

ДВА СОСТОЯНИЯ РАСПЛАСТЫВАНИЯ МЕЗЕНХИМНЫХ КЛЕТОК ЭМБРИОНА ЧЕЛОВЕКА IN VITRO

© Т. А. Крылова,¹ Л. В. Кухарева, Ю. П. Петров

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

¹ электронный адрес: takrylova@mail.ru

В работе представлены данные по распластыванию мезенхимных клеток эмбриона человека на пластике и коллагене I типа разного происхождения — крысиного, овечьего и бычьего. Показано, что, несмотря на то что на коллагенах распластывание клеток сильнее, чем на пластике, различий между коллагенами разного происхождения на этот процесс не выявлено. Морфометрическими параметрами для изучения распластывания служили площадь проекции клетки на подложку, периметр клетки и коэффициент распластывания. Время наблюдения после посева клеток от 0.5 до 2 ч. Обнаружено, что при распластывании наблюдаются группы мелких круглых клеток, ведущих себя как автономные субпопуляции. В целом доля таких клеток на пластике составляет около 9 %, а на коллагене — менее 2. Сделан вывод о том, что эта клеточная субпопуляция связана с особым независимым функциональным состоянием клеток, предшествующим их распластыванию на субстрате.

Ключевые слова: площадь клетки, периметр клетки, коэффициент распластывания, коллаген I типа, субпопуляция.

В настоящее время в различных областях биологии и медицины находят широкое применение культуры клеток многоклеточных организмов (Placzek et al., 2009; Reimann et al., 2009; Salem, Thiemermann, 2010). Однако результаты модельных экспериментов на культивируемых клетках экстраполировать на многоклеточный организм необходимо с осторожностью. Переведенные в культуру клетки лишены системной организации многоклеточного организма и ведут себя как автономные биологические объекты.

В многоклеточных организмах процессы пролиферации и дифференцировки клеток, сменяя друг друга, являются перманентными и сбалансированными процессами, причем осуществляются они в условиях гомеостаза. При культивировании периодически приходится пересевать клетки, тем самым искусственно изменяя условия их жизни. Поэтому после каждого посева клетки должны заново адаптироваться к смене условий культивирования. Кроме этого, существует одно принципиальное различие и в морфологии клеток. Процедура посева клеток всегда такова, что они обязательно будут находиться в суспензионном состоянии. Таким образом, существует этап, когда морфология любых подготавливаемых к культивированию клеток должна быть одной и той же — клетки становятся сферическими. Это та начальная форма всех культивируемых клеток, с которой они начинают приспосабливаться к условиям *in vitro*.

В задачу настоящей работы входило проследить за тем, как изменяется форма клеток в первые часы после посева. В качестве объекта исследования была выбрана первичная культура мезенхимных клеток эмбриона человека (МКЭЧ), которые в культуре обладают относительно выраженной полиморфностью. Изучение поведения в культуре этих клеток актуально и в связи с возросшим ин-

тересом к работам со стволовыми клетками (Augello et al., 2010; Patel, Yang, 2010). Чтобы обеспечить более комфортное пребывание клеток в культуре, мы использовали подложку из коллагена I типа, одного из основных естественных компонентов внеклеточного матрикса (Shoulders, Raines, 2009). Коллаген благодаря своей доступности, биосовместимости и малой иммуногенности является основным белком, применяемым в тканевой инженерии в качестве подложки и для создания различных тканевых аналогов. Он также широко применяется в медицине (Strom, Michalopoulos, 1982). Основным источником получения медицинского и биотехнологического коллагена являются шкуры крупного рогатого скота. Коллаген, полученный из шкур мелкого рогатого скота (овец и коз), практически не исследован как биотехнологический субстрат. Кроме того, на поведение клеток на коллагеновом субстрате оказывает сильное влияние форма субстрата — нативный молекулярный коллаген, денатурированный коллаген или фибриллярный коллаген в виде слоя нативных фибрилл (Mercier et al., 1996; Mauney, Volloch, 2009).

Материал и методика

Работа выполнена на первичной культуре костномозговых мезенхимных клеток эмбриона человека (МКЭЧ) со сроком гестации 5—6 нед. Эксперименты проводили в пластиковых чашках Петри (35 мм, Nunk) на среде DMEM/F12 с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки коров (Биолот) и 50 мкг/мл гентамицина в атмосфере с 5 % CO₂ при 37 °C. В опыт брали клетки через 30 мин, 1, 1.5, 2 и 2.5 ч после посева. На каждую точку использовали по три чашки. Клетки культивировали либо на пласти-

ке, либо предварительно дно чашек покрывали коллагеном I типа, полученным из разных источников, из расчета 1 мг белка на чашку. Раствор коллагена наносили на холоде, равномерно распределяя по поверхности чашки, инкубировали 30 мин в атмосфере CO₂ при 37 °С, после чего дважды промывали раствором фосфатного буфера. По завершении контрольного времени удаляли среду, монослой клеток промывали фосфатным буфером (PBS) и окрашивали по Романовскому—Гимза.

