

## АНАЛИЗ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА КЛЕТОК ПОСТОЯННОЙ ЛИНИИ L-929

© Ю. П. Петров,<sup>1</sup> \* Ю. А. Негуляев,<sup>1, 2</sup> Н. В. Цупкина<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,

и <sup>2</sup> Кафедра физико-химической биологии клетки

С.-Петербургского государственного политехнического университета

\* электронный адрес: [yure3ov@mail.ru](mailto:yure3ov@mail.ru)

С помощью цейтраферной видеосъемки проведено прямое измерение продолжительности клеточного цикла на клетках линии L-929. Продолжительность цикла составила  $15.77 \pm 0.08$  ч, стандартное отклонение —  $1.54 \pm 0.06$  ч. Экспериментальные значения описываются нормальным распределением с коэффициентом корреляции 0.999. Высокая степень гомогенности по данному параметру и широкий диапазон вариабельности кариотипа (58—66 хромосом) указывают на отсутствие связи между этими характеристиками клеток L-929. Кроме этого, показано, что разность между продолжительностями клеточного цикла дочерних клеток стремится к 0 и описывается экспонентой.

Ключевые слова: клеточный цикл, дочерние клетки, биоценоз.

Применение метода цейтраферной киносъемки для исследования живых клеток открыло возможности для прямого измерения продолжительности клеточного цикла (Альбертс и др., 1993). Однако эти возможности не были полностью реализованы, поскольку наибольшее распространение получили такие методы изучения клеточного цикла, как мечение делящихся клеток бромдезоксисуридином или <sup>3</sup>H-тимидином и проточная цитофлуориметрия. Оба метода относительно просты, доступны и удовлетворяют большинству исследований различных клеток. Основное достоинство этих методов — возможность измерения продолжительности не только всего клеточного цикла, но и его отдельных фаз, однако с довольно высокой ошибкой измерения — до 10—20 % (Baisch, Konig, 1980; Baisch et al., 1982). Недостаток — получение усредненных значений продолжительности клеточного цикла у групп клеток. Это означает, что исключается возможность учета индивидуальных вариаций отдельно взятых клеток, поэтому измерение длительности цикла носит не прямой, а опосредованный характер. Кроме того, вносятся дополнительные факторы, которые могут исказить нативные свойства клеточной популяции, — синхронизация клеточной культуры, добавление радиоактивной метки, введение флуоресцентной метки и т. п.

Современная цейтраферная видеосъемка с получением цифровых изображений (imaging) и их последующая компьютерная обработка могут в ряде случаев оказаться более информативными, чем общепринятые методы изучения клеточного цикла. Преимущество этого метода связано с возможностью прямого измерения клеточного цикла отдельных клеток и, как следствие, анализа его у пар дочерних клеток. Задача настоящей работы: используя преимущества цейтраферной видеосъемки при исследовании отдельных клеток, проверить наличие связи между

продолжительностью клеточного цикла и вариабельностью кариотипа клеток постоянной линии L-929 (кариотип 58—66 хромосом).

### Материал и методика

В качестве объекта исследования использовали постоянную клеточную линию L-929 (NCTC клон 929, мышь), полученную из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН (Санкт-Петербург).

Клетки культивировали в пластиковых чашках Петри (35 мм; Nunk, Дания) на среде ДМЕМ (Gibco, США), содержащей 10 % эмбриональной сыворотки коров (Gibco, США) и 100 мкг/мл гентамицина, в атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub> при 37 °С. Перед видеосъемкой несинхронизированную популяцию клеток рассеивали в виде колоний следующим образом. На дно чашки Петри наносили суспензию клеток в виде капель — 4 капли диаметром ~2 мм на расстоянии 1.5 см друг от друга (в вершинах углов воображаемого квадрата). Чашку помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор на 1 ч, чтобы клетки могли прикрепиться к подложке, а затем добавляли питательную среду и культивировали при стандартных условиях.

Через 24 ч после посева чашку с клетками помещали на столик микроскопа AxioObserver.Z1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Германия), оборудованного устройствами для долговременного прижизненного наблюдения за клетками (поддержание температуры, влажности и CO<sub>2</sub>). Регистрацию изображений проводили в течение 1 сут в режиме цейтраферной съемки с 5-минутным интервалом между кадрами. Использовали объектив Plan-Neofluar 20/0.4× и цифровую камеру AxioCam HRm с разрешени-

