

МНОГОПАРАМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ И КЛАСТЕР-АНАЛИЗ ПЕРЕВИВАЕМЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

© Ю. А. Магакян,¹ Е. М. Каралова, З. А. Каралян, Л. О. Аброян, Л. А. Акопян,
М. Г. Гаспарян, Н. Г. Джагацян, З. Б. Семерджян, З. Р. Тер-Погосян

Институт молекулярной биологии НАН РА, Ереван;

¹ *электронный адрес: tigmat@sci.am*

Методами сканирующей цитофотометрии, цитохимии и цитоморфометрии проведено многопараметрическое исследование клеток гепатокарциномы (HEp-G2), аденокарциномы толстого отдела кишечника (Caco-2), эмбриональной почки (HEK-293), нейробластомы (SH-SY5Y), рабдомиосаркомы (RD) и рака гортани (HEp-2), через 48, 72 и 96 ч после начала культивирования. Определяли значения плотности монослоя, активности пролиферации, число мертвых клеток, количество ДНК в ядрах и распределение клеток в популяциях по этому параметру, суммарную массу ДНК в ядрышках (околоядрышковым хроматине), число ядрышек в ядрах и распределение клеток в популяциях по этому параметру, объем и площадь поверхности ядра, суммарный объем и площадь поверхности ядрышек. Полученные данные использовали для древовидного кластер-анализа по корреляции Пирсона, в результате которого культуру SH-SY5Y выделили в отдельный кластер, а культуры Caco-2, HEp-G2, HEK-293, HEp-2 и RD расположились на древе другого кластера. Оказалось также, что наименее трансформированная культура нейробластомы (SH-SY5Y) не имеет родства с остальными культурами, проявляющими разную степень близости между собой. Близкими по всем параметрам оказались культуры HEK-293, HEp-2 и RD. Значимость параметров в формировании общего образа клеточных культур неодинакова. Наибольший «вес» имели параметры, характеризующие популяцию в целом: плотность монослоя, митотический коэффициент и число мертвых клеток; за ними следуют содержание ДНК в ядрах, суммарная площадь ядрышек, отношение содержания ДНК ядрышек к содержанию ДНК ядра и отношение суммарной площади ядрышек к площади ядра. Остальные параметры были не столь существенны.

Ключевые слова: культура клеток, ядрышки, ДНК, кластер-анализ.

Аутокластеризация — фундаментальное свойство популяций всех живых организмов, играющее огромную роль в формировании и сохранении их специфических характеристик в эволюции (Sneath, Sokal, 1973). Кластер-анализ перевиваемых культур, которому должно предшествовать накопление фактов, разносторонне характеризующих популяции, является наиболее обоснованным методом выявления закономерностей, скрывающихся в массе данных, полученных при исследовании (Соломон, 1980). Трансформированным культурам, как известно (Мамаева, 1984), свойственна анеуплоидия, что не исключает сохранения у некоторых из них потенциалов к дифференцировке. Клетки аденокарциномы, например, при длительном культивировании на полупроницаемых мембранах могут превращаться в энтероциты и формировать трехслойную структуру наподобие стенки кишечника (Mariadasson et al., 2000). Способности к дифференцировке проявляют клетки нейробластомы и некоторых других культур (Фридлянская, 1984). Вместе с тем сведения о количестве ДНК и числе ядрышек в ядрах клеток трансформированных культур ограничены, а ведь именно эти параметры имеют прямое отношение к вариативности числа хромосом и, по мнению некоторых авторов (Мамаев, Мамаева, 1992; Кунафина и др., 2005), могут служить показателями степени трансформированности

клеток. В связи с этим, предпринимая данное многопараметрическое исследование ряда перевиваемых линий человека, начало которому было положено нашими работами на клетках Caco-2 (Karalyan et al., 2004; Каралова и др., 2006), мы наряду с выявлением характерных черт их поведения в процессе культивирования и уровня фенотипических изменений (плейотропии) особое внимание уделили определению содержания ДНК и числа ядрышек в ядрах. При этом предполагалось, что наше исследование пополнит сведения о трансформированных культурах и расширит возможности их использования в качестве экспериментальных моделей.

