

ОЦЕНКА СХОДСТВА В РАСПЛАСТЫВАНИИ ДОЧЕРНИХ КЛЕТОК ЛИНИИ L-929 ПРИ ИХ МИГРАЦИИ ПО СУБСТРАТУ

© Ю. П. Петров,^{1,*} Ю. А. Негуляев,^{1,2} Н. В. Цупкина¹

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,

² Кафедра физико-химической биологии клетки

С.-Петербургского государственного политехнического университета;

* электронный адрес: yure3ov@mail.ru

С помощью цейтраферной видеосъемки исследовали динамику распластывания дочерних клеток сразу после митоза. Работа выполнена на несинхронизированной культуре клеток постоянной линии L-929. Цель работы: найти способы формализации для сравнения площади клеток при их движении по подложке; проверить, существуют ли закономерности изменения площади мигрирующих клеток. Для сравнения морфологии клеток введены два новых параметра — показатель идентичности (ПИ) и показатель синхронности (ПС). Для вычисления обоих параметров используются значения изменений во времени площади пары клеток. Первый показатель указывает на степень совпадения пар абсолютных значений площадей, а второй — на синхронность изменения площади клеток и не зависит от абсолютных ее значений. Оба показателя рассчитываются в процентах. Чем ниже эти показатели, тем выше степень сходства изменения во времени площадей пары анализируемых клеток. Для пар сестринских клеток оба показателя приблизительно в 1.5 раза ниже, чем при любых иных сочетаниях дочерних клеток. Полученные результаты указывают на неслучайный характер изменения морфологии клеток при их культивировании.

Ключевые слова: площадь клетки, клеточный цикл, показатель идентичности, показатель синхронности.

В процессе культивирования у клеток, как и у любого живого объекта, происходит изменение очень многих параметров. Некоторые из них можно регистрировать, не нарушая нативности клеток в течение длительного времени, с помощью цейтраферной видеосъемки и специального оборудования для поддержания жизнеспособности клеток. Наиболее простым и доступным для регистрации является площадь клетки (или, строго говоря, площадь проекции клетки на подложку). Поскольку этот параметр зависит от очень многих внутриклеточных процессов, его можно рассматривать как интегральную характеристику клетки.

Фибробластоподобные клетки, в частности клетки линии L-929, находятся в постоянном движении, что естественным образом приводит к непрерывному изменению их формы, а следовательно, и клеточной площади. Создается впечатление, что процесс распластывания клеток при их движении хаотичен. Хорошо известны исследования влияния внешних факторов, в частности белков внеклеточного матрикса, на распластывание клеток (Горелик и др., 1998; Арэ и др., 1999; Петухова и др., 2004; Dubin-Thaler et al., 2004; Kuz'minykh, Petrov, 2004; Petrov et al., 2007). Однако регистрируемые при этом изменения формы клеток являются индуцированными и не дают информации о том, насколько закономерны изменения площади клеток при их распластывании и движении в условиях обычного культивирования.

При миграции по субстрату площадь клетки и направление ее движения меняются постоянно даже в отсутст-

вие контактов как с другими клетками, так и с естественными препятствиями (стенками культурального сосуда). Проводя исследования в рамках биологии клетки в культуре, в настоящей работе мы поставили задачу проверить, существуют ли какие-либо общие закономерности изменения площади клеток при их распластывании и движении по обычному пластиковому субстрату чашки Петри. Для решения этой задачи анализировали площади пар дочерних клеток сразу после их образования и по возможности до вступления в следующий митоз. Такой подход основан на предположении, что у сестринских дочерних клеток большинство фенотипических проявлений детерминировано генетически в равной степени. Поскольку подобные работы на культивируемых клетках отсутствуют, параллельно была поставлена задача разработать методику сравнительного анализа площадей сестринских клеток.

Материал и методика

Для исследования была использована постоянная клеточная линия L-929 (NCTC линия, клон 929, мышь), полученная 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 % CO₂.