В качестве субстрата использовали коллаген I типа, полученный разными способами — кислотной и щелочно-солевой экстракцией. Кислотный коллаген получен из сухожилий крысиного хвоста (образец А) экстракцией уксусной кислотой с последующими переосаждениями растворами 0.9 М NaCl и 0.02 М K₂HPO₄ (Chandrakasan et al., 1976). При таком способе получения коллаген находится в виде цельных нативных молекул с сохраненными тепlopeптидами (Chandrakasan et al., 1976). Щелочно-солевой коллаген получен из шкур взрослой овцы (образец Б) и годовалого быка (образец В) с последующей обработкой 20 % NaOH в присутствии 1 М Na₂SO₄, растворением в уксусной кислоте и такой же, как для кислотного коллагена, дальнейшей очисткой (Истранов, Бондарева, 1969). Полученный щелочно-солевым способом коллаген отличается от кислотного частичным или полным дезамидированием остатков аспарагина и глутамина; тройная спираль при этом сохраняется (Suzuki et al., 1999), но исчезает способность к гелеобразованию. Коллаген овцы, полученный по нашей модификации способа Истранова и Бондаревой (образец Б), сохранил способность к гелеобразованию, т. е. к образованию нативных фибрилл. У такого же коллагена быка способность к гелеобразованию отсутствовала.

Ранее нами было показано (Швед и др., 2007), что примененный способ нанесения коллагенового субстрата на чашку для желирующего коллагена (образцы А и Б) дает фибриллярный субстрат, а в случае нежелирующего (образец В) образующийся субстрат состоит из молекулярного нативного коллагена. Иными словами, в настоящей работе был исследован коллаген, полученный не только из разных источников, но и формирующий различный тип субстрата.

Окрашенные препараты клеток исследовали с помощью светового микроскопа, используя объектив 10× и фотонасадку с цифровой камерой (Nikon Digital Camera COOLPIX 4500, США) с максимальным оптическим зумом 5×. Все изображения выполнены с одним и тем же разрешением 1024 × 768 пикселей и обработаны программой ImageJ 1.37 (Rasband, W. S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997—2011). Измеряли площадь проекции клетки на подложку или, кратко, площадь клетки, периметр клетки и коэффициент распластывания, предложенный нами ранее (Kuz'minykh, Petrov, 2004). Поскольку в работе использовали изображения с одним и тем же разрешением, перевода в абсолютные метрические значения для сравнительного анализа морфометрических параметров клеток не производили. Коэффициент распластывания вычисляется как отношение радиуса (R_p), рассчитанного из величины периметра клетки, взятой как длина окружности, и радиуса (R_a), рассчитанного из величины площади клетки, принятой за площадь круга. Эта величина не может быть ниже 1 (соответствует форме круга), а ее увеличение говорит о том, что клетка приобретает выраженные черты либо вытянутой, либо полигональной формы,

