

АНАЛИЗ ГЕТЕРОГЕННОСТИ КЕРАТИНОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ ФИБРОНЕКТИНОМ, КОЛЛАГЕНАМИ I И IV ТИПОВ

© О. Г. Спичкина,¹ Г. П. Пинаев, Ю. П. Петров

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

¹ электронный адрес: olga_spichkina@mail.ru

Основываясь на естественном средстве кератиноцитов кожи к белкам внеклеточного матрикса, мы предприняли попытку обнаружения субпопуляций в зависимости от времени адгезии этих клеток на подложках из коллагенов I и IV типов и на фибронектине. После 10-, 20- и 30-минутного отбора кератиноциты культивировали в течение 1 сут. При тестировании измеряли площадь проекции клеток на подложку и коэффициент распластывания. Через 1 сут обнаружены статистически достоверные морфологические различия клеток в зависимости от субстрата. Размер клеток, растущих на коллагене I типа, вдвое превосходил размер клеток, культивируемых на коллагене IV типа или фибронектине. Независимо от субстрата до 60—65 % клеток имели округлую форму. Коллагены выявляли гетерогенность кератиноцитов как в контроле, так и при отборе по времени адгезии, в то время как на фибронектине клетки вели себя как гомогенная популяция. Предполагается, что коллагены в отличие от фибронектина способствуют стабилизации каких-то физиологических состояний кератиноцитов, в целом отражая взаимодействие их с белками ВКМ в условиях *in vivo*.

Ключевые слова: адгезия, гетерогенность клеточной популяции, кератиноциты человека, коллаген, фибронектин.

Принятые сокращения: ВКМ — внеклеточный матрикс, ЭДТА — этилендиаминотетраацетат, A — Агеа (площадь проекции клетки на подложку), P — периметр, Rp/Ra — коэффициент распластанности.

В настоящее время исследование биологии стволовых клеток можно считать одним из приоритетных направлений для создания фундамента заместительной клеточной терапии (Hollands, 1997; Gurdon, 1999; Doss et al., 2004; Keller, 2005; Taupin et al., 2006; Turnpenny, 2006). В рамках этого направления заметную долю составляют работы по изучению клеток кожи, в частности базальных кератиноцитов (Potten, Vooth, 2002; Alonso, Fuchs, 2003; Aberdam, 2004). Принято считать, что эти клетки состоят как минимум из трех типов — стволовых, транзиторных и дифференцирующихся клеток (Rheinwald, Green, 1975; Barrandon, Green, 1987; Alonso, Fuchs, 2003). Фракционирование кератиноцитов на отдельные субпопуляции — весьма трудная методическая задача. Для ее решения важно иметь достаточное количество данных о параметрах, по которым имеются различия между теми или иными клеточными субпопуляциями. Мы полагаем, что гетерогенность базальных кератиноцитов должна выявляться при взаимодействии с белками, к которым у этих клеток имеется естественное средство. К ним, в частности, относятся такие мажорные белки внеклеточного матрикса (ВКМ) и базальной мембраны, как фибронектин и коллагены.

Известно, что синтез белков ВКМ начинается уже через 30 мин после посева культивируемых клеток (Sobel, Rosenberg, 1983). По этой причине для исследования влияния различных субстратов на поведение культивируемых клеток используют именно ранние сроки после посева.

Считается, что на более поздних сроках синтез собственных белков внеклеточного матрикса нивелирует эффект субстрата на поведение клеток.

Задача настоящей работы — проверить, влияют ли свойства субстрата на морфологические параметры культивируемых кератиноцитов через 1 сут после посева. Из субстратов были выбраны коллагены I и IV типов и фибронектин. По нашим данным, эти белки усиливают адгезивные свойства кератиноцитов при культивировании (Спичкина и др., 2006). В задачу работы не входило исследование отдельных клеток. Изучали клеточную популяцию в целом, используя для тестирования в первую очередь такой интегральный параметр, как A (Агеа — площадь проекции клетки на подложку).

Материал и методика

Выделение кератиноцитов. Первичную культуру кератиноцитов получали из кожи здоровых взрослых доноров по методу Рейнвальда (Rheinwald, 1980), модифицированному Юдинцевой с сотрудниками (1999). В качестве источника эпидермальных клеток использовали фрагменты кожи лица, полученные при косметологических операциях. Их промывали раствором PBS, не содержащим ионов кальция и магния, и отделяли подкожную клетчатку. Кожу нарезали на небольшие кусочки размером приблизительно 5×10 мм и в течение ночи ин-

кубировали в растворе PBS, содержащем 0.5 % диспазы II (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Германия) и 0.2 % коллагеназы краба (Биолот, Россия), при 4 °С. После этого механически отделяли эпидермис от дермы вдоль линии базальной мембраны. Для получения суспензии клеток эпидермис помещали в раствор, содержащий 0.125 % трипсина (Биолот, Россия) и 0.02 % ЭДТА (Биолот, Россия), на 10 мин при 37 °С. Действие фермента ингибировали добавлением сыворотки эмбрионов коров (NuClone, Франция) до 5 % от объема суспензии. Затем клеточную суспензию интенсивно пипетировали и фильтровали через нейлоновую сетку. Полученную суспензию клеток осаждали при 1000 об/мин в течение 5 мин, удаляли супернатант, затем осадок ресуспендировали в смеси сред DMEM и F12 (3 : 1; ICN, Франция).