Материал и методика

Объектами служили культуры клеток гепатокарциномы (HEp-G2), аденокарциномы толстого отдела кишечника (Caco-2), эмбриональной почки (HEK-293) и нейробластомы (SH-SY5Y), представленные д-ром Pascale Galea (Trophos, Марсель), а также рабдомиосаркомы (RD) и рака гортани (HEp-2), полученные из Института полиомиелита (Москва). Отметим, что некоторые цитогенетические сведения об этих культурах приводятся в ряде сообщений (Moore, 1955, 1958; McAlister, 1969; Graham, 1977;

Biedler, 1978; Knowles, 1980; Ross, 1983; Jumarie, Malo, 1991; Xie, 1996). Так, показано, что число хромосом в клетках культуры SH-SY5Y равно 47, HEp-G2 — 55, Caco-2 — 96, а для клеток HEK-293 характерна гипотриплоидия (Graham, 1977; Xie, 1996),

Клетки культивировали в пенициллиновых флаконах с покровными стеклами: HEp-2 и RD — в среде Eagle MEM с 10%-ной фетальной бычьей сывороткой (ФБС) в дозе $1 \cdot 10^5$ кл./мл, Caco-2 — в среде Eagle + 20 % ФБС ($2 \cdot 10^5$ кл./мл), HEp-G2 — в среде DMEM + 10 % ФБС ($1 \cdot 10^5$ кл./мл), SH-SY5Y — в смеси сред (1 : 1) Eagle DMEM и F₁₂ + 10 % ФБС ($1 \cdot 10^5$ кл./мл) и HEK-293 — в среде Eagle DMEM + 15 % ФБС ($1 \cdot 10^5$ кл./мл). Стекла извлекали через 48, 72 и 96 ч культивирования и фиксировали в 96%-ном этаноле. Для выявления ДНК препараты окрашивали по Фельгену в нашей модификации (Магакян, Каралова, 1989), для цитоморфометрии — гематоксилином по Майеру и эозином (Ромейс, 1953), для выявления хроматина и ядрышек — метиловым зеленым—пиронином (Kurnick, 1950). Измерения массы ДНК ($\gamma = 575$ нм) и цитоморфометрию производили на телевизионном сканирующем анализаторе изображений (увел. 100×1.30), созданном на базе микроскопа-фотометра SMP-05 (Ортон, ФРГ), по разработанной в нашей лаборатории (Ю. А. Магакян, Т. Ю. Магакян и А. Л. Капанцян) программе UPIAM-2000 (Universal Program of Image Analysis of Microobjects). Диплоидным эквивалентом служили значения массы ДНК в ядрах лимфоцитов человека (76 усл. ед.). Во всех случаях измеряли не менее 100 клеток. Вычисляли средние арифметические и средние взвешенные (Тейлор, 1985) следующих параметров: плотности монослоя (число клеток на 0.01 мм^2 поля зрения),

Таблица 1

Изменение плотности монослоя, митотической активности и числа мертвых клеток в процессе культивирования клеток различных линий ($\bar{x} \pm s_x$)

Клеточная культура	Сроки культивирования, ч	Число клеток на 0.01 мм^2 площади монослоя	Доля делящихся клеток (митозы), %	Доля мертвых клеток, %
SH-SY5Y	48	36.8 ± 0.9	1.90 ± 0.30	1.60 ± 0.50
	72	41.6 ± 1.2	1.20 ± 0.10	4.60 ± 0.20
	96	53.5 ± 1.6	0.70 ± 0.01	6.50 ± 0.70
HEp-G2	48	24.0 ± 1.8	2.80 ± 0.20	5.20 ± 0.30
	72	28.1 ± 2.1	1.20 ± 0.30	15.20 ± 2.20
	96	28.4 ± 2.1	1.40 ± 0.50	16.80 ± 1.50
Caco-2	48	10.1 ± 0.8	0.50 ± 0.05	1.00 ± 0.10
	72	24.6 ± 1.1	1.20 ± 0.07	1.60 ± 0.20
	96	38.2 ± 1.2	1.40 ± 0.08	2.50 ± 0.20
RD	48	12.5 ± 0.6	1.80 ± 0.02	5.10 ± 0.50
	72	12.9 ± 1.0	3.30 ± 0.02	6.20 ± 0.60
	96	14.8 ± 1.1	3.40 ± 0.03	6.50 ± 0.30
HEp-2	48	14.1 ± 0.3	4.70 ± 0.30	1.30 ± 0.06
	72	18.3 ± 0.4	3.30 ± 0.60	1.80 ± 0.06
	96	22.9 ± 0.5	2.90 ± 0.40	2.10 ± 0.07
HEK-293	48	21.9 ± 0.6	3.60 ± 0.40	3.80 ± 0.40
	72	23.4 ± 0.5	2.40 ± 0.40	5.50 ± 0.80
	96	23.6 ± 0.7	1.40 ± 0.10	10.80 ± 0.90

Таблица 2

Изменение параметров ядер и ядрышек в процессе культивирования клеток различных линий ($\bar{x} \pm s_x$)