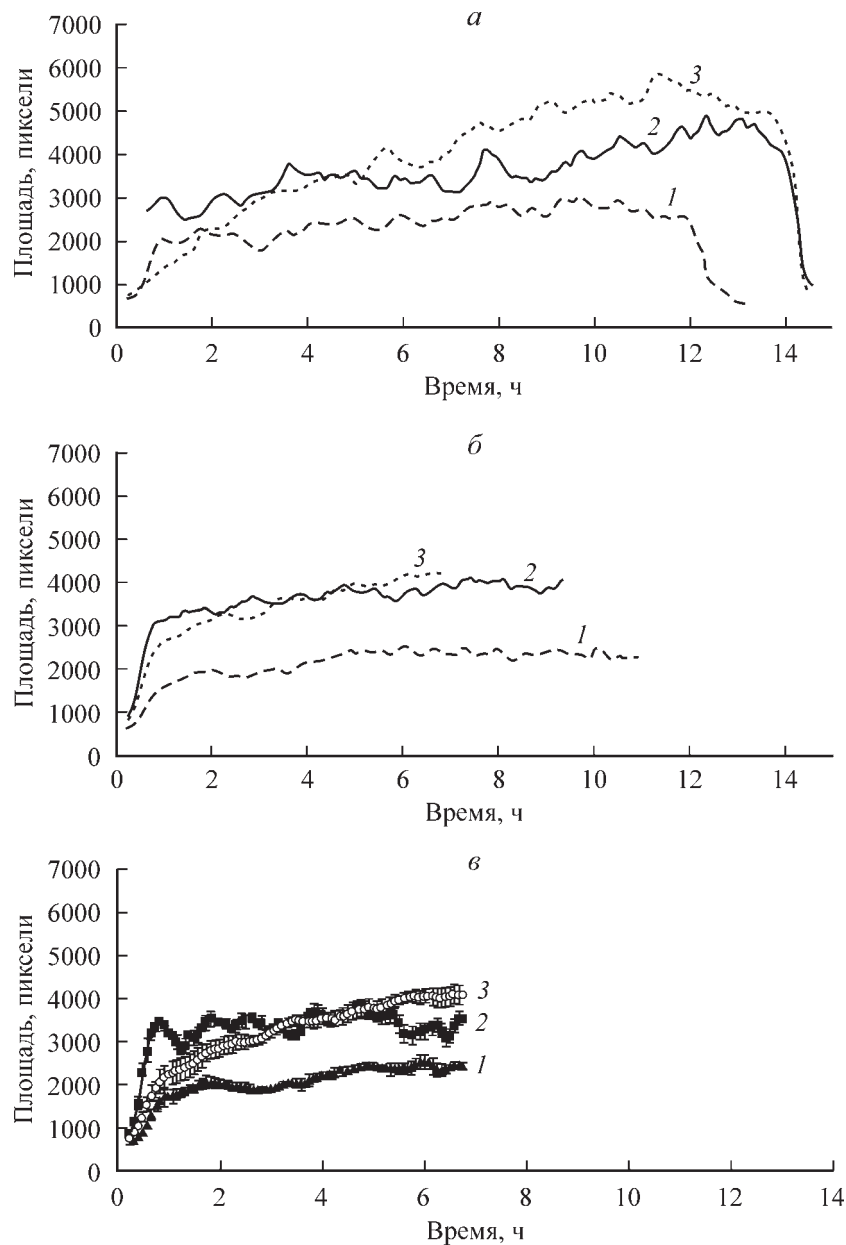


Рис. 1. Динамика изменения площади клетки на протяжении клеточного цикла.

а — каждая кривая (1—3) состоит из усредненных значений площади пар дочерних (сестринских) клеток от одного митоза до другого; *б* — то же, но усреднены значения площади соответствующих внучатых клеток (по 4 на точку); *в* — объединенные данные дочерних и внучатых клеток (по 6 на точку); представлены средние значения с соответствующими ошибками (вертикальные отрезки).

при 37 °С. По достижении субконфлюэнтного монослоя клетки пересеивали, а через 24 ч чашку с исследуемыми клетками помещали на столик микроскопа AxioObserver.Z1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Германия), оборудованного устройствами для длительного прижизненного наблюдения за клетками (поддержание температуры, влажности и CO₂).

Чтобы иметь достаточную выборку дочерних клеток, за которыми можно наблюдать от начала до завершения клеточного цикла, 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 разрешением 1388×1040 пикселей. Метод наблюдения — дифференциальный интерференционный контраст, адаптированный для работы с пластиком (PLASDIC). За-

данные условия эксперимента поддерживали автоматически программой AxioVision 4.8.2 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Германия). Для количественного анализа использовали отдельные изображения, записанные в формате JPEG.

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) измеряли площадь проекции клетки на подложку (Area, или A) на каждом цифровом изображении на протяжении всего клеточного цикла (от одной телофазы до другой). Анализировали пары дочерних клеток, полностью прошедшие клеточный цикл (всего 12 пар).