Субстраты. В качестве субстратов для экспериментов использовали коллагены I и IV типов и фибронектин. Коллаген I типа был получен из сухожилий крысиных хвостов, коллаген IV типа — из плаценты человека (коллагены были любезно предоставлены Л. В. Кухаревой, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Фибронектин был выделен из плазмы крови человека и любезно предоставлен И. В. Воронкиной (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). На дно культуральных чашек наносили раствор белка в концентрации 10 мкг/мл и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С. Перед нанесением суспензии клеток чашки трижды промывали PBS.

Схема посева кератиноцитов на субстраты. Для исследования адгезивных свойств клеток использовали следующую процедуру. Свежевыделенные кератиноциты инкубировали в течение 10 мин при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂ на одном из субстратов в среде DMEM/F12 (3 : 1) без добавления сыворотки. Клетки, не прикрепившиеся за это время, переносили в другую чашку с тем же субстратом и инкубировали 20 мин. Далее опять не прикрепившиеся за это время клетки пересаживали и через 30 мин после этого времени неприкрепившиеся клетки удаляли. Отобранные таким образом клетки (три варианта адгезии по времени — 10, 20 и 30 мин) культивировали в течение 1 сут при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. В качестве контроля использовали те же кератиноциты, но без отбора по времени адгезии к соответствующему субстрату. Во всех вариантах 5 мл клеточной суспензии наносили на чашку диаметром 5 см (10⁶ кл./мл).

После окончания культивирования удаляли среду, клетки промывали раствором PBS и исследовали с помощью светового микроскопа без окрашивания. Для получения изображения клеток использовали микроскоп Биолам II-2 (ЛОМО, Россия) с фотонасадкой Canon Power Shot A95 (Canon, Япония). Использовали объектив 20×. Формат изображения 2592 × 1944 пикселя.

Анализ изображений клеток. Измерение параметра A выполняли, используя программу WCIF ImageJ 1.37i (National Institute of Health, Maryland, США). Поскольку все изображения клеток получены при равных условиях, значения A , выраженные в пикселях, не переводили в традиционные единицы измерения. Аналитическую обработку полученных данных проводили с помощью Microsoft Excel 2003 и Origin 6.1. О степени распластывания клеток судили по коэффициенту распластности (Rp/Ra), предложенному нами ранее (Kuzminykh, Petrov, 2004; Petrov et al., 2007). Он равен отношению радиусов, вычисленных по известным периметру и площади клеток A . Если форма клетки приближается к правильной форме круга, то этот коэффициент стремится к единице.

Чем больше клетка распластана (полигональная, вытянутая или звездчатая), тем выше этот коэффициент.

На каждую «точку» использовали выборку из 1000—2000 клеток. Вычисление теоретических кривых распределения, значения которых с наибольшей вероятностью соответствуют экспериментальным значениям, выполняли исходя из предположения о том, что вариации параметра A носят случайный характер и имеют нормальное распределение.

Результаты

На рис. 1 представлена типичная картина препарата базальных кератиноцитов, используемая для компьютерного анализа. Видно, что наряду с округлыми имеются полигональные клетки с различной степенью распластывания.

Прежде чем представить детальные данные о составе популяций кератиноцитов через 1 сут после культивирования, обратимся к диаграмме, отражающей средний размер A этих клеток, посеянных на разные субстраты (рис. 2). Видно, что размер клеток, растущих на коллагене I типа, вдвое превосходит размер тех же клеток, но культивируемых на коллагене IV типа или фибронектине. Различий по средней величине A между клетками на фибронектине и коллагене IV типа не выявлено. Несмотря на то что средние значения уже говорят о различиях одних и тех же клеток, но взаимодействующих с разными субстратами, они не отражают степени гетерогенности данных популяций кератиноцитов. Для этого лучше использовать гистограммы распределения клеток в зависимости от их размера. Однако предварительно обратимся к данным, представленным на рис. 3.

Эти данные дают общее представление о популяции клеток, растущих на разных субстратах, и демонстрируют зависимость A кератиноцитов от степени их распластывания (Rp/Ra). Из них также следует, что большинство кератиноцитов независимо от субстрата имеют округлую форму с коэффициентом распластывания не выше 1.05. Такие клетки, имеющие Rp/Ra не выше 1.05, считали округлыми («круглые клетки»), поскольку при измерении клеток получить идеальную форму круга практически невозможно. Меньшая часть клеток в той или иной степени распласта-

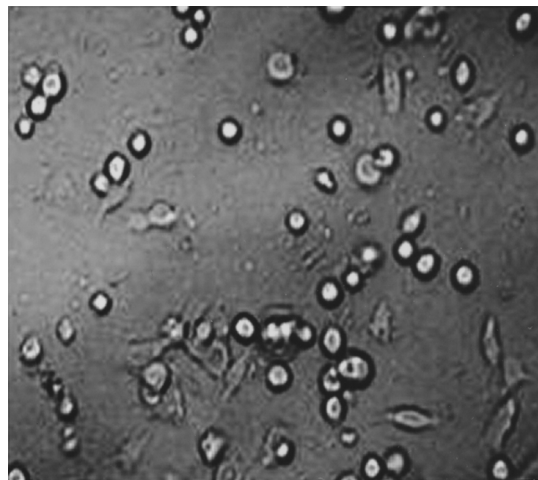


Рис. 1. Типичный фрагмент препарата базальных кератиноцитов, иллюстрирующий гетерогенность клеточной популяции.