Клеточная культура	Срок культивирования, ч	Ядра			Ядрышки		
		масса ДНК, усл. ед.	объем, мкм^3	полная поверхность, мкм^2	суммарная масса ДНК в ОЯХ, усл. ед.	суммарный объем, мкм^3	суммарная полная поверхность, мкм^2
SH-SY5Y	48	161.0 ± 4.7	234.8 ± 7.2	83.6 ± 2.1	14.7 ± 0.6	6.9 ± 0.6	4.6 ± 0.2
	72	133.0 ± 2.0	206.3 ± 5.5	73.6 ± 1.0	13.4 ± 0.7	4.3 ± 0.3	2.4 ± 0.2
	96	127.9 ± 2.5	198.3 ± 5.5	72.4 ± 1.4	10.0 ± 0.4	3.3 ± 0.2	1.4 ± 0.2
Caco-2	48	211.1 ± 8.9	359.8 ± 17.8	119.9 ± 3.6	14.9 ± 0.8	6.1 ± 0.5	7.2 ± 0.5
	72	203.7 ± 7.0	304.1 ± 10.2	106.7 ± 2.1	16.7 ± 1.1	6.3 ± 0.5	9.0 ± 0.6
	96	175.2 ± 4.9	226.6 ± 9.0	91.0 ± 2.4	19.2 ± 1.2	7.5 ± 0.6	11.0 ± 0.8
HEp-G2	48	207.5 ± 9.9	381.1 ± 16.8	116.2 ± 3.0	14.5 ± 0.9	5.5 ± 0.3	8.3 ± 0.5
	72	167.6 ± 9.8	381.9 ± 18.6	111.4 ± 3.0	16.4 ± 1.0	6.0 ± 0.4	8.6 ± 0.5
	96	149.0 ± 8.0	379.0 ± 30.5	102.0 ± 4.6	16.9 ± 1.4	8.4 ± 0.5	12.6 ± 1.0
RD	48	146.2 ± 7.1	345.9 ± 10.8	121.7 ± 2.4	15.1 ± 0.8	9.2 ± 0.5	10.4 ± 0.6
	72	167.5 ± 6.6	362.7 ± 12.6	127.4 ± 3.1	20.3 ± 1.1	9.9 ± 0.6	17.2 ± 0.7
	96	172.3 ± 5.8	372.9 ± 12.1	128.1 ± 4.6	21.7 ± 2.1	11.5 ± 0.7	17.9 ± 0.9
HEp-2	48	164.9 ± 5.8	355.8 ± 29.8	118.6 ± 1.8	21.0 ± 1.2	13.9 ± 0.6	17.0 ± 0.8
	72	139.3 ± 4.6	349.7 ± 10.8	116.2 ± 2.4	15.9 ± 0.4	11.1 ± 0.4	15.2 ± 0.5
	96	123.0 ± 2.5	329.8 ± 11.8	103.2 ± 2.2	14.3 ± 0.8	7.9 ± 0.4	9.6 ± 0.5
HEK-293	48	222.0 ± 8.1	548.3 ± 34.7	126.1 ± 3.2	23.5 ± 1.3	11.9 ± 0.6	16.1 ± 0.9
	72	164.5 ± 6.3	429.7 ± 17.2	114.0 ± 3.6	19.8 ± 0.9	7.2 ± 0.4	7.7 ± 0.5
	96	145.1 ± 5.9	451.7 ± 15.6	117.4 ± 3.1	16.5 ± 1.0	5.9 ± 0.4	7.0 ± 0.4

доли мертвых клеток (%), активности пролиферации (число митозов, %), количества ядрышек в ядрах, распределения клеток по числу ядрышек (%), массы ДНК (усл. ед.) в ядре, объема ядра ($V = 4/3\pi R^3$, мкм³), площади поверхности ядра ($P = 4\pi R^2$, мкм²), суммарного объема всех ядрышек в ядре, полной площади поверхности ядрышек, суммарной массы ДНК в ядрышках (околоядрышковый хроматин, ОЯХ). Для классификации культур применили вариант древовидного кластер-анализа по корреляции Пирсона (Дубнов, 2004), в программу которого были введены значения всех перечисленных параметров. Значимость («вес») каждого из параметров в кластере определяли по программе K-means (Дубнов, 2004). Для статистической обработки полученных данных использовали *t*-критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Во всех культурах монослой формировался к 48 ч культивирования, но плотность его была различной (табл. 1). Наибольшей плотностью обладал монослой культуры SH-SY5Y, а самой низкой — культуры Сасо-2. Несмотря на то что доза вносимых клеток Сасо-2 при посеве была в 2 раза больше, чем в культуре SH-SY5Y, интенсивность роста монослоя Сасо-2 была намного выше, и к 96 ч его плотность возросла почти в 4 раза, а в культуре SH-SY5Y — всего в 1.5 раза. Динамика роста плотности монослоя в значительной степени определяется активностью пролиферации клеток этих культур. В культуре SH-SY5Y к 96 ч число делящихся клеток сократилось в 1.5 раза, в то время как в культуре Сасо-2, напротив, повысилось втрое. Сасо-2 отличается от всех других культур, в которых активность размножения по мере роста понижается (табл. 1). Изменения в значениях этих параметров тесно связаны с гибелью клеток число которых по мере культивирования, как и следовало ожидать растет, но и этот процесс идет с неодинаковой скоростью в разных культурах. В культуре SH-SY5Y количество мертвых клеток по сравнению с другими невелико, но темп их накопления достаточно высок — за 3 сут их число возрастает в 4 раза. В культуре Сасо-2 мертвых клеток меньше всего, и можно полагать, что это объясняется относительно невысокой плотностью монослоя. Другие культуры по этим параметрам занимают промежуточное положение (табл. 1).