Статистическую обработку данных проводили, используя Excel 2007 (MS Corporation, США) и Origin 6.1 (OriginLab Corporation, США). Все кривые, представленные

ные в настоящей работе, получены в результате обработки оригинальных экспериментальных значений способом, известным в статистике как метод скользящей средней. Это сделано для того, чтобы уменьшить вклад излишних фоновых флуктуаций, в частности технических погрешностей при измерении клеток (контур клеток обводили вручную). Такая статистическая процедура, не «затушевывая» общие закономерности изменения площади клеток, способствует их лучшему проявлению.

Результаты

На рис. 1, *а* приведены примеры динамики изменения площади клеток от одного деления до другого. В каждом из трех случаев взяты средние значения площади двух соответствующих сестринских клеток. Видно, что хотя в целом площадь клеток увеличивается, ее флуктуации в каждом примере носят случайный характер, отражая индивидуальность кривых.

Рис. 1, *б* показывает изменение площади внучатых клеток соответствующих дочерних клеток (см. рис. 1, *а*). В данном случае кривые абортивные, поскольку общее время наблюдения не позволяло проследить за внучатыми клетками в течение их полного клеточного цикла (для клеток L-929 длина цикла в среднем равняется 16 ч). Здесь представлены средние значения по соответствующим четырем (на кривую) внучатым клеткам. Как видно на рис. 1, *б*, флуктуации заметно уменьшились, что вполне естественно при усреднении, однако важно, что внешний вид этих кривых соответствует кривым на рис. 1, *а*. Это уже достаточно весомый аргумент, с одной стороны, в пользу того, что три родительские клетки, от которых пошло все потомство, различались между собой, а с другой стороны, что их свойства, проявляющиеся в изменении площади клеток, наследуются их потомками. Формальную сторону этого утверждения доказывает рис. 1, *в*. Здесь представлены усредненные данные соответствующих дочерних и внучатых клеток, т. е. каждая кривая — это результат усреднения значений шести кривых. Достоверность различия этих кривых указывает на различие в изменении площади между родственными группами клеток по мере их продвижения по клеточному циклу. В целом данные рис. 1 говорят о том, что, несмотря на видимые хаотичные колебания значений площади клеток, она изменяется сходным образом у «близкородственных» клеток, т. е. эти изменения носят неслучайный характер.

Теперь необходимо ввести меру оценки степени сходства. Для этого можно воспользоваться различными общепринятыми статистическими критериями оценки вариант. Однако они достаточно формальны, что затрудняет их использование в данном случае, т. е. при очень выраженных естественных флуктуациях значений площади клеток при их миграции по подложке. Мы предлагаем свой способ оценки степени сходства площадей культивируемых клеток с введением двух новых параметров — показателя идентичности (ПИ) и показателя синхронности (ПС). Вычисление этих параметров с помощью компьютера не вызывает никаких трудностей, однако последовательность расчетов нуждается в пояснении. Для этого воспользуемся примером, приведенным на рис. 2 и в таблице.

Допустим, есть две кривые, отражающие динамику изменения во времени площади пары клеток (рис. 2, *а*). Однако эти кривые в оригинальном виде неудобны для

Пример расчета показателей идентичности и синхронности с использованием значений площади дочерних клеток, представленных на рис. 2

Номер	Значения кривой 1	Значения кривой 2	Разность	Среднее	Доля разности, %
5	1602	1637	35	1619	2.1
15	2144	1918	227	2031	11.2
25	2484	1929	555	2207	25.1
35	2516	2170	346	2343	14.8
45	2450	1932	517	2191	23.6
55	2965	2435	530	2700	19.6
65	3001	3140	140	3070	4.5
75	2622	2989	366	2805	13.1
85	2794	2988	194	2891	6.7
95	2239	3046	808	2642	30.6
105	2783	2642	141	2712	5.2
115	2798	2638	160	2718	5.9
125	2614	2162	452	2388	18.9
135	2707	2374	333	2540	13.1
145	2414	1996	419	2205	19.0
155	2840	2033	806	2437	33.1
165	2882	1911	972	2396	40.5
175	2960	2116	844	2538	33.3
				ПИ	17.8
				ПС	11.4

Примечание. ПИ — показатель идентичности, ПС — показатель синхронности. Объяснение см. в тексте.