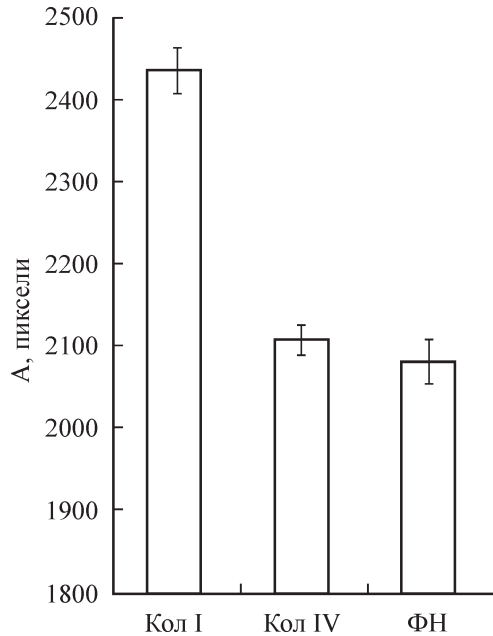


Рис. 2. Средний размер (A) кератиноцитов через 1 сут после посева на разные субстраты: коллагены I и IV типов (Кол I и Кол IV соответственно) и фибронектин (ФН).

на и имеет Rp/Ra выше 1.10 («некруглые клетки»). При этом можно отметить, что некруглые клетки во всех трех случаях сосредоточены приблизительно вблизи одной и той же величины $\ln A$, равной 8.

Данные рис. 3 хорошо демонстрируют качественный состав кератиноцитов, показывая, что основная масса клеток сосредоточена в кластере, соответствующем круглым клеткам. Однако количественную характеристику гетерогенности кератиноцитов дают гистограммы, представленные на рис. 4—6. Особенностью этого анализа является то, что измерение A проводили не только для кератиноцитов всей популяции, но и для клеток, предварительно отселектированных по степени адгезии. Гистограммы распределения этих клеток в зависимости от величины параметра A (I) представлены на рис. 4—6. Принимая во внимание комментарии, сделанные для рис. 2 относительно округлости, мы из общей выборки каждого варианта отобрали круглые ($Rp/Ra < 1.05$) и некруглые ($Rp/Ra > 1.10$) клетки. Эти данные представлены в виде гистограмм 2 и 3 на рис. 4—6. Гистограммы распределения по параметру A для клеток контрольных популяций (рис. 4—6, a, I) в целом соответствуют данным диаграммы на рис. 2. Кривые для клеток на коллагене IV и фибронектине имеют не только внешнее сходство, но и приблизительно одно и то же значение A , соответствующие максимальной частоте. Гистограмма распределения клеток в зависимости от величины A для клеток, растущих на коллагене I, заметно сдвинута вправо, к большим значениям, но, что гораздо важнее, она указывает на явную гетерогенность популяции — распределение имеет отчетливую асимметрию.

Интересно, что в целом на состав популяции клеток, посеянных на фибронектин, практически не оказывает никакого влияния отбор клеток по времени прикрепления (рис. 4, $b, I, в, I, г, I$). Эти гистограммы имеют больше сходства, чем различий. Однако иная картина наблюдается в этом случае для кератиноцитов на коллагене IV, ко-

торая в большей степени имеет сходство не с фибронектином, а с коллагеном I типа. Клетки, прикрепившиеся к коллагену I в первые 10 мин, через 1 сут обнаруживают большую гетерогенность, чем в контроле. При этом заметно, что в этой фракции имеется значительная доля крупных клеток. Популяция клеток на коллагене IV, соответствующая этому же промежутку времени, имеет более отчетливое разделение на субпопуляции, одновременно обнаруживается, что размер клеток этой фракции в целом меньше, чем в контроле.

С увеличением времени адгезии число относительно более крупных клеток растет для кератиноцитов, посеянных на коллагене IV, но падает при использовании в качестве субстрата коллагена I типа. Визуально имеется очень большое сходство гистограмм $b, 2$ на рис. 5 и 6. Тем не менее создается впечатление, что перераспределение состава популяций для клеток на коллагене IV происходит быстрее, чем на коллагене I. Иными словами, наблюдается сходство кривых $в, 1$ на рис. 5 (20 мин) и $б, 1$ на рис. 6 (10 мин) и кривых $г, 1$ на рис. 5 (30 мин) и $в, 1$ на рис. 6 (20 мин).

