом за типом РТ обумовлюються адаптацією клітин до умов культивування та є зручними хромосомними маркерами відповідних клітинних ліній [10]. Можливо, одержані з мишей лінії BALB/c ембріональні клітини вже початково були схильними до утворення РТ.

Порівнявши результати хромосомного аналізу з розподілу клітин за кількістю в них хромосом, їхньою плоідністю та кількістю РТ, можна зробити висновок стосовно того, що в клітинах лінії G1 з високою плоідністю, зокрема, біягексаплоїдах і біягексаплоїдах значно зростає частка РТ. Тобто процес поліплоїдизації геному миші супроводжується численними асоціаціями акроцентричних хромосом у метацентричні. Геном клітини намагається у такий спосіб зменшити кількість хромосом без втрати генетичного матеріалу. При зростанні пло-

ідності клітин відповідно збільшується і кількість різноманітних генів, у тому числі й онкогенів. Завдяки цьому клітинам з вищою плоідністю притаманний підвищений адаптивний потенціал і селективні переваги за умов *in vitro* порівняно з клітинами, що мають нормальний каріотип.

Використовуючи базу даних клітинних ліній HyperCLDB (Cell Line Data Base hypertext; <http://www.biotech.ist.unigue.it>), знайдено, що всього з мишей одержано 582 клітинні лінії, з мишей лінії BALB/c — біля 111 (<http://www.biotech.ist.unigue.it/cldb/spestr.html>). До того ж виділені саме з цих мишей клітинні лінії є переважно міеломними [11] і лише незначна їхня кількість є фібробластоподібними культурами з моношаровим ростом.

Серед представлених у каталозі російської колекції клітинних культур [12] за каріотипічними характеристиками мінливість таких ліній за кількістю хромосом знаходиться в межах 50—80 хромосом і дуже рідко — біля 60—100, деякі мають мініхромосоми, хромосомні маркери — метацентрики або субметацентрики. Найчастіше в клітинних лініях мишей відмічають структурні перебудови хромосоми 15, рідше — хромосом 1, 6 і 12 [1]. Однак для мишей лінії BALB/c у клітинах кісткового мозку показано найактивнішу участь у РТ хромосом 1, 12 і 5 [13]. Попередні результати детального каріотипічного аналізу клітин лінії G1 вказують на те, що в клітинах досліджуваної лінії спостерігається тенденція до переважної участі в утворенні РТ найбільших хромосом геному миші, тобто 1, 2 і 3.

При аналізі препаратів метафазних хромосом клітин лінії G1 миші виявлено також інші хромо-

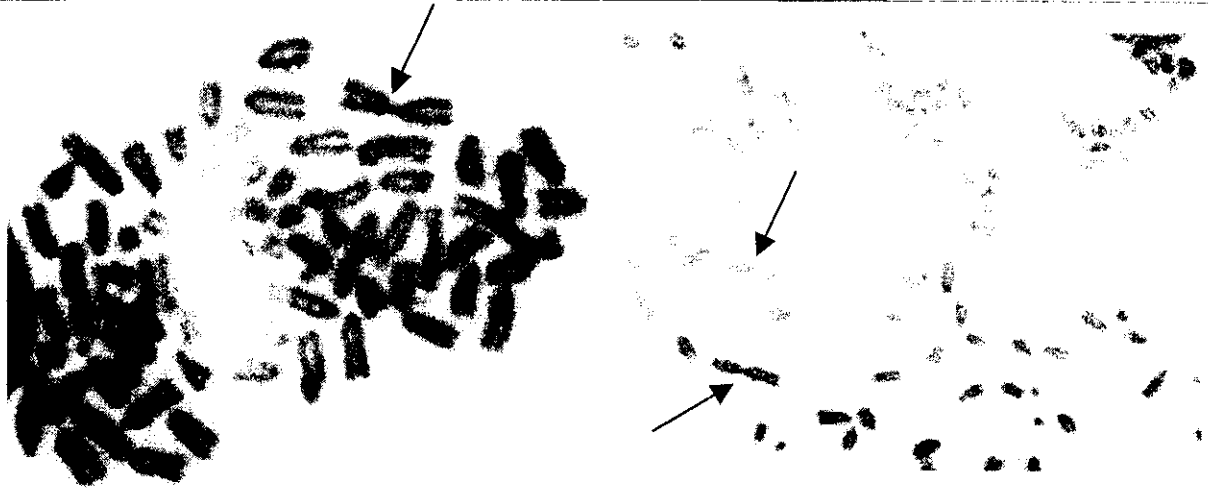


Рис. 2. Метафазні пластинки клітин лінії G1 із робертсонівськими транслокаціями (вказано стрілками)