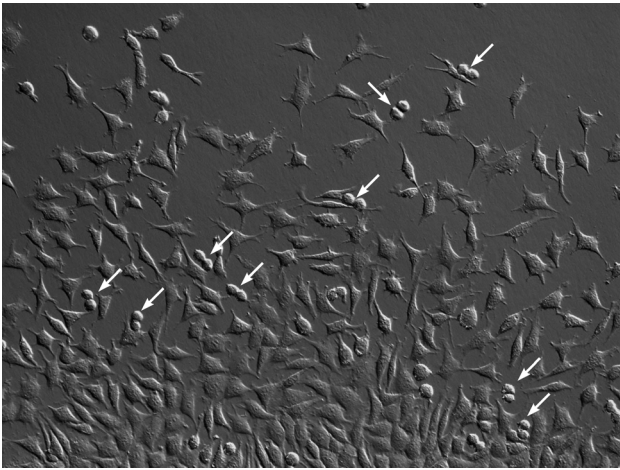


Рис. 1. Клетки линии L-929, мигрирующие из колонии и интенсивно пролиферирующие по ее краю.

Стрелками указаны пары дочерних клеток на стадии телофазы.

ем  $1388 \times 1040$  пикселей. Метод наблюдения — дифференциальный интерференционный контраст, адаптированный для работы с пластиком (PLASDIC). Заданные условия эксперимента поддерживали автоматически программой AxioVision 4.8.2 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Германия). Для количественного анализа использовали отдельные изображения, записанные в формате JPEG. Число колоний на чашке, равное четырем, позволяло одновременно регистрировать максимально возможное число полей зрения и иметь повторности для адекватной статистической обработки групп клеток, находящихся в одинаковых условиях культивирования. Поля для видеосъемки выбирали по краю колоний (рис. 1). Именно на таких участках мигрирующие из колонии клетки проявляли свою наибольшую митотическую активность.

Для анализа использовали только те делящиеся клетки, для которых можно было проследить вхождение в митоз дочерних клеток (даже одной из них). Зная время между отдельными изображениями (5 мин), подсчитывали продолжительность клеточного цикла отдельных клеток. Время фиксировали между двумя митозами, когда отчетливо формировалась борозда деления на стадии телофазы. Общее число проанализированных клеток составило 357, а число пар дочерних клеток — 149. Для статистической обработки данных использовали Excel 2007 (MS Corporation, США) и Origin 6.1 (OriginLab Corporation, США).

## Результаты

Расчеты показали, что средняя продолжительность клеточного цикла клеток L-929 составляет  $15.77 \pm 0.08$  ч, стандартное отклонение —  $1.54 \pm 0.06$  ч (меньше 10%). Большинство клеток этой выборки состояло из дочерних (сестринских) клеток. Предположим, сестринские клетки с большей длиной клеточного цикла отличаются от своих пар с меньшей длиной цикла какими-то общими наследственными характеристиками, т. е. генетически такие пары относятся к разным выборкам. Тогда велика вероятность того, что они будут различаться не только по среднему значению продолжительности клеточного цикла, но и по стандартному отклонению. На рис. 2 показано, что этого не происходит. Стандартные отклонения не имеют

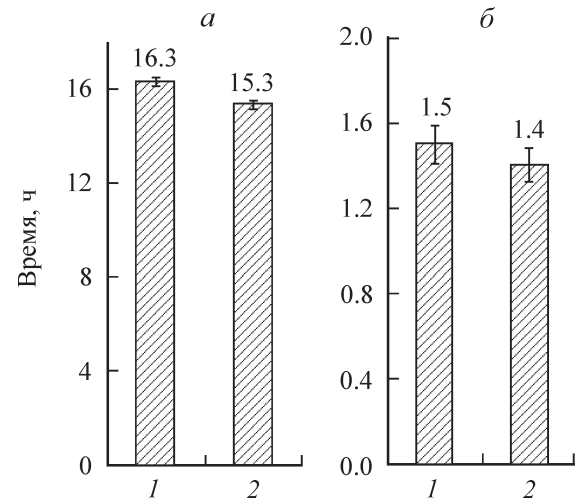


Рис. 2. Продолжительность клеточного цикла клеток L-929.

*а* — среднее значение, *б* — стандартное отклонение. Столбики 1 и 2 — дочерние клетки с большей и меньшей длинами цикла соответственно.

достоверных различий ( $1.50 \pm 0.08$  и  $1.40 \pm 0.08$ ). Поэтому есть основания считать, что все клетки по данному параметру (продолжительности клеточного цикла) относятся к одной и той же выборке. Низкие значения стандартного отклонения по отношению к среднему указывают на то, что такая выборка должна описываться нормальным распределением. На рис. 3 показана вариативность продолжительности клеточного цикла всей изученной выборки клеток. Обращает на себя внимание то, что по параметру продолжительности клеточного цикла популяция L-клеток очень гомогенна. Исключение составляет небольшая группа клеток (всего 2% от всех делящихся клеток) с более продолжительным клеточным циклом.