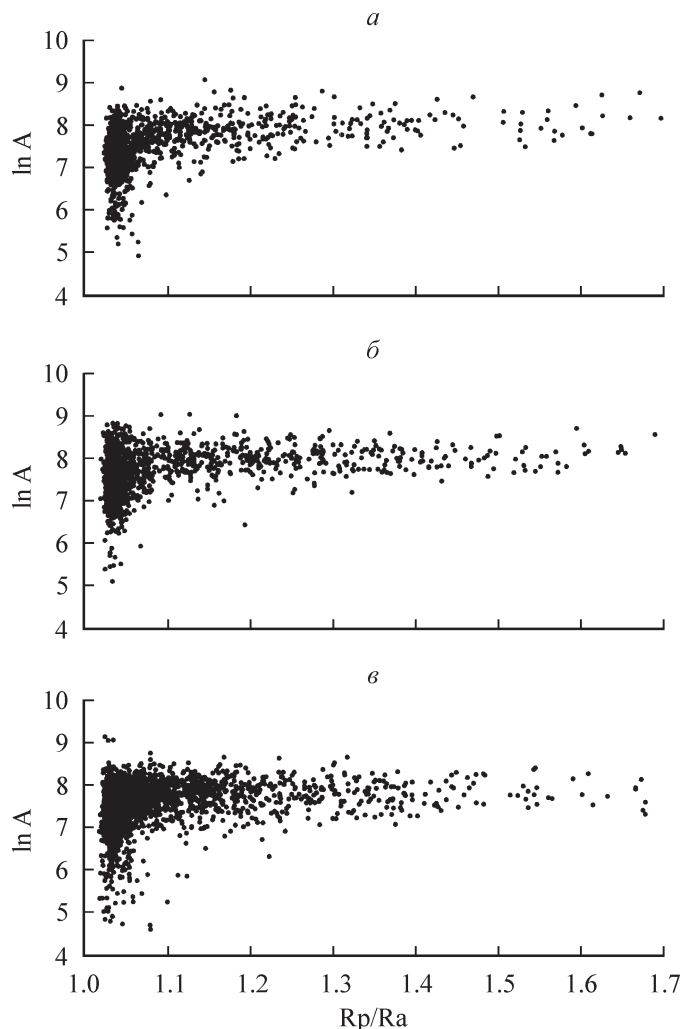


Рис. 3. Сравнение популяций кератиноцитов, культивируемых на разных субстратах, через 1 сут после посева.

a — $в$ — соответственно фибронектин, коллаген I и IV типов. Каждая точка соответствует отдельной клетке с соответствующими значениями A и коэффициента распластанности Rp/Ra .