В табл. 2 представлены значения параметров, отражающих динамику функционирования ядер и ядрышек в процессе культивирования. Обращают на себя внимание высокие значения среднего содержания ДНК в ядрах клеток всех культур, превышающие значения 2с. Наиболее высокое содержание ДНК в ядрах (4с—Н4с) на 48 ч культивирования отмечено в клетках НЕК-293, Сасо-2 и НЕР-G2. В остальных культурах в это время наблюдается максимум двукратное превышение содержания ДНК над 2с. Во всех культурах к 96 ч количество ДНК в ядрах снижалось примерно до Н2с—4с. Мы полагаем, что описанная динамика содержания ДНК связана с кинетикой пролиферативной активности и скоростью прохождения клетками последовательных фаз клеточного цикла.

В табл. 1 показано, что высокая вначале митотическая активность клеток в дальнейшем в большинстве культур понижается более чем в 2 раза. Параллельно с этим уменьшается и среднее содержание ДНК в ядрах (табл. 2). При активной пролиферации клетки, не задерживаясь в

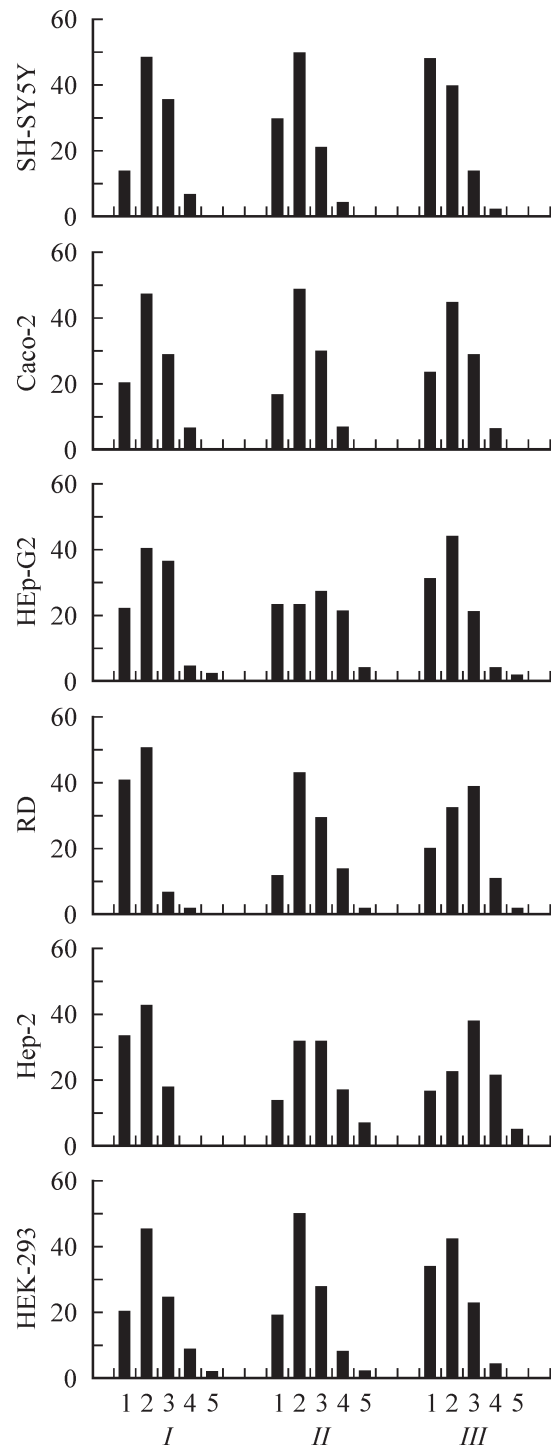


Рис. 1. Распределение клеток различных линий по количеству ядрышек в ядрах в процессе культивирования.