Средняя разность продолжительности клеточного цикла для пар дочерних клеток оказалась небольшой ( $1.05 \pm 0.07$  ч) и составила всего  $6.6 \pm 0.4$  % от средних.

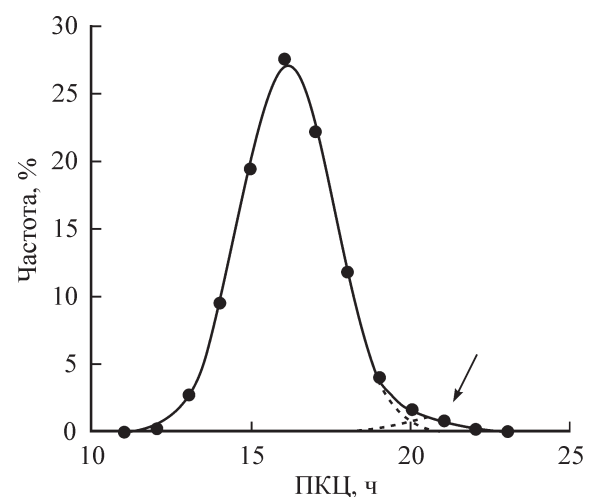


Рис. 3. Продолжительность клеточного цикла несинхронизированной культуры клеток линии L-929.

Для анализа экспериментальных значений (кружки) использовали нормальное распределение (сплошная линия), состоящее из двух пиков (пунктирные линии) — большого, 98% клеток, и малого (указан стрелкой), 2% клеток. Общее число клеток — 357. Среднее значение большого пика равно 16.1 ч, малого — 20.4 ч. Коэффициент линейной корреляции равен 0.999.

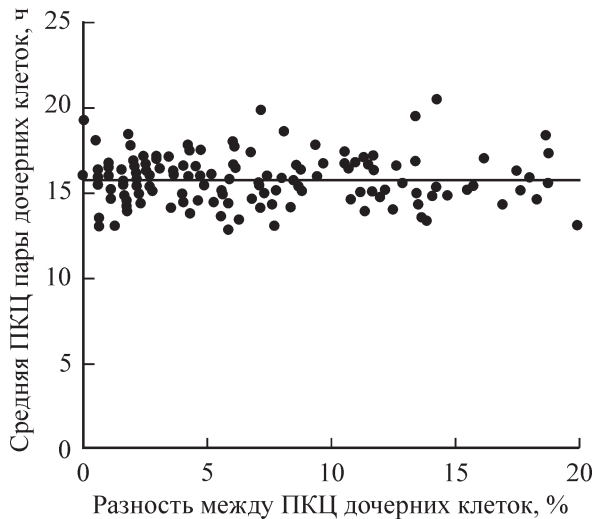


Рис. 4. Отсутствие корреляции между средней продолжительностью клеточного цикла (ПКЦ) пары дочерних клеток и значениями разности циклов этих же пар клеток.

Коэффициент линейной корреляции равен 0.0001.

Стабильность этого параметра (разности) и независимость его от средней продолжительности клеточного цикла соответствующих пар дочерних клеток представлены на рис. 4. Однако несмотря на стабильность и небольшую величину средней разности циклов дочерних клеток, этот параметр имеет высокое значение стандартного отклонения — 0.8 ч, соизмеримое с самим средним значением (1.05 ч). Это указывает на то, что вариации разности клеточных циклов дочерних клеток, скорее всего, описываются зависимостью отличной от нормального распределения. На рис. 5 представлена гистограмма соотношения частот разностей продолжительности клеточного цикла между парами дочерних клеток. Она наглядно демонстрирует, что число пар дочерних клеток уменьшается экспоненциально по мере увеличения разности между продолжительностью их клеточного цикла.

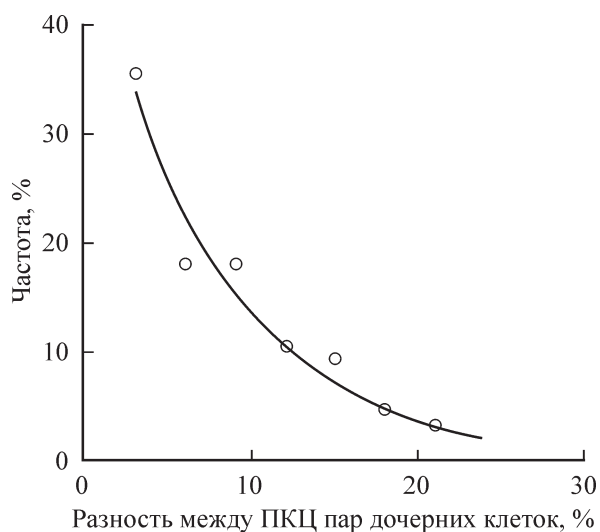


Рис. 5. Соотношение частот разностей продолжительности клеточного цикла (ПКЦ) между парами дочерних клеток.