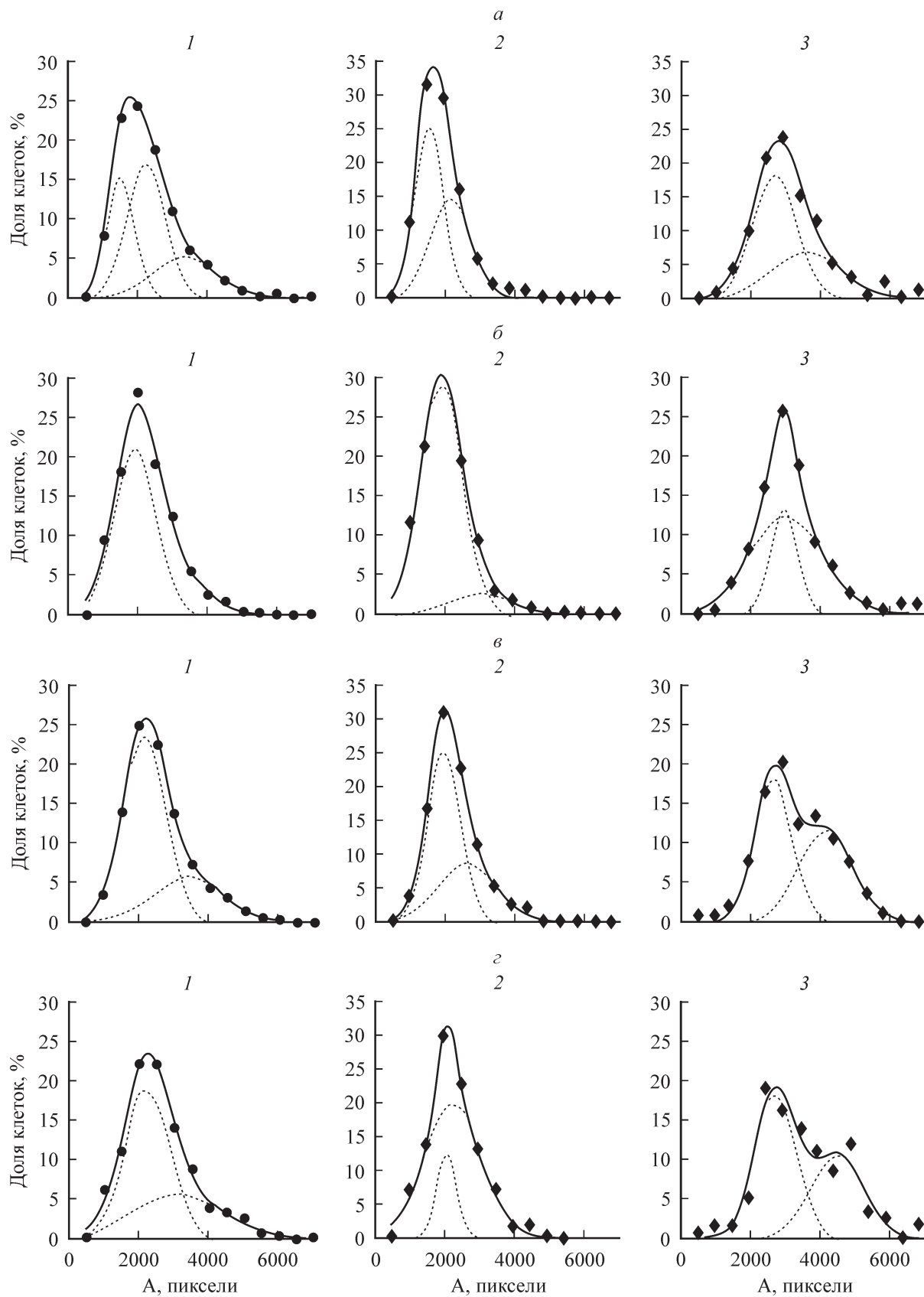


Рис. 4. Распределение клеток по величине A через 1 сут после посева на фибронектин.

Точки — экспериментальные значения A ; сплошная линия — суммарная теоретическая кривая, полученная по опытным значениям; штриховые линии — кривые, отражающие распределение клеток по отдельным субпопуляциям. a — контроль; $б$ — $з$ — клетки, отселектированные по адгезии в течение 10, 20 и 30 мин соответственно. 1 — все клетки, 2 — круглые, 3 — некруглые клетки.

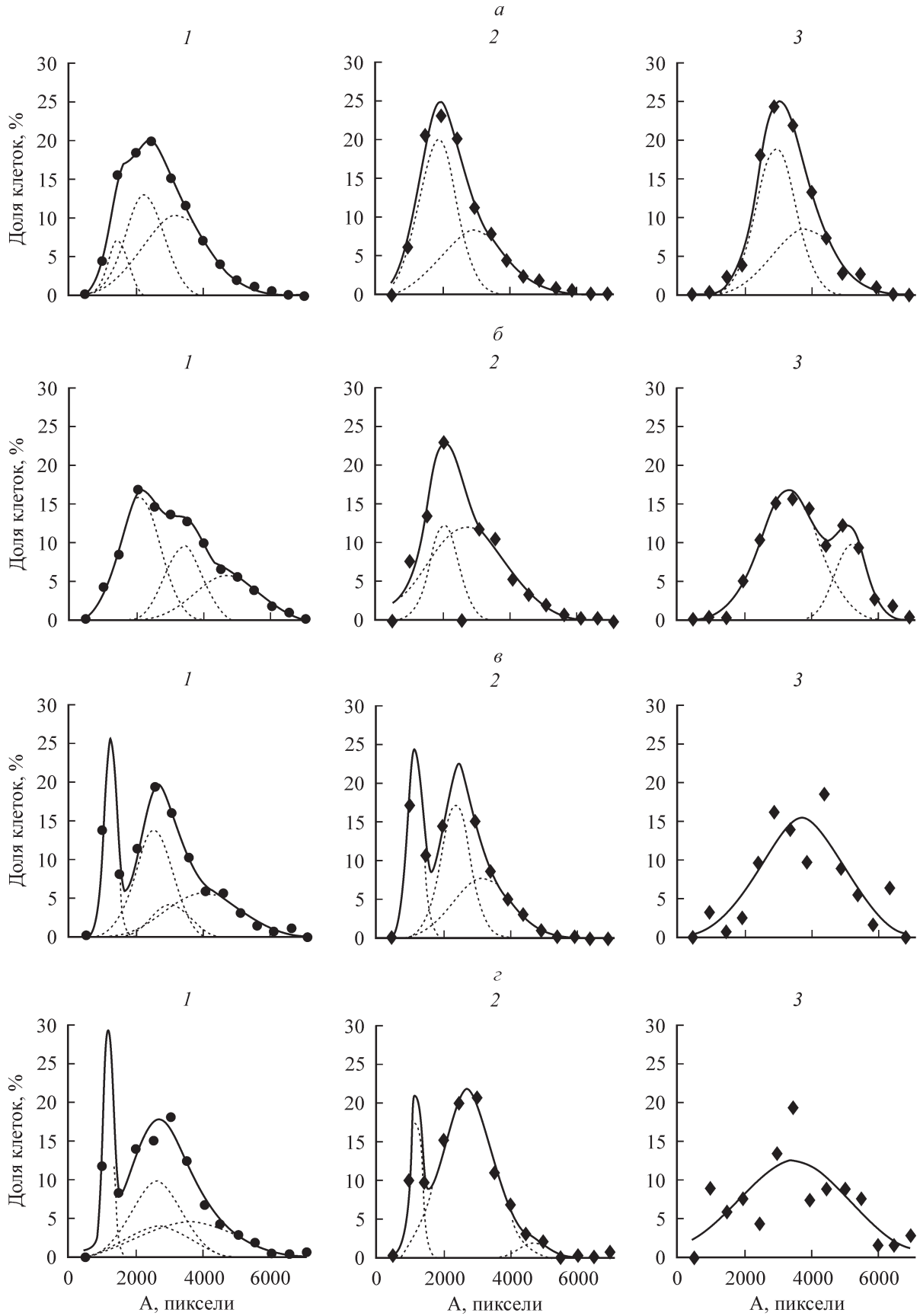


Рис. 5. Распределение клеток по величине A через 1 сут после посева на коллаген I типа. Обозначения те же, что и на рис. 4.