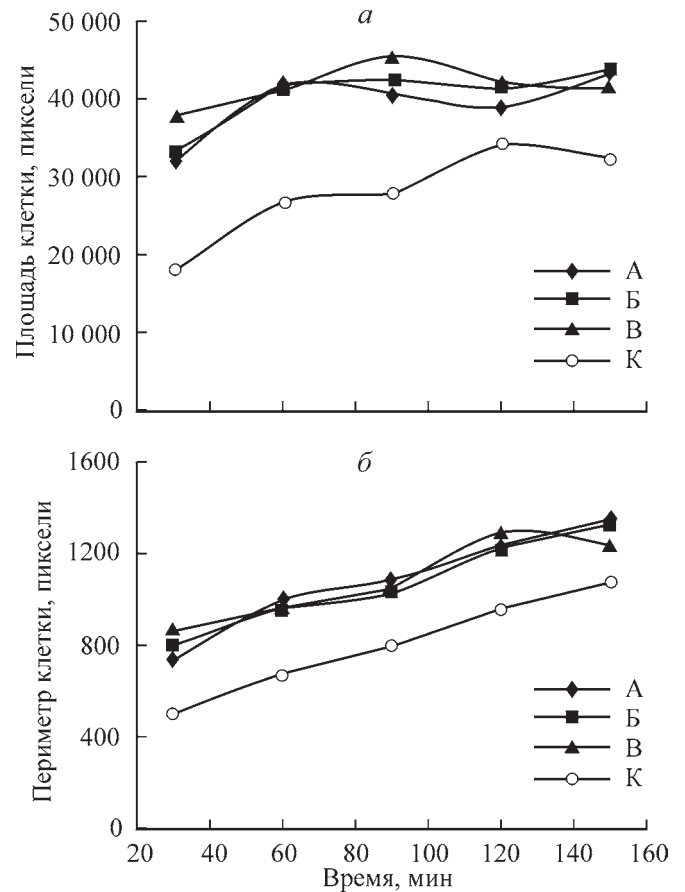


Рис. 1. Динамика изменения формы мезенхимных клеток после их посева на пластик (К) и на подложку из коллагена I типа крысы (А), овцы (Б) и коровы (В).

а — изменение площади проекции клетки на подложку, б — изменение периметра клетки. Значения представлены как среднее ± ошибка среднего (во всех случаях масштаб ошибки среднего меньше размера значка, обозначающего среднее значение).

т. е. ее распластанность увеличивается по сравнению с круглой формой пропорционально увеличению соотношения R_p/R_a.

Для статистической обработки данных использовали пакет «Анализ данных» Excel 2007 (MS Corporation, США) и Origin 6.1 (OriginLab Corporation, США). Для каждой точки выборка составляла не менее 500 клеток.

Результаты

Предварительно были проведены опыты по сравнительному изучению влияния на распластывание клеток коллагена, полученного из разных источников. На рис. 1 показана динамика распластывания клеток в период от 0.5 до 2.5 ч. Можно отметить, что характер распластывания клеток в контроле (на пластике) резко отличается от распластывания на коллагене. Практически нет различий в изменении размера клеток на коллагене I типа разного происхождения. Из других особенностей можно отметить следующее. Уже через 1 ч клетки, посаженные на коллаген, по параметру площади клетки выходят на плато, тогда как клетки в контроле достигают плато только через 2 ч (рис. 1, а). За то же время наблюдения как в контроле, так и в опыте происходит линейное увеличение перимет-