проведения расчетов. Во-первых, из-за разной продолжительности клеточного цикла число значений для каждой кривой разное, а для расчетов потребуются только пары соответствующих значений. Во-вторых, в самом начале (переход клеток от округлого состояния к распластанному) динамика изменения площади клеток монотонна и не имеет специфики, причем не только в данном случае, но и в любом другом (ср. с кривыми на рис. 1). Чтобы подготовить данные для расчета ПИ и ПС, исключаем начальные значения (обычно 5—7) и конечные, число которых зависит в основном от разницы в длине циклов обеих клеток. Приоритет остается за клеткой с более коротким циклом. Из массива ее значений исключаем значения площади с момента вступления клетки в митоз, т. е. удаляем последние значения аналогично удалению начальных. В заключение массив значений площади второй клетки укорачиваем ровно настолько, чтобы общее число значений было равным для обеих клеток. В конечном («урезанном») варианте кривые рис. 2, *а* будут иметь вид, как на рис. 2, *б*.

Теперь можно приступить к расчетам, последовательность которых представлена в таблице, в которой в столбцах 1 и 2 помещены пары значения кривых, представленных на рис. 2, но не все, а каждое 10-е (чтобы здесь не перегружать таблицу). В столбце 3 — разность соответствующих значений столбцов 1 и 2 (используем положительные значения). В столбце 4 представлены средние значения соответствующих пар площадей клеток (из столбцов 1 и 2). Вычисляем, какую долю в % составляют значения столбца 3 (разность площадей) от значений столбца 4 (среднее площадей). Результаты вычисления находятся в столбце 5. И последнее. Рассчитываем показатели идентичности и синхронности. ПИ — это среднее значение массива данных столбца 5, в данном случае рав-

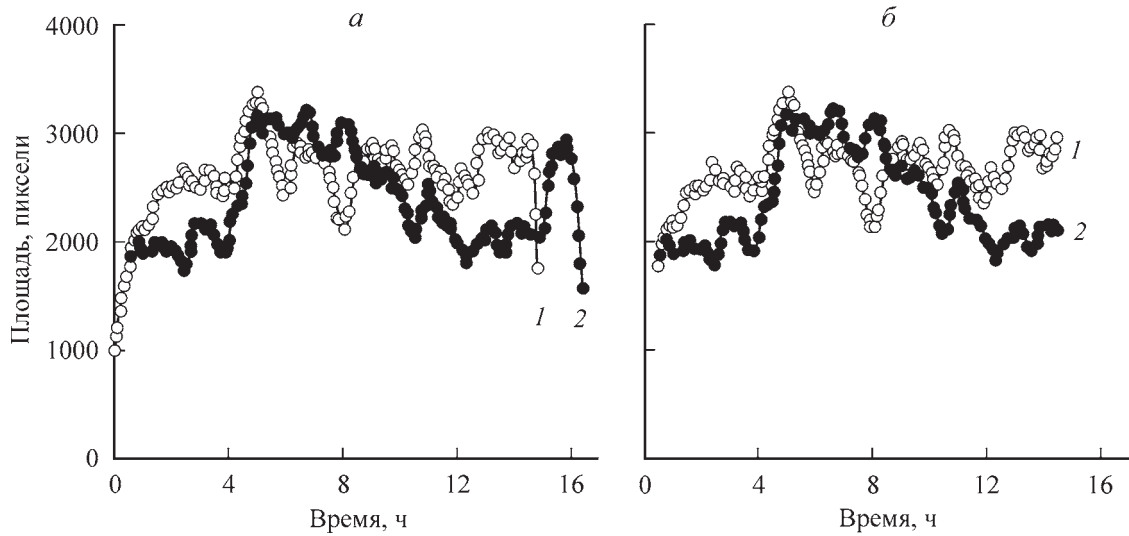


Рис. 2. Кривые изменения площади двух дочерних клеток (1, 2), используемые для расчета показателей идентичности и синхронности (см. таблицу).

а — все значения изменения площади клеток от одного митоза до другого; *б* — те же кривые, но подготовленные для расчета ПИ и ПС (удалены начальные и конечные значения). Объяснения см. в тексте.

ное 17.8 %, ПС — стандартное отклонение того же массива, равное 11.4 %.

Смысл показателя идентичности (ПИ) сводится к следующему. Нетрудно представить, что при полном совпадении (наложении) кривых величина этого коэффициента будет равна нулю. Следовательно, чем меньше ПИ, тем выше сходство анализируемой пары кривых. Высокая степень сходства кривых означает высокую степень согласованности во времени внутриклеточных процессов, отвечающих за клеточное распластывание. Чем выше величина ПИ, тем меньше сходства в изменении морфологии пары клеток (необязательно сестринских) при их распластывании.