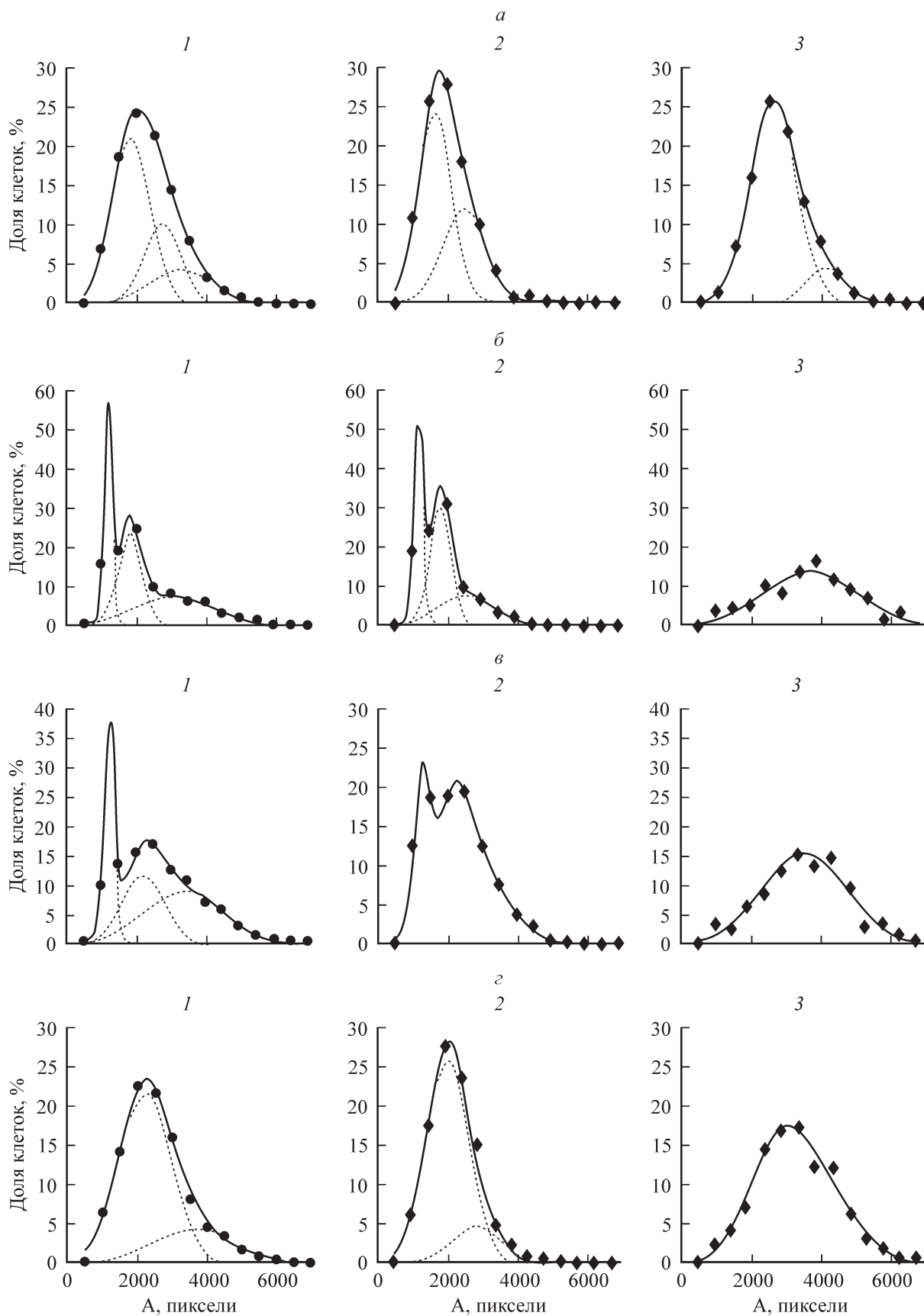


Рис. 6. Распределение клеток по величине A через 1 сут после посева на коллаген IV типа. Обозначения те же, что и на рис. 4, 5.

Теперь посмотрим на особенности гистограмм распределения по площади для круглых (2) и некруглых (3) клеток (рис. 4—6). Расчеты показали, что во всех случаях круглые клетки составляют приблизительно 50—60 % от всей популяции, а некруглые — 20—30 %. Средний размер A круглых клеток колеблется от 2000 до 2500 пикселей, некруглых — от 3000 до 3500. Это неудивительно, если полагать, что некруглые клетки — это в той или иной мере клетки распластанные.