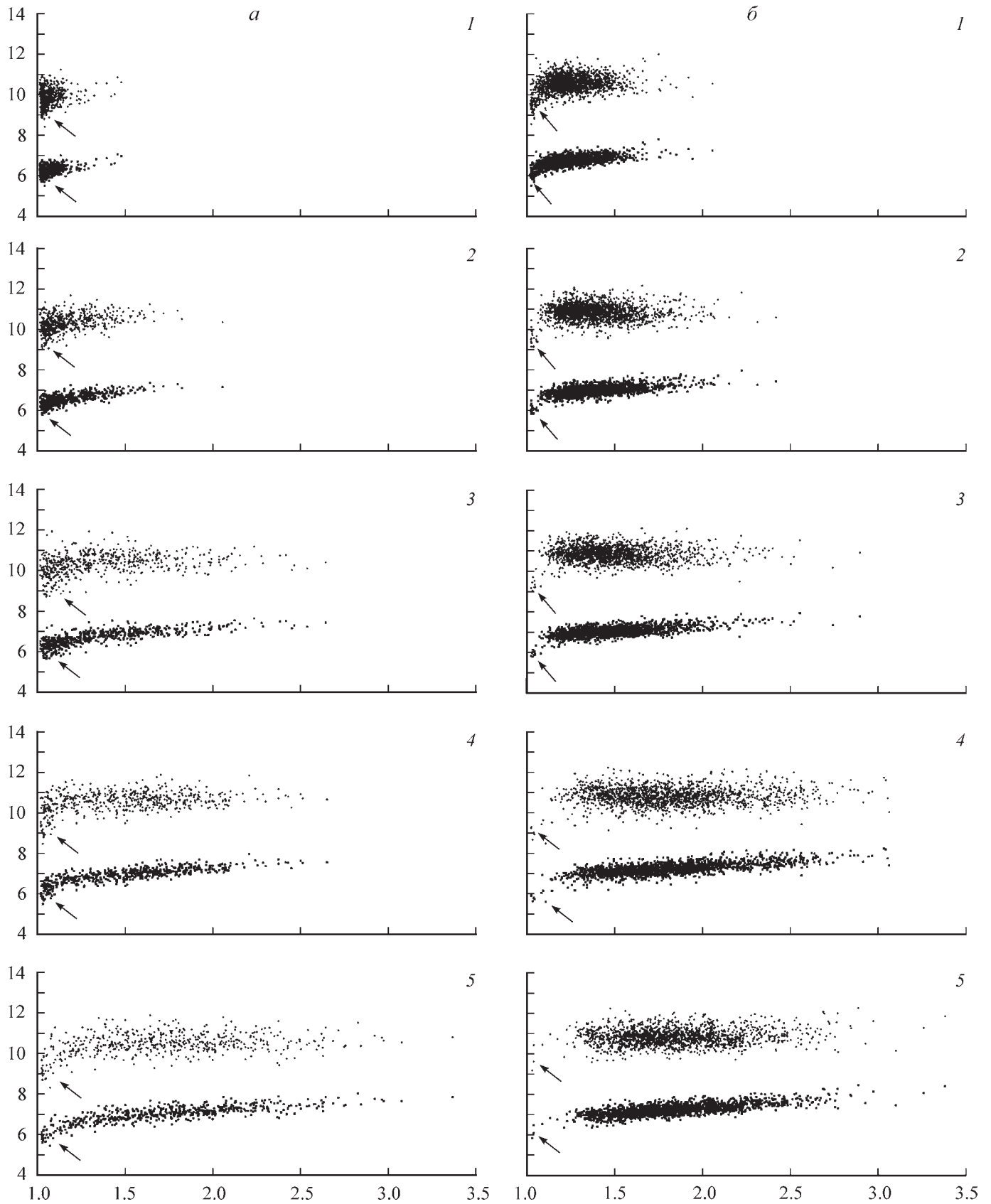


Рис. 2. Распластывание мезенхимных клеток эмбриона человека на пластике (а) и коллагене I типа (б).

Каждая клетка представлена отдельной точкой. На каждом графике верхние скопления точек соответствуют площади клеток, а нижние — периметру. 1 — через 30, 2 — 60, 3 — 90, 4 — 120, 5 — 150 мин после посева. Стрелками указаны области, соответствующие субпопуляции мелких круглых клеток. По горизонтали — коэффициент распластности клеток; по вертикали — натуральный логарифм значений площади и периметра клеток.

ра клеток. При этом контрольные значения меньше опытных приблизительно на одну и ту же величину (около 300 пикселей) в каждой из точек. Из-за относительно большой выборки ошибка среднего весьма мала, поэтому в некоторых точках размер символов превышает ее значения.

Демонстрируя различия морфометрических параметров клеток в контроле и в опыте, рис. 1 не дает ответа на вопрос о том, с чем связано это различие — с качественным изменением самих клеток или со скоростью их распластывания. Это иллюстрирует рис. 2. Здесь показана зависимость изменения размера клеток от коэффициента распластывания R_p/R_a . Поскольку различий по морфометрическим параметрам между клетками, посеянными на коллагене I типа разного происхождения, не было выявлено, эти данные были объединены в одну группу (рис. 2, б).

Полученные данные подтверждают наши предыдущие результаты (Petrov et al., 2007), из которых следует, что условия микроокружения клеток, в том числе и субстрат, влияют на морфологию клеток при их распластывании не прямо (т. е. специфически влияя на внутриклеточные механизмы распластывания), а опосредованно, изменяя скорость распластывания клеток. Этот феномен проявляется в том, что скопления большинства точек группируются вдоль одних и тех же линий регрессии (на рис. 2 не показаны), сдвигаясь по ним вправо с увеличением времени культивирования клеток независимо от того, опыт это или контроль.

В отличие от работы 2007 г. здесь мы приводим данные не только по изменению периметра клеток (на графиках рис. 2 нижние скопления точек), но и по динамике изменения площади клеток (верхние скопления точек). Одновременное представление данных по обоим параметрам наглядно демонстрирует, что если длина периметра клеток постепенно нарастает во времени в сходной манере независимо от подложки, то площадь клеток остается величиной постоянной после достижения этими клетками величины коэффициента распластывания, приблизительно равного 1.2, т. е. максимального значения по площади клетки достигают, имея практически округлую форму. Это означает, что мелкие круглые клетки должны сначала трансформироваться в большие круглые клетки и что только после этого они могут начать распластываться, изменяя свою форму до вытянутой или звездчатой. На представленных графиках можно выделить хотя и небольшие, но автономные группы мелких круглых клеток (указаны стрелками). Особенно отчетливо они проявляются при использовании в качестве подложки коллагена. С увеличением времени культивирования доля таких круглых клеток снижается.

