ОСОБЕННОСТИ РОСТА КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ЛИНИИ СНО

© Ю. П. Петров, ¹ Н. В. Цупкина

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; ¹ электронный адрес: yupe3ov@mail.ru

На клетках постоянной линии СНО изучали рост популяции и формирование монослоя в зависимости от их начальной посевной концентрации. Клетки культивировали при обычных условиях на пластиковой подложке. Использовали 6 начальных посевных концентраций клеток: 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 и 6000 кл./см². Показали, что характер роста клеточной культуры формально может быть описан обычной S-образной зависимостью. Однако при более детальном анализе выявляются противоречия между экспериментальными и ожидаемыми значениями. Основное из них заключается в том, что остановка роста клеток при формировании монослоя не совпадает с выходом на плато теоретических кривых. Делается вывод об автономности процессов размножения и формирования монослоя у культивируемых клеток, в частности линии СНО. Оба процесса рассматриваются как аналоги пролиферации и морфогенеза у многоклеточных организмов. Кроме этого, показали, что остановка клеточного деления связана не столько с формированием монослоя в результате контактного ингибирования размножения, сколько с уменьшением клеток до некоторого предельного размера и увеличения их поляризации.

Ключевые слова: кривая роста, контактное ингибирование роста, площадь клетки, коэффициент поляризации клетки.

В настоящее время культивирование клеток — достаточно востребованная методика для различных исследований, в частности для получения и тестирования линий стволовых клеток. Растущий интерес к культивируемым клеткам как методу моделирования различных событий. происходящих в многоклеточном организме, требует определенного переосмысления взгляда на сами культвируемые клетки. Прямое экстраполирование на макроорганизм экспериментальных данных, полученных на клетках в культуре, может вести к серьезным ошибкам не только в исследовательской работе, но и в прикладных направлениях, например таких как медицина. Автономный (независимый от других биологических форм жизни) рост клеток в культуре — это самостоятельное биологическое явление. Поэтому оно нуждается и в самостоятельном изучении независимо от его прикладного использования.

Поскольку культивируемые клетки — самовоспроизводящиеся биологические объекты, в первую очередь важно изучить общие закономерности их размножения. Некоторые из них известны и обшеприняты. Например, известно, что клеточная культура проходит три фазы роста — латентную (лаг-фазу), экспоненциальную (лог-фазу) и стационарную (plateau phase), т. е. рост культуры описывается обычной S-образной кривой (Na et al., 2010). Характер роста клеточной культуры в значительной степени зависит от двух хорошо известных феноменов — контактного ингибирования движения и контактного ингибирования роста (Abercrombie, Ambrose, 1962; Abercrombie, 1979; Васильев, Гельфанд, 1981; Wieser et al., 1990; Nelson, Daniel, 2002). Строго говоря, оба явления справедливы в отношении нормальных клеток, но не трансформированных, злокачественных. Контактное ингибировние роста способствует формированию монослоя и препятствует образованию многослойных клеточных структур. Тем не менее многие клетки постоянных линий, являясь трансформированными, не склонны к многослойным структурам и тоже растут преимущественно в виде монослоя. Поэтому можно полагать, что феномен контактного ингибирования роста в определенной степени должен проявляться и у таких клеток.

В настоящей работе мы поставили задачу проверить, насколько верны эти общепринятые представления о росте клеток в культуре (S-образный тип роста и его контактное ингибирование). В качестве объекта использовали клетки постоянной линии СНО как одной из наиболее распространенной в исследовательской работе. Клетки этой линии в стационарной фазе роста образуют монослой и не склонны к миграции, поскольку относятся к эпителиоподобному клеточному типу.

Материал и методика

В качестве объекта исследования использована постоянная клеточная линия СНО (клон К1 линии СНО, выделенной из яичника китайского хомячка). Клетки получены из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Культивировали клетки в пластиковых чашках Петри (35 мм; Nunk, Дания) на среде F12 (Gibco, США), в атмосфере с 5 % СО₂ при 37 °С. В питательную среду добавляли 10 % эмбриональной сыворотки коров (Gibco, США) и 100 мкг/мл гентамицина. Суспензию, полученную из клеток, выросших до монослоя, рассевали по лункам 6-луночной платы (диаметр лунки 35 мм; Nunk, Дания) при разной концентрации клеток, но одновременно. Использовали 6 посевных концентраций: 1000 (I), 2000 (II), 3000 (III), 4000 (IV), 5000 (V) и 6000 (VI) кл./см². В отдельном опыте использованы две посевные концентрации 2000 и 20 000 кл./см².