Проиллюстрировать эффективность ПИ позволяют данные, представленные на рис. 3, *а*. Для анализа были использованы потомки 12 наугад выбранных клеток в

трех полях зрения одной и той же чашки, т. е. внешние условия были одни и те же для всех клеток. Крайний левый (черный) столбик соответствует среднему значению ПИ всех 12 пар сестринских клеток. Остальные столбики (светлые) — варианты средних значений ПИ тех же клеток, но взятых в различных сочетаниях, исключая сестринские пары клеток (т. е. по 11 пар). На рис. 3, *а* они ранжированы по мере увеличения значений ПИ. Видно, что любая из этих групп пар клеток дает значение ПИ выше, чем группа сестринских пар клеток. Объединив все группы сочетания несестринских клеток, рассчитываем среднее значение для всех таких пар клеток (светлый столбик на рис. 3, *б*). Полученный результат показывает, что совпадение кривых, а следовательно, и изменение площади сестринских клеток достоверно выше ($P < 0.01$),

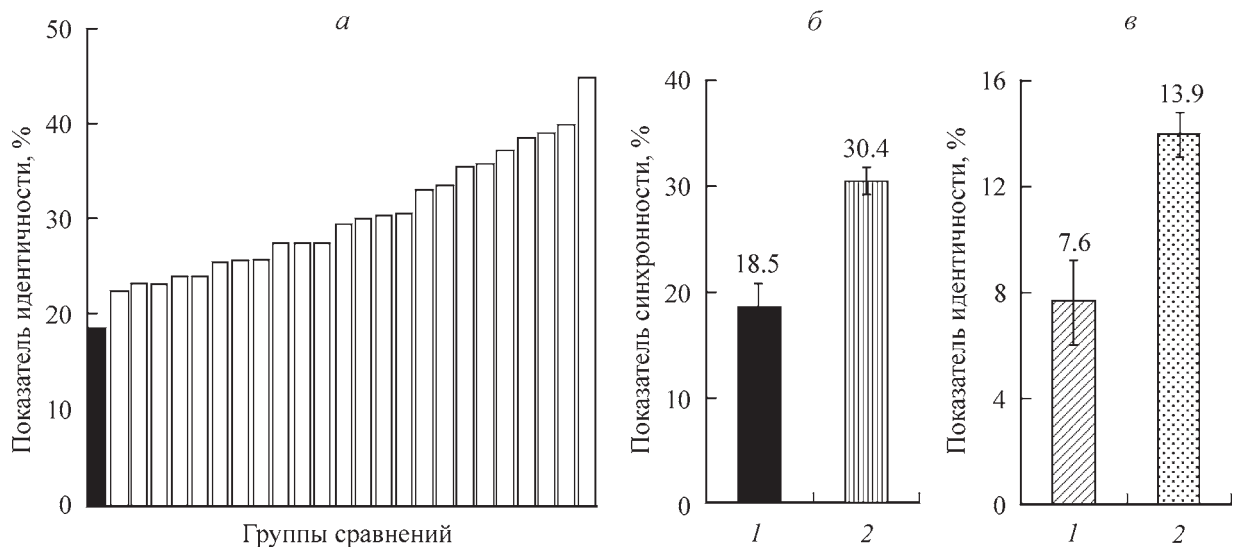


Рис. 3. Сравнение показателей идентичности и синхронности пар дочерних и недочерних клеток.

а — показатели идентичности для 12 пар сестринских клеток (черный столбик) и 24 вариантов (по 11 точек на пару) для несестринских клеток (светлые столбики); *б* — то же, но усредненные значения для 12 пар сестринских клеток (1) и для пар всех остальных вариантов (2); *в* — усредненные значения показателя синхронности для 12 пар сестринских клеток (1) и для пар всех остальных вариантов (2). Вертикальные отрезки — ошибка среднего значения.