Небольшое количество мелких круглых клеток затрудняет их восприятие как автономную субпопуляцию, причем именно в контроле, где доля таких клеток больше, чем при их распластывании на коллагене. Однако показать, что эти клетки составляют отдельную (автономную) субпопуляцию, можно, увеличив выборку за счет сложения всех временных выборок как для контроля, так и для опыта. Это удобнее делать, используя параметр площади клетки, потому что как в контроле, так и в опыте основная масса клеток по этому параметру выходит на плато уже через полчаса. Результат показан на рис. 3.

Были построены гистограммы с использованием в контроле приблизительно 2700 клеток, а в опыте почти

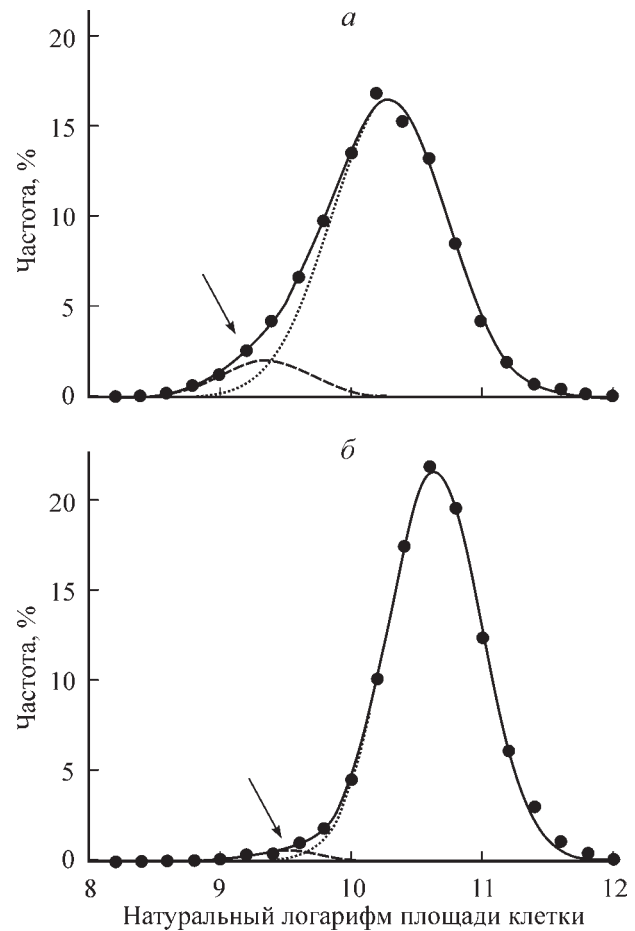


Рис. 3. Гистограммы распределения площади клеток, культивируемых на пластике (а) и коллагене I типа (б).

Суммированы выборки всех временных точек соответственно для контроля (пластик) и опыта (коллаген). Для построения суммарной теоретической кривой (сплошная линия) использовано нормальное распределение (суммируемые кривые — пунктирные линии). Стрелкой указан «пик», соответствующий мелким круглым клеткам.

8000. Такая большая выборка позволила увеличить число разрядов гистограмм до 20 без снижения точности конечного результата. Значения площади клеток в пикселях были переведены в значения натуральных логарифмов (рис. 2). Для регрессии использовали нормальное распределение. Общая теоретическая кривая как в том, так и в другом случае наиболее адекватно соответствует экспериментальным значениям при использовании двух автономных кривых («пиков»). Коэффициент линейной корреляции как для контрольных значений, так и для опытных равен 0.998, что говорит об очень высокой степени соответствия теоретических значений экспериментальным. Расчет средних значений для «пиков» (т. е. групп мелких круглых клеток и всех остальных) в контроле составил 9.3 и 10.4, в опыте — 9.5 и 10.6, что говорит о фактически качественной идентичности соответствующих субпопуляций клеток в обоих случаях. Однако соотношение числа клеток между этими группами заметно различно в контроле и опыте: 8.7 и 91.3 % для клеток на пластике, 1.9 и 98.1 % для клеток на коллагене. Таким образом, субпопуляция мелких круглых клеток при использовании пластика не менее чем в 4 раза больше такой же субпопуляции при культивировании клеток на коллагене.