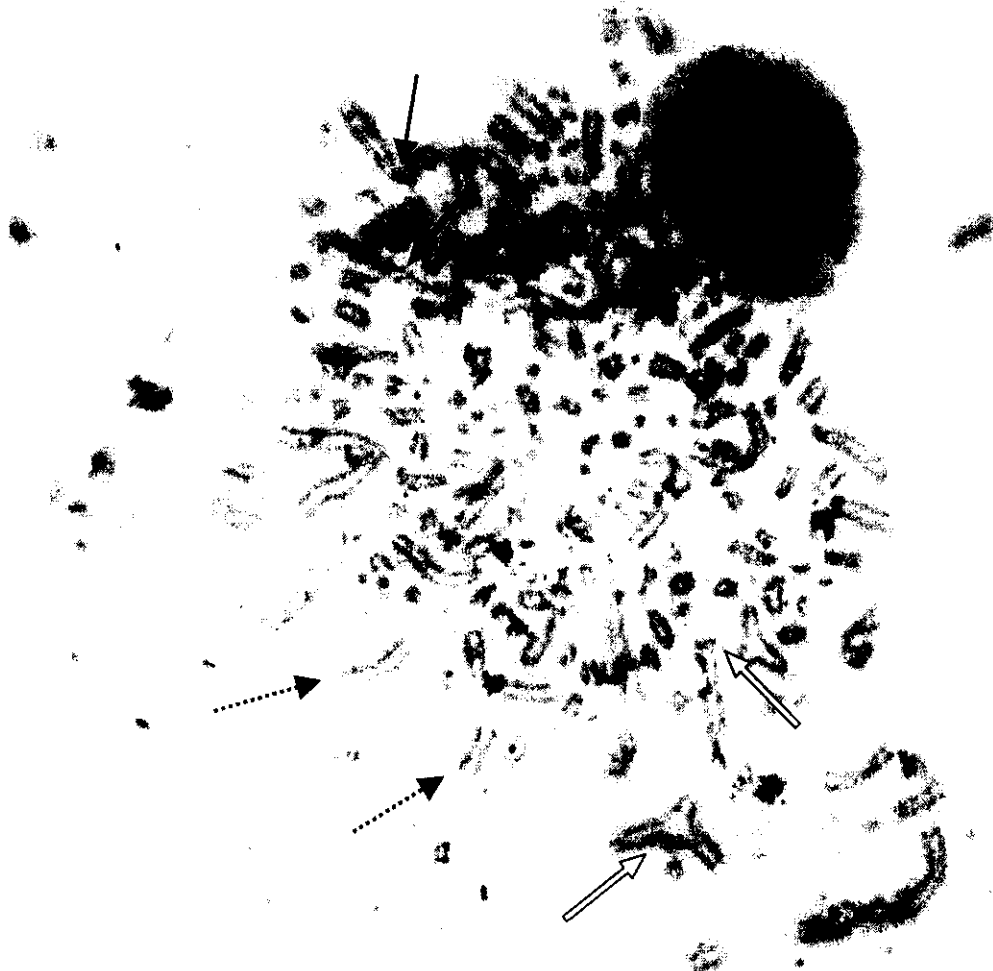


Рис. 3. Хромосомні аберрації у клітинах лінії G1 миші: чорні стрілки — хроматидний розрив; чорні штрихові — ацентричні фрагменти; білі стрілки — симетричні та асиметричні обміни; товста стрілка — транслокація

сомні аберації [3, 4, 14], зокрема, хроматидні та хромосомні розриви з утворенням ацентричних фрагментів, симетричні та асиметричні обміни і

транслокації (рис. 3), а також кільця, мініхромосоми з функціональними центромерами та великі перебудовані хромосоми.

Знайдені в клітинах нової лінії G1 миші різноманітні форми патологічних мітозів свідчать про порушення функцій як самих хромосом, так і роботи всього мітотичного апарату [4, 15]. Підвищена хромосомна нестабільність та інтенсивне протікання каріотипічної еволюції клітин досліджуваної лінії разом із патологіями мітозу вказують на пошкодження регуляції мітозу, а саме — на втрату контрольної точки мітозу (the mitotic checkpoint) або контрольної точки веретена (the spindle checkpoint). У таких клітинах порушення регуляції нормального перебігу клітинного циклу призводить до каскаду реакцій розбалансування усіх процесів клітини, від яких залежить їхня подальша доля.

Не менш важливо й те, що в клітинах лінії G1 пошкоджено й репараційні системи, про що свідчать різноманітні хромосомні аберації (зокрема, розриви). При цьому еуплоїдні клітини та анеуплоїди з різних груп плоідності, а також хромосомні аберації, включаючи РТ, створюють розмаїття генетично різних клонів і, таким чином, забезпечують матеріал для селекції найприспосованіших клонів клітин до умов культури. І такими клітинами виявляються трансформовані клітини з пошкодженою регуляцією стабільності геному.

Постає питання: чи виникають аналогічні зміни хромосомного апарату при культивуванні стовбурових клітин людини, які пропонуються для використання в клітинній та генній терапії? Адже, навіть дотримуючись основних умов культивування стовбурових клітин, у клітинах лінії G7 миші також спостерігали геномні мутації [3], до того ж з'являються дані і про накопичення мутацій у популяціях ембріональних стовбурових клітин при культивуванні [16].

Висновки. Для клітинної лінії G1 миші характерна інтенсивна каріотипічна еволюція, супроводжувана підвищеною хромосомною нестабільністю, та тривалий етап становлення з початком стабілізації клітинної лінії на 140-му пасажі. Виявлено домінування клітин високої плоідності (зокрема, біляпентаплоїдів), а також значний відсоток клітин із РТ на всіх етапах становлення досліджуваної клітинної лінії.