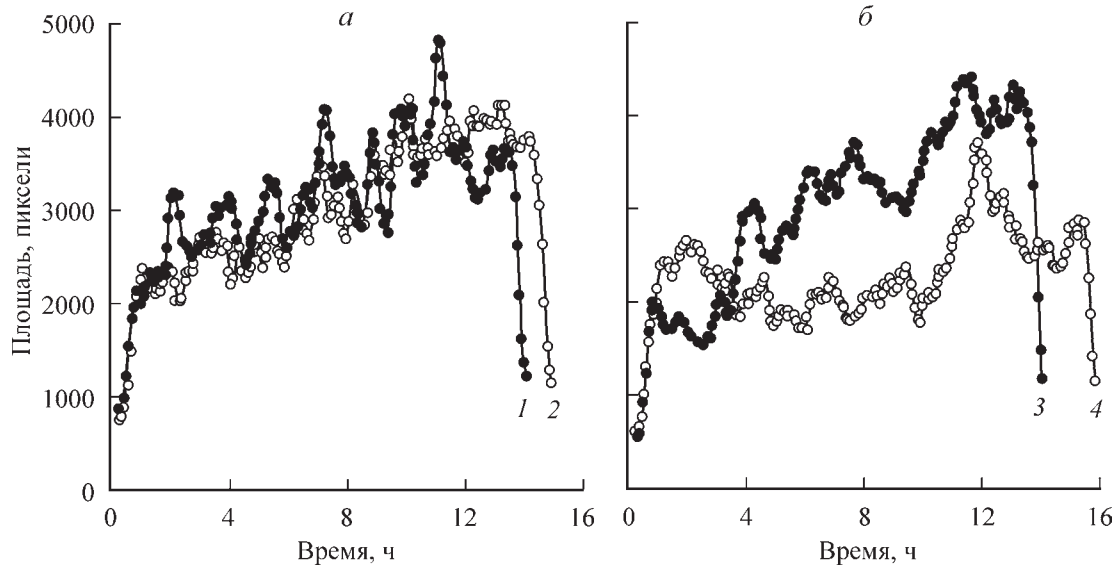


Рис. 4. Примеры кривых изменения площади 2 пар сестринских клеток с низкими (1, 2) и высокими (3, 4) показателями идентичности и синхронности.

ПИ — $10.9 \pm 0.8\%$ (а) и $38.9 \pm 1.3\%$ (б); ПС — $8.9 \pm 0.6\%$ (а) и $14.8 \pm 0.9\%$ (б). Для вычислений этих показателей использованы значения площади клеток в промежутке от 0.7 до 11 ч продвижения по циклу.

чем при любых иных комбинациях, поскольку их ПИ меньше (18.5 ± 2.2 против $30.4 \pm 1.3\%$).

Теперь о смысле показателя синхронности (ПС). Допустим, мы сравниваем две прямые, описываемые линейным уравнением ($y = ax + b$). Нетрудно представить, что при равенстве коэффициентов a и различии коэффициентов b (линии параллельны) расчет покажет, что ПИ пары таких кривых будет зависеть от b (так как разность значений в каждой точке постоянна и равна b). Если одновременно с ПИ вычислить ПС, то он будет равен нулю, поскольку разности в каждой точке одинаковы. Очевидно, что тот же результат получится, если сравнивать любые пары кривых (прямые — это частный случай), изменяющихся синхронно (например, две синусоиды). Отсюда следует, что чем «синхроннее» идут кривые, тем меньше их показатель синхронности. Используя ПС, можно оценить степень синхронности, но не совпадения, изменения площади двух клеток в течение клеточного цикла. На рис. 3, в представлены средние ПС для пар сестринских и всех вариантов пар несестринских клеток. Видно, что в первом случае значение этого показателя значительно меньше (7.6 ± 1.6 против $13.9 \pm 0.9\%$) и с высокой степенью достоверности отличается от такового во втором случае ($P < 0.01$).

В итоге значения обоих показателей для пар сравниваемых клеток рассчитываются в процентах. Чем ниже эти показатели, тем выше степень сходства изменения во времени площадей пары анализируемых клеток. В качестве иллюстрации эффективности предложенных нами параметров на рис. 4 представлены реальные кривые изменения площади пар сестринских L-клеток с низкими (а) и высокими (б) показателями идентичности и синхронности.

Обсуждение

По сути, представленные в настоящей работе данные отражают стартовую позицию образования клонов. Клонирование как исследовательский метод важен для анали-

за сходства и различия клеток в предположении о том, что потомки этих клеток из-за близкородственных связей должны иметь сходство по ряду признаков (Hamburger, 1987; Technau, 1987; Petit et al., 2005; Thuan et al., 2010). Специфичность клонов, изучаемых здесь, связана не только с тем, что анализировали максимум два поколения клеток, но и с тем, что такие клоны не образуют привычных колоний (нет редкого посева, а клетки интенсивно мигрируют по подложке).