Значения разностей выражены в % по отношению к среднему значению ПКЦ соответствующих пар дочерних клеток. Экспериментальные значения — кружки. Теоретические значения (экспонента) — сплошная линия. Коэффициент корреляции равен 0.95.

## Обсуждение

Клеточный цикл — фундаментальное биологическое явление, поэтому работ по его изучению очень много. В настоящей работе мы коснулись лишь одного из аспектов этого явления, важного для понимания биологии культивируемых клеток, в частности клеток линии L-929, — анализу продолжительности клеточного цикла. Несмотря на то что этот параметр (продолжительность) отражает лишь формальную сторону процесса клеточной пролиферации, он важен для изучения культивируемых клеток как автономных биологических систем.

Будучи изолированными от других форм жизни культуральным сосудом, клетки постоянных линий можно рассматривать как самодостаточные клеточные популяции. Строго говоря, термин «популяция», согласно теории эволюции, правомерен лишь для организмов, размножающихся половым путем (Тимофеев-Ресовский и др., 1977). Тем не менее в среде биологов, работающих с клеточными культурами, этот термин стал общепринятым. И это связано не только с формальным пониманием популяции клеток как группы однородных объектов, но во многом и с тем, что постоянные клеточные линии по своим биологическим особенностям имеют много общего с истинными популяциями живых организмов.

Все постоянные клеточные линии, в том числе и линию L-929, культивируют в разных лабораториях мира в течение десятков лет. Длительность культивирования, а также относительная автономность от внешних условий позволяют рассматривать постоянные линии клеток как самостоятельные биоценозы. Это означает, что такие клеточные популяции имеют свои биологические особенности. Таким образом, прикладной метод культивирования клеток *in vitro* может быть расширен до самостоятельного раздела биологии — биологии клетки в культуре.

Если исходить из аналогии биоценоза клеток в культуре с биоценозами в привычном для нас понимании, то в первую очередь следует обратить внимание на биоразнообразие. Биоценоз как совокупность различных видов предполагает, что у особей, входящих в него, имеется разное число хромосом. Все постоянные клеточные линии всегда имеют в своем составе клетки с различным числом хромосом (Мамаева, 1996). По данным Банка клеточных культур Института цитологии РАН, изменчивость клеток L-929 по числу хромосом составляет 58—66, модальный класс — 64—65, а количество маркерных хромосом равно 29. При стандартных условиях культивирования этот состав клеток остается постоянным, как и любой обычный биоценоз при сбалансированном составе числа видов и отдельных особей. Важно и то, что при смене условий культивирования хотя и происходит изменение обычного соотношения клеток с разным числом хромосом, его постоянство со временем восстанавливается (Семенова и др., 1984; Полянская и др., 2005, 2008).

Одним из важных параметров, способствующих выживанию любого вида в биоценозе, является скорость размножения. Виды, для которых вероятность гибели отдельных особей высока, при размножении дают не только большее потомство, но и имеют более короткое время генерации. Этот процесс регулируется на уровне генома. В то же время основа биологической изоляции — различное число хромосом у особей разных видов. Следовательно, автономность вида детерминирована числом хромосом, а выживаемость — геномом. Конечно, проводить полную аналогию между видами в биоценозе и сообществе

вом культивируемых клеток в чашке Петри нельзя. Однако, как хорошо известно, только при замене обычного диплоидного набора хромосом на вариабельный клетки в культуре становятся способными к длительному выживанию (Вахтин, 1980). Формально такой переход можно рассматривать как вариант увеличения биоразнообразия, что должно способствовать стабильности биоценоза. Сказанное наводит на мысль о том, что клетки с разным числом хромосом должны иметь разное время генерации, т. е. разную продолжительность клеточного цикла.