Обсуждение

Работы по изучению морфологии клеток при их распластывании на различных белках внеклеточного матрикса ведутся больше 10 лет (Ara et al., 2001). Ранее для изучения процессов распластывания мезенхимных клеток человека мы использовали подложки из таких компонентов внеклеточного матрикса, как матригель и ламинин (Petrov et al., 2007). В настоящей работе в качестве подложки был взят только коллаген I типа, но полученный из разных источников. И хотя известно, что телачий (щелочно-солевой) коллаген I типа уже был использован в качестве субстрата при культивировании фибробластов и кератиноцитов человека (Hattori et al., 1999), данных о культивировании клеток на подложке из растворимого коллагена I типа овцы у нас нет. Кроме того, нет данных о культивировании мезенхимных клеток на каких-либо коллагенах, полученных щелочно-солевым методом. Поэтому в дополнение к основной была выполнена задача о влиянии коллагена I типа из различных источников на распластывание клеток.

Ранее подобная работа была выполнена на стромальных клетках костного мозга крысы (Бармашева и др., 2009, с. 41, 45). Также был использован коллаген I типа разного происхождения (из крысы, овцы и быка) и разного гелеобразующего состояния (желирующей и нежелирующей). Авторы пишут о том, что «наибольшее распластывание стромальных клеток костного мозга... наблюдается на образцах» «желирующих коллагенов». Такое заключение нельзя считать правомерным, поскольку приводимые в этой статье экспериментальные данные по измерению площади клеток и их периметра не имеют статистически значимых различий. Как указывают сами авторы, «разница... находится... в пределах статистической ошибки». Это могло бы быть связано с недостаточной выборкой (авторы использовали лишь по 50 клеток на каждый образец коллагена) и с тем, что была использована одна временная точка (1 ч после посева).

В настоящей работе количество клеток как в контроле, так и для каждого образца коллагена было более 2000. И тем не менее различий в распластывании клеток между коллагенами нами получено не было. Еще один принципиальный момент связан с тем, что в цитируемой статье клетки высевали на подложку из коллагена, используя бескывороточную среду, а в нашей работе — с обычным содержанием сыворотки. Однако вряд ли это методическое различие могло внести существенный вклад в конечный результат. Как известно, клетки начинают вырабатывать собственные белки внеклеточного матрикса уже через 30 мин после посева. Кроме этого, наличие сыворотки в среде, являясь фоном, не мешает обнаружению различий в распластывании клеток на пластике и коллагене (как и на других белках).

Принципиальных различий между коллагеном I типа разного происхождения относительно его влияния на распластывание мезенхимных клеток человека не выявлено. Кроме того, полученные нами данные о распластывании клеток не связаны с видовой принадлежностью данного белка.

Падая в условия культуры в виде сфер, клетки должны сначала прикрепиться к субстрату, а затем, начав распластывание, уже изменять свою форму. Это известно всем, кто работает с клеточными культурами. Исключения крайне редки — например, мышинные клетки линии L, адаптированные к суспензионному состоянию, и

LS-клетки (Петров и др., 1981; Андреева и др., 1987). Однако вопрос о том, как осуществляется переход от сферического состояния к распластанному для клеток, образующих в культуре монослой, не так очевиден, как может показаться. В сферической клетке отсутствует выраженный цитоскелет, который является обязательной функциональной структурой для всех распластных клеток (Fletcher, Mullins, 2010; Parsons et al., 2010). Следовательно, вопрос об адаптации клеток к условиям культуры в определенной степени сводится к закономерностям формирования цитоскелета. Эта ситуация неординарная для клеток многоклеточного организма, у которых полной разборки цитоскелета у большинства клеток происходить не должно. Можно предположить, что в культуре возможны два варианта адаптации — либо каждый тип клеток адаптируется к условиям *in vitro* специфическим образом, либо существуют общие для всех клеток закономерности перехода от нераспластанного состояния к распластанному.

Полученные нами ранее данные (Petrov et al., 2007) и результаты настоящей работы скорее говорят в пользу того, что такая адаптация идет по второму варианту. МКЭЧ в культуре обнаруживают значительную морфологическую вариабельность. Тем не менее эти клетки после адгезии проявляют одинаковые признаки перехода от сферического состояния к распластанному. При этом они не могут изменить свое состояние прямым переходом от мелких круглых клеток сразу к поляризованной или звездчатой форме распластных клеток. Они сначала должны распластаться, приняв равномерно уплощенную форму, т. е. перейти в состояние больших круглых клеток, имеющих коэффициент распластывания порядка 1.05, и только после этого начинают распластываться, принимая различные варианты полигональной формы.