В качестве анализируемого признака использовали площадь клетки. Это интегральный параметр клетки, тонко отражающий как состояние клетки, так и ее реакцию на различные внешние факторы (Петров, Андреева, 1982; Uings, Farrow, 2000; Ozbek et al., 2010). Очевидно, что изменение формы клетки в процессе ее миграции по подложке является важной характеристикой культивируемых клеток и в значительной степени зависит от состояния цитоскелета (Wang, Ingber, 1994; Mooney et al., 1995; Corbett et al., 1996; Are et al., 2001; Parker et al., 2002; Пинаев, 2009). Интенсивные сборки и разборки цитоскелетных структур особенно выражены при движении фибробластов (Rajagopalan et al., 2004), непрерывно изменяющих свою форму, а следовательно, и площадь клеточной поверхности (Heidemann et al., 1999; Ersoy et al., 2008; Шутова, Александрова, 2010). Фибробластоподобные клетки линии L-929 в этом смысле не исключение. Таким образом, можно считать характерным значительную вариабельность площади этих клеток при распластывании и миграции. Этот вывод подталкивает к мысли об отсутствии каких-либо закономерностей при движении клеток по субстрату. В данном случае мы имеем в виду не постепенное увеличение размера дочерних клеток до размера материнской, что не вызывает сомнения, а индивидуальные колебания ее площади при изменении клеточной формы во время передвижения по подложке. Это означает, что с увеличением выборки клеток и усреднения их площади в каждой временной точке флуктуации, связанные с индивидуальностью клеток, должны нивелироваться и исчезать (Петров и др., 2012).

Однако, как показывают результаты, если выборка будет состоять из близкородственных клеток (по крайней мере потомков двух поколений), можно обнаружить достаточно явные закономерно возникающие флуктуации, характерные для клеток такой группы. Эти закономерности можно объективно подтвердить, используя в качестве количественных характеристик предложенные показатели идентичности и синхронности. Первый из них отражает общее направление изменения площади клеток от митоза до митоза. А второй в большей степени зависит от отдельных флуктуаций изменения площади клеток по мере их продвижения по циклу. По-видимому, не будет большой ошибкой, если сказать, что величина показателя идентичности отражает характер увеличения плазматической мембраны по мере продвижения клеток по циклу, а показатель синхронности — характер изменения их цитоскелета в отдельные, более короткие промежутки времени.

Следует заметить, что использовать оба показателя можно не обязательно для пары сестринских клеток. Это могут быть любые пары. Важно другое — более низкие значения как показателя идентичности, так и показателя синхронности говорят о большем сходстве сравниваемой пары клеток. Отсюда вытекает, что получение низких значений этих показателей не для близкородственных клеток может указывать на их биологическое сходство. Насколько это будет так, покажут дальнейшие исследования.

Говорить о каких-либо конкретных механизмах неслучайного временного изменения морфологии культивируемых клеток при их передвижении по субстрату пока, по-видимому, рано. Однако вполне вероятно, что в этих механизмах активное участие должны принимать β - и γ -изоформы актина, участие которых в детерминации формы клеток при их миграции можно считать установленным (Хайтлина, 2007; Dugina et al., 2009).

В многоклеточном организме большинство клеток не склонно к миграции. В культуре, напротив, движение клеток по субстрату — одно из главных проявлений их жизнедеятельности. Поэтому обнаруженная нами временная синхронность изменения площади клеток может рассматриваться как важная характеристика биологии клеток в культуре. Более глубокий анализ этого явления должен быть проведен в двух общих направлениях. С одной стороны, оно может оказаться специфичным для клеток постоянных линий и быть связано с процессами адаптации клеток к искусственным условиям их существования. А с другой стороны, это явление может быть специфичным для клеток многоклеточного организма, но оказаться полезным (или нейтральным) для клеток при становлении постоянной линии. Подтвердить первую часть предположения должны исследования на клетках других постоянных линий, а вторую — анализ этого явления на первичных клеточных культурах.

Таким образом, анализ динамики морфологии дочерних клеток от митоза до митоза позволил выявить неслучайный характер изменения их площади при распластывании и движении. Количественно степень этой неслучайности можно оценить с помощью предложенных нами показателей идентичности (ПИ) и синхронности (ПС).