Цифровые изображения живых клеток получали, используя инвертированный микроскоп Nikon ECL IPSE TS100, об. $20 \times$ (или $10 \times$ в опыте с двумя концентрациями), камеру Canon EOS 1000D, разрешение 2816×1880 пикселей. Время регистрации 24, 48, 52, 72, 76 и 96 ч после посева. Клетки анализировали с помощью программы ImageJ 1.43u (Rasband, W. S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, http://imagej.nih.gov/ij/, 1997—2011) по двум параметрам: площади проекции клетки на подложку (площади клетки) и коэффициента поляризации М/m (соотношение длинной и короткой осей клетки, если ее форму экстраполировать к эллипсу). Для построения кривых роста подсчитывали число клеток в случайно выбранных полях зрения. На каждую временную точку использовали 10-15 полей зрения (п. зр.). Затем рассчитывали средние значения числа клеток в п. зр. и ошибку среднего.

Для построения графиков и статистической обработки данных использовали Excel 2007 (MS Corporation, США) и Origin 6.1 (OriginLab Corporation, США).

Результаты

На рис. 1 представлены экспериментальные значения роста клеточных популяций с соответствующими расчетными S-образными кривыми для каждой посевной концентрации (от I до VI). В каждом случае наблюдается хорошее соответствие теоретических кривых экспериментальным значениям (во всех случаях коэффициенты линейной корреляции были не ниже 0.98). Несмотря на это формальное соответствие для каждого отдельного случая трудно выделить закономерности в изменении формы расчетных кривых, коррелирующие с возрастанием количества клеток при посеве.

Визуально к 96 ч клетки формировали монослой на 80—90 % в вариантах I—IV и на 100 % при максимальной посевной концентрации (V—VI). Это означает, что к концу наблюдения во всех случаях культура достигала стационарной фазы роста, которая на графиках должна была бы соответствовать плато расчетных кривых. Однако за исключением варианта III, этого нет. Отсутствие плато в других случаях нельзя объяснить погрешностями эксперимента, например малой выборкой, поскольку общее количество подсчитанных клеток в этом опыте составило более 150 тыс. То же несоответствие экспериментально наблюдаемой стационарной фазы (монослой) и отсутствие плато при расчете S-образных кривых мы наблюдали и в предварительной серии опытов с меньшей клеточной выборкой.

Чтобы разрешить это противоречие, при расчете S-кривых в каждом случае исключили одно (два) экспериментальное значение на конечных этапах роста культуры. Основанием для такой процедуры было следующее. Исходя из данных рис. 1 можно предположить, что, по-видимому, процесс роста культуры и формирование монослоя описываются разными закономерностями, вклад которых в рост культуры неодинаков во времени. Иными словами, в процессе роста клеточной популяции происходит постепенная замена одной зависимости другой. Это означает, что начальные опытные точки в большей степени соответствуют первой закономерности (в данном случае общепринятой S-образной зависимости), а поздние (по времени) — зависимости, описывающей формирование монослоя (в настоящее время неизвестной). Таким образом, не используя последние (последнюю) опытные точки для расчета S-кривых роста, мы уменьшаем влияние на них «шума» зависимости, относящейся к формированию монослоя.

Правильность такого подхода подтверждают данные, представленные на рис. 2. Исчезают логические противоречия по крайней мере по трем пунктам. Во-первых, во всех случаях S-кривые имеют плато. Во-вторых, коэффициент корреляции в отдельных вариантах практически равен 1. И в-третьих, что гораздо важнее, значения этих плато, численно равные коэффициенту A2 в уравнении S-кривой (см. плагин в программе Origin 6.1), через экспоненциальную зависимость коррелируют с концентрациями клеток при посеве, причем с очень высоким коэффициентом корреляции — 0.9998 (рис. 3).

Несмотря на то что клетки СНО относятся к эпителиоидному типу, а значит, у них нет такого мобильного изменения формы, как у мигрирующих фибробластов, их площадь в процессе культивирования не остается постоянной. Не исключено, что изменение формы клеток может зависеть от фазы роста культуры. Для проверки этого предположения мы сформировали две контрастные группы данных, объединив выборки при низкой и при высокой концентрациях клеток при посеве. Промежуточные данные по группам III и IV были исключены. Расчет теоретических S-кривых выполняли без учета значений точки «96 ч». Выборки клеток по их площади формировали без учета метафазных клеток (мелких, округлых клеток). Полученный результат представлен на рис. 4.