Для круглых клеток, посеянных на фибронектин, отмечается практически один и тот же тип гистограмм зависимости частоты встречаемости клеток в зависимости от параметра A , сходный с таковым для круглых клеток в контроле. Мало чем отличается от контроля гистограмма распределения по A для некруглых клеток для «10-минутной» фракции. А вот некруглые «20-» и «30-минутные» клетки состоят из двух субпопуляций, гистограммы которых имеют двугорбый вид.

Гистограмма распределения по A «10-минутных» круглых клеток на коллагене I типа с очевидностью демонстрирует, что ее популяция лишилась большинства крупных клеток. Видно, что эти клетки в основном попадают во фракцию некруглых клеток. Оба эти графика очень сходны с соответствующими графиками «20-» и «30-минутных» клеток, локализованных на фибронектине. Однако на этом сходство и заканчивается.

Зато хорошо проявляется сходство гистограмм зависимости доли клеток от величины A для круглых и некруглых клеток для «20-минутных» клеток на коллагене I типа и «10-минутных» на коллагене IV типа, а также соответствующих «30-» и «20-минутных» фракций. Это лишнее раз говорит о неслучайном сходстве соответствующих фракций без разделения на круглые и некруглые клетки. Тем не менее качественное сходство не означает сходства количественного. И если для некруглых клеток, имеющих очень высокую дисперсию, средняя величина A приблизительно одна и та же, то для круглых клеток, имеющих отчетливо выраженное разделение на два пика, эти величины различны. Средний размер клеток на коллагене I типа стабильно превышает размер клеток на коллагене IV типа приблизительно на 15—20 %.

Обсуждение

Представленные в настоящей работе результаты получены на общей фракции кератиноцитов человека (без отделения базальных клеток) в период их начальной адаптации к условиям культивирования. Необходимо еще раз подчеркнуть, что клетки исследовали через 1 сут после посева. К этому времени клетки, адаптируясь, теоретически уже должны синтезировать собственный внеклеточный матрикс. Казалось бы логично, если бы к этому времени различия в свойствах клеток нивелировались. Вероятно, поэтому исследование клеток проводят, как правило, в первые минуты (реже часы) после высева на тот или иной субстрат (Are et al., 2001). Результаты нашей работы даже в первом приближении (рис. 2) показывают, что и через 1 сут можно обнаружить статистически достоверные различия между клетками в зависимости от субстрата, на котором их культивируют.

Более тонкие зависимости можно наблюдать, анализируя рис. 3. Представленные здесь данные имеют определенное сходство с данными по мезенхимным клеткам эмбрионов человека, опубликованными нами ранее (Pet-

rov et al., 2007). В обоих случаях популяцию клеток можно условно разделить на две субпопуляции «круглых» и «некруглых» клеток. Однако мезенхимные клетки были исследованы нами в 1-е ч после посева, и те результаты отражали динамику распластывания клеток, причем к 6-му ч среди мезенхимных клеток исчезали клетки округлой формы. В настоящей работе исследование клеток проводили тогда, когда процесс распластывания уже стабилизировался. По этой причине клетки округлой формы можно рассматривать как некоторую устойчивую субпопуляцию, составляющую приблизительно две трети от всей популяции клеток, независимо ни от типа субстрата, ни от отбора по адгезии.

Величина A является интегральным параметром и зависит от многих свойств клетки. Тем не менее гетерогенность популяции кератиноцитов, посеянных на разные белки ВКМ, в первую очередь должна зависеть от специфического взаимодействия поверхностных рецепторов клетки с соответствующими белками ВКМ (Watt, 1998, 2002; Cherepanova et al., 2006). Однако количество экспонированных рецепторов, очевидно, должно быть детерминировано физиологическим состоянием клетки. Разный баланс этих составляющих, вероятно, и определяет наличие субпопуляций, выявляемых нами при взаимодействии одних и тех же популяций кератиноцитов.

Хорошо заметное разделение «круглых» клеток на две субпопуляции (мелкие и относительно крупные клетки), выявляемое при использовании в качестве субстрата коллагенов I и IV типов, аналогично такому же феномену, обнаруженному нами и на мезенхимных клетках. Тем не менее вряд ли эти субпопуляции кератиноцитов можно считать устойчивыми (постоянными), поскольку при использовании фибронектина такие субпопуляции не обнаруживаются. Вероятно, коллагены способствуют стабилизации каких-то физиологических состояний клеток, что и приводит к проявлению четко фиксируемых субпопуляций кератиноцитов. Мы полагаем, что такие клеточные фракции уместно называть «физиологическими субпопуляциями».

Подводя итог полученным результатам, можно сказать, что оба коллагена, по-видимому, имеют специфическое влияние на кератиноциты, в отличие от фибронектина, на котором клетки не проявляют каких-либо особенностей даже при отборе их по времени адгезии, за исключением, возможно, «некруглых» клеток «20-» и «30-минутных» фракций. С определенной долей вероятности можно утверждать, что такое поведение кератиноцитов в культуре в целом должно отражать их взаимодействие с данными белками и в условиях *in vivo*. Однако установить конкретные корреляции поведения кератиноцитов в культуре с их функциональными характеристиками в многоклеточном организме позволят лишь дальнейшие исследования.