Такая феноменология распластывания указывает на то, что оба типа круглых клеток в своей основе должны иметь разные механизмы изменения клеточной формы. Поскольку форма клеток детерминирована главным образом цитоскелетом, можно предположить, что существуют как минимум два автономных механизма цитоскелетных перестроек. По-видимому, начало полимеризации глобулярного актина в сферических клетках происходит таким образом, что сначала формируется круговая ламелла, в результате чего появляются большие круглые клетки. И только после образования такой ламеллы может начаться процесс формирования филоподий, приводящий к формированию поляризованных или звездчатых клеток. Что при этих процессах является первичным — физико-химические свойства актина или детерминация его полимеризации какими-то клеточными структурами — по представленным здесь данным сказать нельзя.

В любом случае большие круглые клетки, входя в состав распластных клеток, не имеют признаков автономной субпопуляции, т. е. по сути они органически входят в субпопуляцию клеток с высокими значениями коэффициента распластывания. В отличие от них мелкие круглые клетки, обнаруживая признаки автономности, должны обладать, по-видимому, качественно иной внутренней структурой. Возможно, функционально это те же сферические клетки (без фибриллярного цитоскелета), которые после адгезии под действием, например, гравитации, оброчно говоря, расплющиваются подобно амебам. Это может означать, что после прикрепления переход клеток от сферического состояния к состоянию мелких круглых клеток, возможно, сопровождается изменением плазматиче-

ческой мембраны, которая становится более лабильной (менее ригидной), возможно, как раз из-за отсутствия жестких цитоскелетных структур.

Это объяснение, судя по данным Альбрехт-Бюхлера (Albrecht-Buehler, 1976), может быть реальным. Изучая начальные фазы распластывания клеток 3T3 автор обнаружил, что перед распластыванием (образованием широкой ламеллы) эти клетки периодически выпускают по всему периметру мелкие филоподии, как бы анализируя окружающую их среду. Не исключено, что и клетки МКЭЧ в наших экспериментах проявляют то же свойство, т. е. мелкие круглые клетки — это клетки с небольшими филоподиями, периодически возникающими с большой частотой по всему клеточному периметру.

В контроле мелкие круглые клетки определяются не так отчетливо (автономно), как на подложке из коллагена, хотя их количество в каждый данный момент времени больше, чем в популяции тех же клеток, распластывающихся на белке. Кроме того, основной пик (рис. 3) в контроле шире, чем в опыте, именно потому, что в этой субпопуляции много больших круглых клеток. Поскольку как в контроле, так и в опыте были одни и те же клетки (МКЭЧ), очевидно, что формирование отдельных клеточных субпопуляций по морфологическим признакам детерминировано не их генетической специфичностью, а специфичностью и относительной независимостью механизмов, контролирующей форму клеток в зависимости от изменения внешних условий. Это означает, что субстрат не может принципиально изменить внутреннее состояние клеток, но может изменить время запуска и длительность функционирования механизмов, ответственных за распластывание клеток того или иного типа. В какой степени и как долго такой эффект будет оставаться на уровне функционального состояния (т. е. обратимого) для данного типа клеток, прогнозировать сложно. Однако сам факт такого явления должен приниматься во внимание, например, при направленной дифференцировке стволовых клеток, что в настоящее время весьма актуально.