Тем не менее представленные в настоящей работе данные говорят о том, что мы не можем выделить отдельные субпопуляции L-клеток с различной длительностью клеточного цикла (как исключение можно отметить 2%-ную субпопуляцию; см. рис 3). Напротив, по этому признаку клетки оказываются очень гомогенной структурой, о чем свидетельствует незначительная дисперсия этого параметра (стандартное отклонение менее 10 % от среднего). В 1976 г. Редди с коллегами исследовал различные характеристики 4 сублиний этого же клона клеток L-929 линии NCTC (Reddy et al., 1976). Авторами, в частности, не было выявлено различий между сублиниями по времени удвоения числа клеток во время роста культуры, но были обнаружены изменения в составе хромосом. По сути этот результат совпадает с нашими данными. На основании этого и большой вариабельности хромосомного состава клеток L-929 можно прийти к выводу о том, что для клеток постоянной линии число хромосом не детерминирует продолжительность клеточного цикла. В обычных биоценозах, несмотря на различие видов по числу хромосом, корреляции между продолжительностью жизни и кариотипом тоже не прослеживаются.

Данные по сравнению продолжительности клеточного цикла у дочерних клеток («близнецов») указывают на две особенности. Во-первых, варьирование различий дочерних клеток по длительности их цикла не зависит от его абсолютной величины, являясь очень стабильной характеристикой для всех клеток ( $6.6 \pm 0.4$  %) данной популяции. Во-вторых, определяется явная тенденция к одной и той же продолжительности клеточного цикла у дочерних клеток. И это указывает на то, что детерминация клеточного цикла связана с клеточной наследственностью, т. е. с геномом (но не с числом хромосом), поскольку априори можно считать, что генетическая информация дочерних клеток имеет большее сходство по сравнению с любыми другими клетками.

В заключение следует подчеркнуть, что представленные в настоящей работе данные получены прямым измерением продолжительности клеточного цикла на несинхронной культуре нативных клеток, что можно рассматривать как важный момент надежности этих данных.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

#### Список литературы

- Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Д. 1993. Молекулярная биология клетки. М.: Мир. 2: 539 с.
- Вахтин Ю. Б. 1980. Генетическая теория клеточных популяций. Л.: Наука. 168 с.
- Мамаева С. Е. 1996. Закономерности кариотипической эволюции клеток в культуре. Цитология. 38 (8): 787—814.
- Полянская Г. Г., Горячая Т. С., Пинаев Г. П. 2005. Влияние иммобилизованного фибронектина на кариотипическую изменчивость в клеточной сублинии фибробластов кожи индийского мунджака. Цитология. 47 (10): 925—932.
- Полянская Г. Г., Горячая Т. С., Пинаев Г. П. 2008. Влияние иммобилизованного ламинина на кариотипическую изменчивость в двух кариотипически различных вариантах клеточной линии фибробластов кожи индийского мунджака. Цитология. 50 (11): 988—998.
- Семенова Е. Г., Хоменко А. В., Мамаева С. Е. 1984. Изменение продолжительности клеточного цикла и кариотипа клеток L мыши при смене способа культивирования. Цитология. 26 (10): 1156—1160.
- Тимофеев-Ресовский Н. В., Воронцов Н. Н., Яблоков А. В. 1977. Краткий очерк теории эволюции. М.: Наука. 297 с.
- Baisch H., Beck H. P., Christensen I. J., Hartmann N. R., Fried J., Dean P. N., Gray J. W., Jett J. H., Johnston D. A., White R. A., Nicolini C., Zeitz S., Watson J. V. 1982. A comparison of mathematical methods for the analysis of DNA histograms obtained by flow cytometry. Cell Tissue Kinet. 15: 235—249.
- Baisch H., König K. 1980. Analysis of flow cytometric data of irradiated cell populations. Radiat. Environ. Biophys. 18: 267—274.
- Reddy S. B., Linden W. A., Lubbers K. 1976. A comparative study of four sublines of mouse fibroblast cells. Acta Histochem. 56: 115—119.

Поступила 5 X 2011

#### ANALYSIS OF THE CELL CYCLE DURATION OF CELLS OF PERMANENT LINE L-929

Yu. P. Petrov,<sup>1,\*</sup> Yu. A. Negulyaev,<sup>1,2</sup> N. V. Tsupkina<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg  
and <sup>2</sup> Chair of Physical and Chemical Biology of the Cell of St. Petersburg State Polytechnical University;  
\* e-mail: yupe3ov@mail.ru

The direct measurement of the cell cycle duration in L-929 cells was performed using time-lapse photography. The cell cycle duration was  $15.77 \pm 0.08$  h with a standard deviation of  $1.54 \pm 0.06$  h. The experimental value fit to a normal distribution with a correlation coefficient 0.999. High homogeneity of this parameter and a wide range of variability of the karyotype (58—66 chromosomes) indicate that there is no correlation between these characteristics of L-929 cells. It is also shown that the difference between cell cycle durations of daughter cells tent to zero and fits by an exponent.

Key words: cell cycle, daughter cells, biocenosis.