I—III — сроки культивирования 48, 72 и 96 ч соответственно. По горизонтали — количество ядрышек, по вертикали — доля клеток, %.

фазе G₁, переходят в фазы S и G₂ (Никольский, 1984). В диплоидных популяциях количество ДНК в ядрах последних варьирует от Н2с до 4с, а в исследуемых нами, в основном гипердиплоидных и околотриплоидных культурах, содержание ДНК в клетках, находящихся в фазах S и G₂, соответствует Н4с—8с. Сокращение числа клеток, находящихся в фазах S и G₂, в связи со снижением пролиферативной активности и возрастание по той же причине

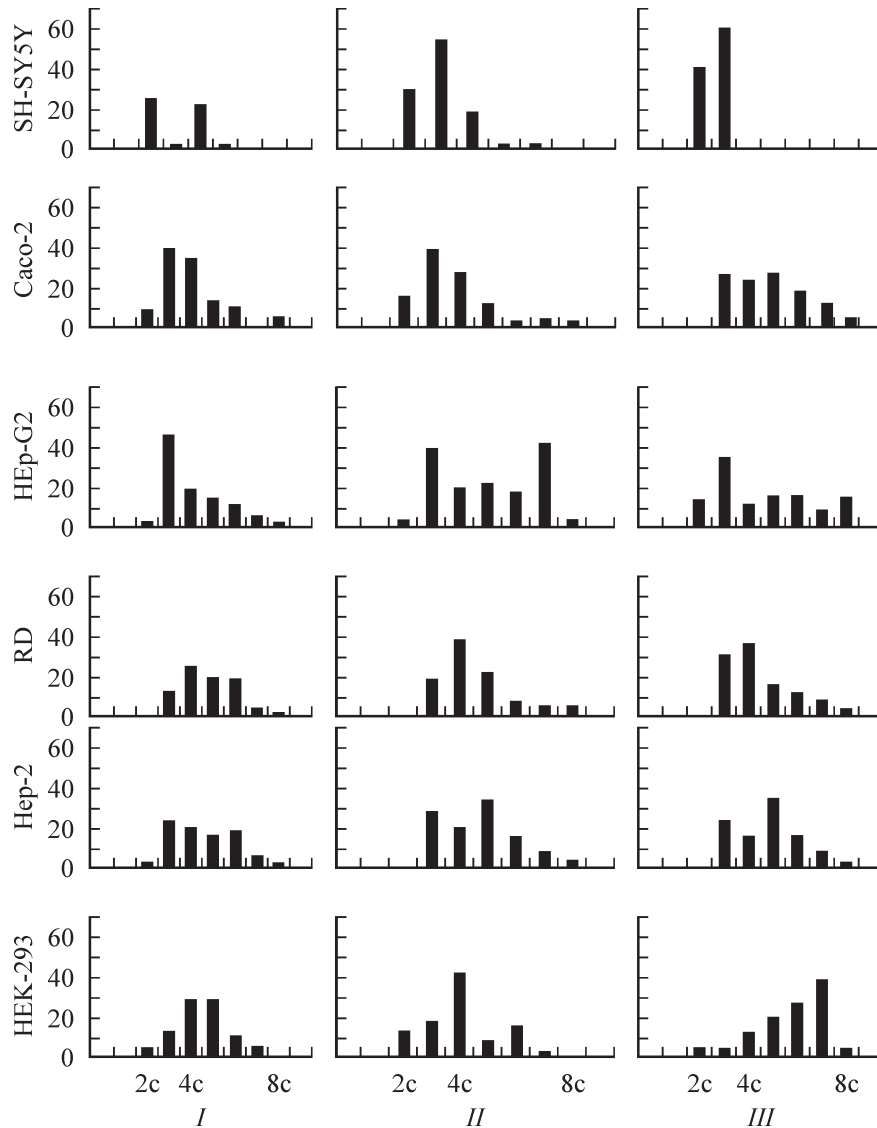


Рис. 2. Распределение клеток различных линий по плоидности в процессе культивирования. Обозначения те же, что и на рис. 1.