Список литературы

- Андреева Е. В., Петров Ю. П., Семенова Е. Г. 1987. Изменения кариотипа и поверхностных свойств L-клеток во время адаптации суспензионной культуры к росту в монослое. Цитология. 29 (6) : 684—688.
- Бармашева А. А., Шарутина И. А., Николаенко Н. С., Кухарева Л. В., Шамолина И. И., Пинаев Г. П. 2009. Культивирование стромальных клеток костного мозга крысы на коллагене I типа разного происхождения. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 4 (4) : 41—47.
- Истранов Л. П., Бондарева Л. Н. 1969. Использование коллаген-содержащего сырья для медицинских и микробиологических целей. В кн.: Лекарственные средства, экономика, технология и перспективы получения. Обзорная информация. Вып. 4. М. 1—35.
- Петров Ю. П., Андреева Е. В., Пинаев Г. П. 1981. Противоточное распределение клеток монослойной и суспензионной культур линии L в двухфазной полимерной системе. Цитология. 23 (10) : 1188—1192.
- Швед Ю. А., Кухарева Л. В., Зорин И. М., Блинова М. И., Билибин А. Ю., Пинаев Г. П. 2007. Взаимодействие культивируемых клеток кожи с разными структурными формами коллагена, нанесенного на полиакрилатидную матрицу. Цитология. 49 (1) : 32—39.
- Albrecht-Buehler G. 1976. Filopodia of spreading 3T3 cells. J. Cell Biol. 69 : 275—286.
- Are A., Pinaev G., Burova E., Lindberg U. 2001. Attachment of A431 cells on immobilized antibodies to the EGF receptor promotes cell spreading and reorganization of the microfilament system. Cell Motil. Cytoskeleton. 48 : 24—36.
- Augello A., Kurth T. B., De Bari C. 2010. Mesenchymal stem cells: a perspective from *in vitro* cultures to *in vivo* migration and niches. Eur. Cell Mater. 20 : 121—133.
- Chandrakasan G., Torchia D. A., Piez K. A. 1976. Preparation of intact monomeric collagen from rat tail tendon and skin and the structure of the nonhelical ends in solution. J. Biol. Chem. 251 : 6062—6067.
- Fletcher D. A., Mullins R. D. 2010. Cell mechanics and the cytoskeleton. Nature. 463 : 485—492.
- Hattori S., Adachi E., Ebihara T., Shirai T., Someki I., Irie S. 1999. Alkali-treated collagen retained the triple helical conformation and the ligand activity for the cell adhesion via $\alpha 2\beta 1$ integrin. J. Biochem. 125 : 676—684.
- Kuz'minykh E. V., Petrov Y. P. 2004. A simple model for the study of effects of the extracellular matrix on the cell morphology *in vitro*. Biochim. biophys. acta. 1671 : 18—25.
- Mauney J., Volloch V. 2009. Collagen I matrix contributes to determination of adult human stem cells lineage via differential, structural-conformation specific elicitation of cellular stress response. Matrix Biol. 28 : 251—262.
- Mercier I., Lechaire J.-P., Desmoullier A., Gaill F., Aumailley M. 1996. Interactions of human skin fibroblasts with monomeric or fibrillar collagens induce different organization of the cytoskeleton. Exp. Cell Res. 225 : 245—256.
- Parsons J. T., Horwitz A. R., Schwartz M. A. 2010. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 11 : 633—643.
- Patel M., Yang S. 2010. Advances in reprogramming somatic cells to induced pluripotent stem cells. Stem Cell Rev. 6 : 367—380.
- Petrov Yu. P., Krylova T. A., Tsupkina N. B., Pershina V. P. 2007. Spreading as a general attribute of cell population. J. Biol. Sci. 7 : 102—112.
- Placzek M. R., Chung I. M., Macedo H. M., Ismail S., Mortera Blanco T., Lim M., Cha J. M., Fauzi I., Kang Y., Yeo D. C., Ma C. Y., Polak J. M., Panoskaltis N., Mantalaris A. 2009. Stem cell bioprocessing: fundamentals and principles. J. R. Soc. Interface. 6 : 209—232.
- Reimann V., Creutzig U., Kögler G. 2009. Stem cells derived from cord blood in transplantation and regenerative medicine. Dtsch. Arztebl. Int. 106 : 831—836.
- Salem H. K., Thiemermann C. 2010. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. Stem Cells. 28 : 585—596.
- Shoulders M. D., Raines R. T. 2009. Collagen structure and stability. Annu. Rev. Biochem. 78 : 929—958.
- Strom S. C., Michalopoulos G. 1982. Collagen as a substrate for cell growth and differentiation. Meth. Enzymol. 82 : 544—555.
- Suzuki Y., Someki I., Adachi E., Irie S., Hattori S. 1999. Interaction of collagen molecules from the aspect of fibril formation: acid-soluble, alkali-treated, and MMP1-digested fragments of type I collagen. J. Biochem. 126 : 54—67.

TWO SPREADING STATES OF MESENCHYMAL CELLS OF THE HUMAN EMBRYO *IN VITRO**T. A. Krylova,¹ L. V. Kukhareva, Yu. P. Petrov*Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
e-mail: takrylova@mail.ru

Spreading mesenchymal cells of human embryo on plastic and type I collagens (from rat, sheep and bull) was studied. Spreading of the cells on collagens was stronger than that in the control but no differences between the different collagens were revealed. The cell perimeter, the spreading coefficient and the cell projection area on the substrate were used as morphometric parameters. The spreading of cells was monitored for 0.5—2 h after plating. During the spreading both on plastic and on collagen, the groups of small cells were revealed as separate subpopulations. As a whole, such cells comprehend 9 % of the cell population in the control and 2 % in experiment. We assume that this cell type is associated with a special independent functional state of the cells that precedes cell spreading.

Key words: cell area, cell perimeter, spreading coefficient, type I collagen, subpopulation.