Несмотря на то что средняя площадь клеток в течение роста культуры колеблется в небольших пределах (6000—8000 пикселей), имеются достоверно определяемые как общие изменения площади клеток для двух представленных вариантов, так и индивидуальные. Очевидно, что в обоих случаях размер клеток увеличивается во время латентной фазы роста и уменьшается при переходе от экспоненциальной к стационарной. Различия касаются лог-фазы. В это время в первом варианте все еще продолжает увеличиваться средняя площадь клеток, но темп этого процесса замедляется. Во втором случае, напротив, размер клеток начинает медленно уменьшаться.

Чтобы нагляднее представить, почему происходит уменьшение размера клеток при формировании монослоя, обратимся к данным, представленным на рис. 5 и 6. Здесь взяты изображения клеток из предварительной серии опытов, когда были использованы более высокие концентрации клеток при посеве. При этом формирование монослоя шло гораздо интенсивнее, чем в популяциях, данные по которым представлены на рис. 1.

Следует обратить внимание на среднее и правое изображения рис. 5, δ , где отчетливо заметно уменьшение площади клеток к 96 ч культивирования при одновременном практически полном отсутствии метафазных клеток. Визуально на этих изображениях можно заметить, что при достижении стационарной фазы роста клетки становятся более вытянутыми. Это подтверждают и расчеты. Из данных рис. 6, *а* следует, что при низкой концентрации клеток при посеве в процессе роста культуры



Рис. 1. Кривые роста клеток СНО, построенные по всем экспериментальным точкам.

Концентрации клеток при посеве: 1000 (I), 2000 (II), 3000 (III), 4000 (IV), 5000 (V), и 6000 (VI) кл./см². Представлены средние значения числа клеток в поле зрения с соответствующими ошибками. *Кружки* — число клеток в поле зрения в различные периоды времени после посева, *линии* — соответствующие расчетные S-образные кривые.

их площадь и коэффициент поляризации почти не изменяются. Очень высокая концентрация клеток при посеве приводит к противоположному результату (рис. 6, δ). По мере перехода культуры к стационарной фазе роста происходит уменьшение площади клеток, сопровождаемое усилением их поляризации (вытянутости).

Обсуждение

Получение экспериментальных значений и построение по ним кривых роста являются относительно простой процедурой. Она давно и широко используется при анализе клеточных популяций, поскольку достаточно чувствительна к изменению состояния любых клеток (Ackermann et al., 1954; Sinclair, Ross, 1969; Ilio et al., 1995; Desai et al., 1998; Fujikawa, Morozumi, 2005; Murakami, Kaeberlein, 2009). Как показывают представленные в настоящей работе данные, динамика роста клеточной культуры CHO от единичных клеток до формирования полного монослоя может быть удовлетворительно описана с помощью типичной S-образной кривой, принятой при описании размножения клеточных популяции. Однако при более детальном анализе обнаруживаются несоответствия между экспериментальными данными и ожидаемыми значениями. При переходе культуры клеток к стационарной фазе (формирование монослоя) их размножение не останавливается и может даже ускоряться. В литературе мы



Рис. 2. Кривые роста клеток СНО, построенные с использованием не всех экспериментальных значений. Значения, указанные *стрелками*, не использовали для расчета теоретических кривых роста.

Кружки — число клеток в поле зрения в различные периоды времени после посева, *линии* — соответствующие расчетные S-образные кривые. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

нашли лишь одну похожую работу. Было обнаружено, что у двух больных с муколипидозом фибробласты кожи в культуре растут согласно типичной S-образной кривой, но при достижении фазы плато не останавливают свой рост, а продолжают пролиферировать (Oohira et al., 1987). И хотя авторы никак не комментируют эти данные с общебиологических позиций, они, как мы полагаем, наряду с представленными в настоящей работе (см. рис. 1 и 2) имеют принципиальное значение. С одной стороны, они указывают на то, что эволюция клеток в культуре имеет общие тенденции развития с клетками макроорганизма при некоторых патологиях, связанных с нарушением гомеостаза на уровне макроорганизма. С другой стороны, важно осознать, что общепринятые представления о культивируемых клетках не всегда совпадают с их реальными характеристиками.