числа клеток, задерживающихся в фазе G_1 или даже в G_0 , приводят к понижению среднего содержания ДНК в ядрах (в нашем случае до 4с). В эту схему не вписываются клетки Caco-2, пролиферативная активность которых, как указывалось, возрастает при одновременном, правда незначительном, снижении среднего содержания ДНК в ядрах (ср. табл. 1 и 2). Мы полагаем, что такое противоречие можно объяснить пропорциональным распределением клеток этой культуры по фазам клеточного цикла и относительно большей продолжительностью пребывания клеток этой культуры в фазе G_1 . Может возникнуть вопрос о несоответствии значений среднего содержания ДНК в ядрах классам плоидности, но при высокой вариабельности числа хромосом в трансформированных клетках (Никольский, 1984) нелогично ожидать четкого соответствия количества ДНК в ядрах грациям 2 : 4 : 8 ... с_n. Это подтверждается и нашими цитофотометрическими данными о распределении клеток в популяциях по содержанию ДНК в ядрах (рис. 1). Очевидны большой разброс от 2с до 8с ДНК, наличие промежуточных значений этого параметра и отсутствие четкого ранжирования по классам

плоидности. Правда, в культуре SH-SY5Y через 48 ч культивирования наблюдается разделение клеток в популяции на 2с- и 4с-элементы, но затем наряду с 2с- появляются 4с- и исчезают 8с-клетки. Вообще 2с-клетки встречаются реже других, а в культуре RD они вообще отсутствуют. С другой стороны, октаплоидные клетки обнаруживаются во всех культурах, за исключением

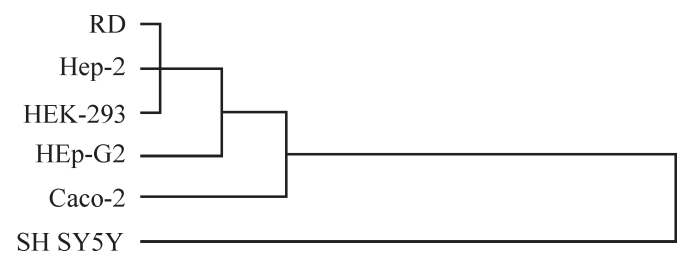


Рис. 3. Дендрограмма иерархического кластер-анализа культур клеток по корреляции Пирсона с использованием значений всех параметров.

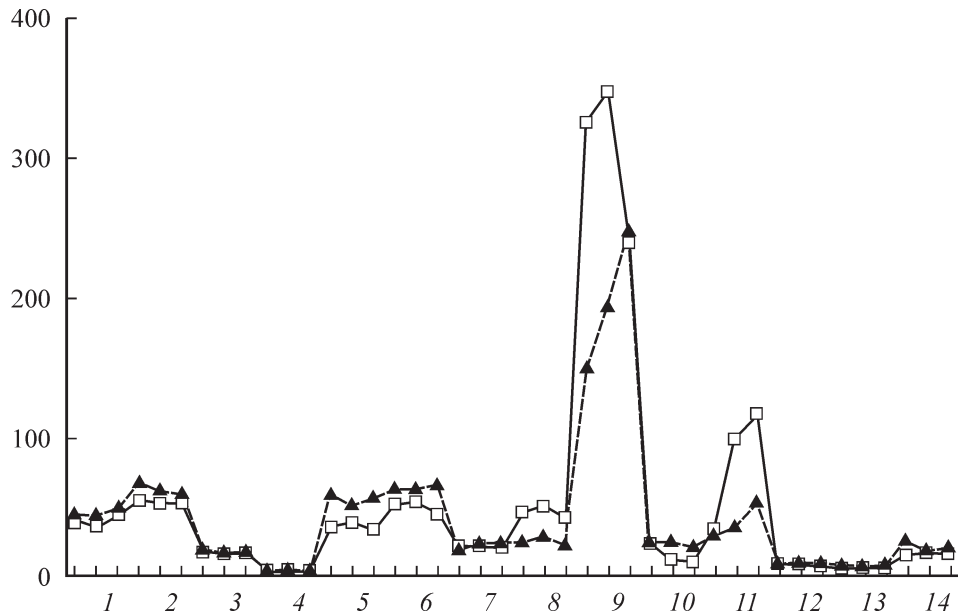


Рис. 4. Различия между кластерами по различным параметрам.

По вертикали — первичные значения для каждой кластерной единицы; по горизонтали: 1 — масса ДНК в ядре, 2 — площадь ядра, 3 — объем ядра, 4 — суммарная масса ДНК ядрышек в ядре (ОЯХ), 5 — суммарная площадь ядрышек, 6 — суммарный объем ядрышек, 7 — число ядрышек в ядре, 8 — количество эуплоидных клеток в популяции, 9 — плотность монослоя, 10 — митотический коэффициент, 11 — доля мертвых клеток, 12 — отношение суммарной массы ДНК ОЯХ ядрышек к массе ДНК ядра, 13 — отношение суммарной площади ядрышек к площади ядра, 14 — масса ДНК в ОЯХ ядрышка. Для каждого параметра указаны сроки культивирования — 48, 72 и 96 ч соответственно. Сплошная линия с квадратиками — кластер культуры SH-SY5Y, штриховая линия с треугольниками — кластер культур Нер-G2, Сасо-2, RD, Нер-2 и НЕК-293.