Автори висловлюють щире подяку І. М. Вагіній і Т. Т. Глазко за корисні поради при підготовці рукопису, а також В. І. Андрієнку — за допомогу в проведенні мікрофотографування.

A. P. Iatsyshyna, O. V. Pidpala, T. P. Kochubey, L. L. Lukash

Cytogenetic analysis of the spontaneously immortalized mouse cell line G1

Summary

Cytogenetic analysis of the spontaneously immortalized mouse cell line G1 has been carried out on passages 15, 24, 53, 68, 104 and 140 of *in vitro* cultivation. G1 cells were revealed to have quantitative chromosome changes, different chromosomal aberrations, and a particularly high percentage of Robertsonian translocations. The heterogeneity of cell population was observed to diminish during long-term cell cultivation. The karyotypic evolution of cells lasted not less than 140 passages on the stage of formation.

Keywords: karyotypic evolution, chromosome aberration, Robertsonian translocation.

A. П. Яцишина, О. В. Підпала, Т. П. Кочубей, Л. Л. Лукаш

Цитогенетический анализ спонтанно immortalized клеточной линии G1 мыши

Резюме

Проведен цитогенетический анализ спонтанно immortalized клеток мышечной линии G1 на 15, 24, 53, 68, 104 и 140-м пассажах культивирования *in vitro*. Показано, что клетки линии G1 имели количественные изменения хромосом и разные хромосомные aberrации, особенно высокую частоту робертсоновских транслокаций. В процессе длительного пассирования наблюдали снижение гетерогенности клеточной популяции. Каріотипическая эволюция клеток на этапе становления длилась не менее 140 пассажей.

Ключевые слова: каріотипическая эволюция, хромосомные aberrации, робертсоновские транслокации.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Мамаева С. Е. Закономерности каріотипической эволюции клеток в культуре // Цитология.—1996.—36, № 8.—С. 787—814.
2. Mamaeva S. E. Karyotypic evolution of cells in culture: a new concept // *Int. Rev. Cytol.*—1998.—78.—Р. 1—40.
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. Яцишина А. П., Підпала О. В., Рубан Т. П., Тимошук О. В., Лукаш Л. Л. Цитоморфологічна характеристика нової клітинної лінії миші G1 // Цитология и генетика.—2006.—40, № 3.—С. 49—58.
5. 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.—Р. 613—616.
6. Плохинский Н. А. Алгоритмы биометрии / Под ред. акад. АН СССР Б. В. Гнеденко.—М.: Изд-во МГУ, 1980.—150 с.
7. Яковлева А. Н., Федорцева Р. Ф., Крылова Т. П., Фридлянская И. И., Шаембергер И. И. Цитогенетические изменения эксплантированной рабдомиосаркомы мыши при длительном культивировании // Цитология.—1988.—30, № 6.—С. 726—731.

8. Harvey D. M., Levine A. J. p53 alteration is a common event in the spontaneous immortalization of primary BALB/c murine embryo fibroblasts // *Genes and Develop.*—1991.—5.—P. 2375—2385.
9. Вагина И. М., Морозова Л. М., Ковалева О. А., Глазко Т. Т. Сравнительная характеристика генетической изменчивости у лабораторных мышей линий BALB/c и C57Bl/6j из разных популяций // *Биополімери і клітина.*—2004.—20, № 5.—С. 443—446.
10. Глазко Т. Т., Лавровский В. А., Кондрахин Ю. В. Фенотипическая и хромосомная изменчивость эмбриональных фибробластов мышей разных линий в процессе спонтанной неопластической эволюции // *Эксперим. онкология.*—1991.—13, № 4.—С. 29—35.
11. Зильбер Л. А., Ирлин И. С., Киселев Ф. Л. Эволюция вирусно-генетической теории возникновения опухолей.—М.: Наука, 1975.—344 с.
12. *Russian cell culture collection (RCCC): Catalogue / Eds G. P. Pinaev et al.*—St. Petersburg, Omsk, 1999.—204 p.
13. Глазко Г. В., Созинов А. А. Некоторые характеристики хромосомного уровня изменчивости у мышей // *Цитология и генетика.*—1997.—31, № 4.—С. 70—76.
14. Яцишина А. П., Підпала О. В., Кочубей Т. П., Лукаш Л. Л. Спонтанна каріотипічна еволюція клітин миші *in vitro* // *Фактори експерим. еволюції організмів.*—Київ: Аграрна наука, 2004.—С. 88—92.
15. Алов И. А. Цитофизиология и патология митоза.—М.: Медицина, 1972.—264 с.
16. Nakagawa S., Saburi S., Yamanouchi K., Tojo H., Tachi C. *In vitro* studies on PGC or PGC-like cells in cultured yolk sac cells and embryonic stem cells of the mouse // *Arch. Histol. Cytol.*—2000.—6.—P. 229—241.

УДК 576.5:576.316 + 575.224.2
Надійшла до редакції 29.05.06