Процессы, однозначно описываемые S-образными зависимостями, должны заканчиваться выходом на плато, поскольку при его достижении эти процессы начинают уравновешиваться другими процессами. Например, достижение предельной вязкости раствора актина при его полимеризации связано с тем, что процесс полимеризации этого белка начинает уравновешиваться его деполимеризацией (Khaitlina, 1986). Причиной достижениия максимального количества клеток и выходом его на плато могло бы быть истощение питательной среды. Однако

757



Рис. 3. Корреляция между концентрацией клеток при вариантах посева I—VI и ожидаемыми значениями числа клеток при достижении стационарной фазы.

Коэффициент А2 в уравнении S-образной кривой соответствует значению плато (см. соответствующий плагин в программе ImageJ). Для вычисления ожидаемых значений использована экспоненциальная зависимость. Коэффициент линейной корреляции равен 0.9998. *Ромбики* опытные значения, *пунктирная линия* — расчетная кривая.

известно, что остановка роста клеток, образующих монослой, не связана со снижением питательных веществ в среде. Считается, что такие клетки перестают размножаться, как только достигают сплошного монослоя. Объяснение этого явления обычно связывают с обнаруженным в середине прошлого века феноменом контактного ингибирования размножения. Оно проявляется в том, что клетки по мере увеличения контактов между ними останавливаются (контактное ингибирование движения) и перестают делиться. Однако связь этого явления и образования монослоя не всегда однозначна (Васильев, Гельфанд, 1981). Тем не менее это явление можно считать фундаментальным в биологии культивируемых клеток.

Размножение клеток и формирование ими монослоя нельзя считать процессами сопряженными (конкурирующими, антагонистичными) и лежащими в основе одной и той же S-образной зависимости. Если бы это было так, то на рис. 1, а были бы S-кривые, плато которых по времени совпадало бы с формированием монослоя. Поскольку этого не происходит, следует признать, что эти процессы не зависимы (не сопряжены и т. п.) друг от друга и формально должны описываться отдельными зависимостями. Рост клеток в культуре и образование ими монослоя можно рассматривать как аналоги процессов пролиферации и морфогенеза в многоклеточных организмах. Формирование монослоя — это ординарный процесс для большинства культивируемых клеток. Поэтому в рамках биологии клетки в культуре изучение закономерностей его образования имеет важное значение.

Несмотря на то что клетки постоянной линии СНО не склонны к образованию многослойных структур, при формировании монослоя их размножение не прекращается. Следовательно, феномен контактного ингибирования роста у этих клеток не выражен. Это наглядно демонстрирует рис. 5. Остановка размножения происходит только тогда, когда клетки, уплотняясь, доходят до какого-то минимального размера. Его, по-видимому, можно рассматривать как определенный предел, достижение которого и вызывает остановку клеточного размножения. Не исключено, что в этот процесс включено и формообразование клетки, поскольку (в данном случае) обнаружено, что прекращение размножения клеток совпадает с приобретением у большинства из них вытянутой формы (увеличивается коэффициент поляризации). Конечно, нельзя утверждать, что поляризация клеток является причиной торможения роста, но то, что она формируется в процессе уменьшения размера клеток СНО, вступающих в стационарную фазу, сомнений не вызывает. О влиянии формы клеток на образование монослоя указывали и другие авторы (Folkman, Moscona, 1978).

Полученные данные не опровергают само явление контактного ингибирования роста, но ограничивают его



Рис. 4. Сравнение данных изменения площади клеток (*светлые кружки*) с динамикой роста культуры клеток СНО (*черные кружки*).

а — для клеток с низкой посевной концентрацией (I и II), б — для клеток с высокой посевной концентрацией (V и VI). Кружки — опытные значения. Сплошные линии — соответствующие расчетные S-образные кривые (при их расчете значения точки «96 ч» не учитывали). Пунктирные линии — отрезки, соединяющие опытные значения и не несущие функциональной нагрузки. Представлены средние значения с соответствующими ошибками.



Рис. 5. Световая микроскопия живых клеток СНО. Фрагменты полей зрения в одном масштабе через 22, 52 и 96 ч после посева. Концентрации клеток при посеве 2000 (a) и 20 000 (б) кл./см². Инвертированный микроскоп Nikon ECL IPSE TS100, об. 10×, камера Canon EOS 1000 D. Округлые светлые клетки — стадия метафазы.



Рис. 6. Сравнение культур клеток СНО при посеве 2000 (a) и 20 000 (б) кл./см² по двум параметрам — средней площади клеток (черные кружки) и коэффициенту поляризации (светлые кружки).