SH-SY5Y. В остальных культурах представлен весь «спектр», но пик приходится на 4с- и Н4с-клетки. Появление клеток с промежуточными значениями содержания ДНК в ядрах может быть связано с пребыванием их в S-фазе или развитием нуклеолиза, о чем свидетельствует большая доля (%) в исследуемых культурах мертвых клеток. Динамика значений объема и полной поверхности ядер согласуется с изменениями массы ДНК (табл. 2).

Одним из показателей степени активности клеток является наличие ядрышек в ядрах. В клетках исследуемых культур в среднем на 1 ядро приходится 2 ядрышка, но в процессе культивирования выявляются различия между ними в распределении клеток по числу ядрышек (рис. 2). Во всех культурах обнаруживаются клетки с 3 ядрышками в ядрах, а в культурах RD и Нер-2 к 96 ч такие клетки не только преобладают, но в них появляются клетки даже с 5 ядрышками. Показателем активности самих ядрышек могут служить значения суммарной массы ДНК в ОЯХ и полной поверхности ядрышек. Эти параметры изменяются в процессе культивирования, а между культурами выявляются различия.

Значения всех исследованных параметров, характеризующих поведение в процессе культивирования популяций и клеток, были использованы для кластер-анализа, результаты которого оказались несколько неожиданными. Выяснилось что клетки SH-SY5Y образуют отдельный кластер, а клетки Сасо-2, Нер-G2, НЕК-293, Нер-2 и RD объединены в другом кластере. Близкими по всем параметрам оказались культуры НЕК-293, Нер-2 и RD (рис. 3). Сравнение кластеров (рис. 4) показало, что значимость различных параметров в формировании общего образа клеточных культур неодинакова. Наибольший вклад в этот образ вносят параметры, характеризующие популяцию в целом, а именно плотность монослоя, мито-

тический коэффициент и число мертвых клеток, за ними следуют такие параметры, как содержание ДНК в ядрах, суммарная площадь ядрышек, отношение содержания ДНК ядрышек к содержанию ДНК ядра и отношение суммарной площади ядрышек к площади ядра. Остальные параметры имеют не столь существенное значение. Результаты кластер-анализа позволили заключить, что наименее трансформированной культурой является SH-SY5Y, о чем в определенной степени свидетельствуют наименьший разброс значений содержания ДНК в ядрах клеток этой культуры (рис. 1) и сохранение потенций к дифференцировке, а наиболее трансформированной — культура RD. Напомним, что, как было указано выше, показателями степени трансформированности клеток могут служить количество ДНК и число ядрышек в ядрах клеток (Мамаев, Мамаева, 1992; Кунафина и др., 2005), а также сохранение потенций к дифференцировке, которые, согласно литературным данным (Фридлянская, 1984; Mariadasson et al., 2000), проявляют клетки культур SH-SY5Y и Сасо-2.

Список литературы

- Дубнов П. Ю. 2004. Обработка статистической информации с помощью SPSS. М.: АСТ NT Press. 220 с.
- Каралова Е. М., Аброян Л. О., Акопян Л. А., Гаспарян М. Г., Каралян З. А., Джагацян Н. Г., Тер-Погосян З. Р., Камалян Л. А., Магакян Ю. А. 2006. Клетки аденокарциномы толстого отдела кишечника человека Сасо-2 в процессе культивирования. Цитология. 48 (4) : 315—319.
- Кунафина Э. Р., Чаплина М. В., Филясова Е. Н., Гибина Н. В., Ходарович Э. М., Ларионова О. А., Зацепина О. В. 2005. Активация ядрышковых организаторов при культивировании мышинных эмбриональных стволовых клеток линии RL in vitro. Онтогенез. 36 (2) : 102—109.
- Магакян Ю. А., Каралова Е. М. 1989. Цитофотометрия ДНК. Ереван: Изд-во АН АрмССР. 204 с.