Список литературы

- Спичкина О. Г., Калмыкова Н. В., Кухарева Л. В., Воронкина И. В., Блинова М. И., Пинаев Г. П. 2006. Выделение популяции базальных кератиноцитов человека путем их селективной адгезии к белкам внеклеточного матрикса. Цитология. 48 (10) : 841—847.
- Юдинцева Н. М., Горелик Ю. В., Дьяконов И. А., Калмыкова Н. В., Блинова М. И., Пинаев Г. П. 1999. Трансплантация аллогенных эпителиальных пластов на ожоговые раны. Цитология. 41 (3/4) : 328.

- Aberdam D. 2004. Derivation keratinocyte progenitor cells and skin formation from embryonic stem cells. *Int. J. Develop. Biol.* 48 : 203—206.
- Alonso L., Fuchs E. 2003. Stem cells of the skin epithelium. *PNAS.* 100 : 11 830—11 835.
- Are A., Pinaev G., Burova E., Lindberg U. 2001. Attachment of A-431 cells on immobilized antibodies to the EGF receptor promotes cell spreading and reorganization of the microfilament system. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 48 : 24—36.
- Barrandon Y., Green H. 1987. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *PNAS.* 84 : 2302—2306.
- Cherepanova O. A., Kalmykova N., Petrov Y. P., Blinova M., Pinaev G. 2006. Contribution of $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$ integrins and 67kDa laminin receptor to the interaction of epidermoid carcinoma A-431 cells with laminin-2/4. *Cell Biol. Int.* 30 : 784—792.
- Doss M. X., Koehler C. I., Gissel C., Hescheler J., Sachinidis A. 2004. Embryonic stem cells: a promising tool for cell replacement therapy. *J. Cell. Mol. Med.* 8 : 465—473.
- Gurdon J. 1999. Development biology and the redirection or replacement of cells. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 354 : 1967—1976.
- Hollands P. 1997. Comparative stem cell biology. *Int. J. Develop. Biol.* 41 : 245—254.
- Keller G. 2005. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes and Development.* 19 : 1129—1155.
- Kuzminykh E. V., Petrov Yu. P. 2004. A simple model for the study of effect of the extracellular matrix on the cell morphology *in vitro*. *BBA.* 1671 : 18—25.
- Petrov Yu. P., Krylova T. A., Tsupkina N. V., Pershina V. P. 2007. Spreading as the general attribute of cell population. *J. Biol. Sci.* 7 : 102—112.
- Potten Ch. S., Booth C. 2002. Keratinocyte stem cells: a commentary. *J. Invest. Dermatol.* 119 : 888—899.
- Rheinwald J. G. 1980. Serial cultivation of normal epidermal keratinocytes. *Meth. Cell Biol.* 21A : 229—254.
- Rheinwald J. G., Green H. 1975. Serial cultivation of a strain of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell.* 6 : 331—334.
- Sobel S., Rosenberg M. D. 1983. Characterization of cellular attachment and spreading molecules at liquid-liquid interfaces. *Anal. Biochem.* 140 : 486—489.
- Taupin Ph. 2006. Derivation of embryonic stem cells for cellular therapy: challenges and new strategies. *Med. Sci. Monit.* 12 : RA75—RA78.
- Turnpenny L., Spalluto C. M., Perrett R. M., O'Shea M., Hanley K. P., Cameron I. T., Wilson D. I., Hanley N. A. 2006. Evaluating human embryonic germ cells: concord and conflict pluripotent stem cells. *Stem Cells.* 24 : 212—220.
- Watt F. M. 1998. Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 353 : 831—837.
- Watt F. M. 2002. Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *EMBO J.* 21 : 3919—3926.

Поступила 23 VIII 2007

ANALYSIS OF HETEROGENEITY OF HUMAN KERATINOCYTES INTERACTING WITH IMMOBILIZED FIBRONECTIN AND COLLAGENES I AND IV TYPES

O. G. Spichkina,¹ G. P. Pinaev, Yu. P. Petrov

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

¹ e-mail: olga_spichkina@mail.ru

The concept that stem cells form an independent subpopulations of somatic cells assumes the heterogeneity of cellular populations in adult tissues. As skin keratinocytes have natural affinity to extracellular matrix proteins, we made an attempt to reveal subpopulations of these cells depending on the time of their adhesion to substrates of collagen I and IV types and fibronectin. After selection for 10, 20 and 30 min the keratinocytes were cultivated for 24 h. The area of cell projection on a substrate and the spreading coefficient were measured (Kuzminykh, Petrov, 2004; Petrov et al., 2007). In 24 h statistically reliable morphological differences between the cells depending on the substratum were found. The size of the cells growing on collagen I type was twice as large as that of the cells cultivated on collagen IV type or in fibronectin. Irrespective of the substratum, up to 60—65 % of the cells had a rounded form. The cultivation on collagens revealed the heterogeneity of keratinocytes both in the control cultures and under selection by adhesion time, while the cells grown on fibronectin behaved as a homogeneous population. These results suggest that, contrary to fibronectin, collagens stabilize some physiological states of keratinocytes corresponding to their interaction with extracellular matrix proteins in the organism.

Key words: adhesion, heterogeneity of cell population, human keratinocytes, collagen, fibronectin.