Пунктирные линии — отрезки, соединяющие опытные значения и не несущие функциональной нагрузки.

сферу проявления наряду с некоторыми другими факторами, описанными в монографии Васильева и Гельфанда (1981). По-видимому, можно считать, что рост различных культур, как и пролиферация различных клеток в многоклеточном организме, имеют много общего, поскольку описываются одной и той же S-образной зависимостью. Однако формирование монослоя при всем его внешнем сходстве для разных культивируемых клеток может, напротив, иметь специфические особенности, не обязательно детерминируемые контактным ингибированием роста клеточной популяции.

Список литературы

Васильев Ю. М., Гельфанд И. М. 1981. Взаимодействие нормальных и неопластических клеток со средой. М.: Наука. 220 с. *Abercrombie M. 1979.* Contact inhibition and malignancy. Na-

ture. 281 : 259-262.

Abercrombie M., Ambrose E. J. 1962. The surface properties of cancer cells: a review. Cancer Res. 22 : 525—548. Ackermann W. W., Rabson A., Kurtz H. 1954. Growth charac-

teristics of poliomyelitis virus in HeLa cell cultures; lack of parallelism in cellular injury and virus increase. J. Exp. Med. 100: 437-450.

Desai M., Bühler T., Weller P. H., Brown M. R. 1998. Increasing resistance of planktonic and biofilm cultures of *Burkholderia cepacia* to ciprofloxacin and ceftazidime during exponential growth. J. Antimicrob. Chemother. 42 : 153—160.

Folkman J., Moscona A. 1978. Role of cell shape in growth control. Nature. 273 : 345—349.

Fujikawa H., Morozumi S. 2005. Modeling surface growth of *Escherichia coli* on agar plates. Appl. Environ. Microbiol. 71 : 7920—7926.

Ilio K. Y., Sensibar J. A., Lee C. 1995. Effect of TGF-beta 1, TGF-alpha, and EGF on cell proliferation and cell death in rat ventral prostatic epithelial cells in culture. J. Androl. 16 : 482–490.

Khaitlina S. Yu. 1986. Polymerization of beta-like actin from scallop adductor muscle. FEBS Lett. 198 : 221–224.

Murakami C., Kaeberlein M. 2009. Quantifying yeast chronological life span by outgrowth of aged cells. J. Vis. Exp. 6: 1156.

Na R. S., Zhao Q. J., Jin da P., Su X. H., Chen X. W., Guan W. J., Ma Y. H. 2010. Establishment and biological characteristics of Ujumqin sheep fibroblast line. Cytotechnology. 62 : 43—52.

Nelson P. J., Daniel T. O. 2002. Emerging targets: molecular mechanisms of cell contact-mediated growth control. Kidney Int. 61 : S99—S105.

Oohira A., Matsui F., Oki T., Nogami H. 1987. Deficiency of density-dependent regulation of cell growth in the culture of skin fibroblasts from patients with mucolipidosis III. J. Cell Sci. 87 : 249–257.

Sinclair W. K., Ross D. W. 1969. Models of growth in mammalian cells. Biophys. J. 9: 1056–1070.

Wieser R. J., Renauer D., Schäfer A., Heck R., Engel R., Schütz S., Oesch F. 1990. Growth control in mammalian cells by cell-cell contacts. Env. Health Perspect. 88 : 251–253.

Поступила 8 VI 2012

GROWTH FEATURES OF CHO CELLS IN CULTURE

Yu. P. Petrov, 1 N. V. Tsupkina

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg; ¹ e-mail: yupe3ov@mail.ru

Dependence of growth characteristics of cell population and the monolayer formation on the initial plating concentrations of cells were studied on the established CHO cell line. The cells were cultivated under standard conditions on plastic substrate. Initial plating concentration was varied as: 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, and 6000 cell/cm². It was shown that growth of the cell culture can be formally described by standard S-shaped dependence. However, a more detailed analysis revealed a discrepancy between the experimental and expected data. Specifically the arrest of cell growth at the monolayer formation does not coincide with the time when the theoretical curves approach plateau. It has been concluded that cell proliferation and the formation of a monolayer are independent processes (at last in CHO cells). Both processes may be considered as analogues of proliferation and morphogenesis in metazoan. In addition, it has been shown that the arrest of cell division occurs not only by contact inhibition of proliferation during monolayer formation but also by reducing the size of cells to some limiting dimension and by increasing the polarization of cells.

Key words: growth curve, contact inhibition of growth, cell area, polarization coefficient.

760