- Мамаев Н. Н., Мамаева С. Е. 1992. Структура и функция ядрышкообразующих районов хромосом: молекулярные, цитологические и клинические аспекты. Цитология. 34 (10) : 3—25.
- Мамаева С. Е. 1984. Цитогенетика клеток в культуре. В кн.: Биология клетки в культуре. Л.: Наука. 195—234.
- Никольский Н. Н. 1984. Пролиферация клеток в культуре. В кн.: Биология клетки в культуре. Л.: Наука. 10—49.
- Ромейс Б. 1953. Микроскопическая техника. М.: Изд-во иностр. лит-ры. 718 с.
- Соломон Г. 1980. Зависящие от данных методы кластер анализа. В кн.: Классификация и кластер. М.: Мир. 129—147.
- Тейлор Дж. 1985. Введение в теорию ошибок. М.: Мир. 320 с.
- Фридлянская И. И. 1984. Постоянные клеточные линии, дифференцирующиеся *in vitro*. В кн.: Биология клетки в культуре. Л.: Наука. 50—100.
- Biedler J. L. 1978. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res.* 38 : 3751—3757.
- Graham R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36 : 59—72.
- Jumarie C., Malo C. 1991. Caco-2 cells cultured in serum-free medium as a model for the study of enterocytic differentiation *in vitro*. *J. Cell. Physiol.* 149 : 24—33.
- Karalyan Z. A., Jaghacpanyan N. G., Gasparyan M. N., Abroyan L. O., Hakobyan L. A., Ter-Pogossyan Z. R., Magakian Yu. H., Kamalyan L. A., Karalova E. M. 2004. Morphometry of nuclear and nukleolar structures in CaCo-2 cell line. *Cell Biol. Intern.* 28 : 249—253.
- Knowles B. B. 1980. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science.* 209 : 497—499.
- Kurnick N. B. 1950. Metylgreen—pyronin. I. Basis of selective staining of nucleic acids. *J. Gen. Physiol.* 33 : 243—264.
- Mariadasson J. M., Richard K. L., Barkla D. H., Augenthaler L. H., Gibson P. R. 2000. Divergent phenotypic patterns and commitment to apoptosis of CaCo-2 cells during spontaneous and butyrate-induced differentiation. *J. Cell. Physiol.* 183 : 347—354.
- McAllister R. M. 1969. Cultivation *in vitro* of cells derived from a human rhabdomyosarcoma. *Cancer.* 24 : 520—526.
- Moore A. E. 1955. Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. *Cancer Res.* 15 : 598—602.
- Moore A. E. 1958. Tumorigenic activity of cultures. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 76 : 497—505.
- Ross R. A. 1983. Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J. Nat. Cancer Inst.* 71 : 741—749.
- Sneath P. H. A., Sokal R. R. 1973. Numerical taxonomy. San Francisco. 573 p.
- Xie Q. W. 1996. Complementation analysis of mutants of nitric oxide synthase reveals that the active site requires two hemes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 93 : 4891—4896.

Поступила 24 VI 2008

MULTIPARAMETRIC STUDY AND CLUSTER-ANALYSIS OF THE TRANSPLANTABLE CULTURES OF HUMAN CELLS

Yu. A. Magakian,¹ E. M. Karalova, Z. A. Karalyan, L. O. Abroyan, L. A. Hakobyan, M. H. Gasparyan, N. G. Jaghacpanyan, Z. B. Semerjyan, Z. R. Ter-Pogossyan

Institute of Molecular Biology NAS RA, Yerevan;

¹ e-mail: tigmag@sci.am

The cells of hepatocarcinoma (HEp-G2), adenocarcinoma of large intestine (Caco-2), embryonal kidney (HEK-293), neuroblastoma (SH-SY5Y), rhabdomyosarcoma (RD), and larynx cancer (Hep-2) were studied by the methods of scanning cytophotometry, cytochemistry and cytomorphometry during 96 h of cultivation. The density of monolayers, proliferation activity, the number of dead cells, DNA content in the nuclei and distribution of the cells in the population by this parameter, total DNA content in the nucleoli (circumnucleolar chromatin), the number of nucleoli in the nuclei, distribution of cells by their number, the volume and area of the nucleus surface, total volume and area of the nucleoli surface were determined. The data obtained were used in the treelike cluster analysis of the cultures by Pierson correlation. As a result, the SH-SY5Y culture was put in a separate cluster, while Caco-2, HEp-G2, HEK-293, Hep-2 and RD cultures were placed in the tree of another cluster. The least transformed culture of neuroblastoma (SH-SY5Y) had no relationship with other cultures, which showed various rate of similarity. The cultured HEK-293, Hep-2 and RD appeared to be close to each other by all parameters. The parameters studied are of different significance for the formation of general pattern of the cell cultures. The greatest «weight» is carried by the parameters, which characterize the population as whole: the density of the monolayer, mitotic coefficient and the number of dead cells. They are followed by the content of DNA in the nuclei, the total area of the nucleoli surface, and ratios of DNA content in the nucleoli to DNA content in the nucleus and of total surface of the nucleoli to the surface of the nuclei. Other parameters are not so significant.

Key words: cell culture, nuclei, nucleoli, DNA, cluster-analysis.