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

Список литературы

- Арэ А. Ф., Поспелова Т. В., Пинаев Г. П. 1999. Особенности структурной организации актинового цитоскелета нормальных, иммортализованных и трансформированных фибробластов крысы и ее изменения под влиянием белков внеклеточного матрикса. Цитология. 41 (8) : 707—715.
- Горелик Ю. В., Дьяконов И. А., Кухарева Л. В., Блинова М. И., Пинаев Г. П. 1998. Влияние элементов внеклеточного матрикса на псевдоподиальную активность кератиноцитов крыс. Цитология. 40 (12) : 1037—1044.
- Петров Ю. П., Андреева Е. В. 1982. Противоточное распределение в двухфазной полимерной системе культивируемых клеток после воздействия на них трипсина, версена, диметилсульфоксида и субоптимальной температуры. Цитология. 24 (6) : 730—736.
- Петров Ю. П., Негуляев Ю. А., Цупкина Н. В. 2012. Динамика распластывания клеток линии L-929 после митоза. Цитология. 54 (4) : 307—312.
- Петухова О. А., Туроверова Л. В., Кропачева И. В., Пинаев Г. П. 2004. Анализ морфологических особенностей популяции клеток эпидермоидной карциномы A-431, распластанных на иммобилизованных лигандах. Цитология. 46 (1) : 5—15.
- Пинаев Г. П. 2009. Сократительные системы клетки: от мышечного сокращения к регуляции клеточных функций. Цитология. 51 (3) : 172—181.
- Хайтлина С. Ю. 2007. Механизмы сегрегации изоформ актина в клетке. Цитология. 49 (5) : 345—354.
- Шутова М. С., Александрова А. Ю. 2010. Сравнительное исследование распластывания нормальных и трансформированных фибробластов. Роль полимеризации микрофиламентов и актин-миозинового сокращения. Цитология. 52 (1) : 41—51.
- 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 Motility and Cytoskeleton. 48 : 24—36.
- Corbett C. A., Carole L. Wilson C. L., Schwarzbauer J. E. 1996. Changes in cell spreading and cytoskeletal organization are induced by adhesion to a fibronectin-fibrin matrix. Blood. 88 : 158—166.
- Dubin-Thaler B. J., Giannone G., Döbereiner H. G., Sheetz M. P. 2004. Nanometer analysis of cell spreading on matrix-coated surfaces reveals two distinct cell states and steps. Biophys J. 86 : 1794—1806.
- Dugina V., Zwaenepoel I., Gabbiani G., Clement S., Chaponnier C. 2009. β - and γ -cytoplasmic actins display distinct distribution and functional diversity. J. Cell Sci. 122 : 2980—2988.
- Ersoy I., Bunyak F., Palaniappan K., Sun M., Forgacs G. 2008. Cell spreading analysis with directed edge profile-guided level set active contours. Med. Image Comput. Comput. Assist. Interv. 11 : 376—383.
- Hamburger A. W. 1987. The human tumor clonogenic assay as a model system in cell biology. Int. J. Cell Cloning. 5 : 89—107.
- Heidemann S. R., Kaech S., Buxbaum R. E., Matus A. 1999. Direct observations of the mechanical behaviors of the cytoskeleton in living fibroblasts. J. Cell Biol. 145 : 109—122.
- Kuz'minykh E. V., Petrov Yu. 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.
- Mooney D. J., Langer R., Ingber D. E. 1995. Cytoskeletal filament assembly and the control of cell spreading and function by extracellular matrix. J. Cell Sci. 108 : 2311—2320.
- Ozbek S., Balasubramanian P. G., Chiquet-Ehrismann R., Tucker R. P., Adams J. C. 2010. The evolution of extracellular matrix. 21 : 4300—4305.
- Parker K. K., Brock A. L., Brangwynne C., Mannix R. J., Wang N., Ostuni E., Geisse N. A., Adams J. C., Whitesides G. M., Ingber D. E. 2002. Directional control of lamellipodia extension by constraining cell shape and orienting cell tractional forces. FASEB J. 16 : 1195—1204.
- Petit A. C., Legué E., Nicolas J. F. 2005. Methods in clonal analysis and applications. Reprod. Nutr. Develop. 45 : 321—339.

Petrov Yu. P., Krylova T. A., Tsupkina N. V., Pershina V. P. 2007. Spreading as a general attribute of cell population. *J. Biol. Sci.* 7 : 102—112.

Rajagopalan P., Marganski W. A., Brown X. Q., Wong J. Y. 2004. Direct comparison of the spread area, contractility, and migration of balb/c 3T3 fibroblasts adhered to fibronectin- and RGD-modified substrata. *Biophys. J.* 87 : 2818—2827.

Technau G. M. 1987. A single cell approach to problems of cell lineage and commitment during embryogenesis of *Drosophila melanogaster*. *Development.* 100 : 1—12.

Thuan N. V., Kishigami S., Wakayama T. 2010. How to improve the success rate of mouse cloning technology. *J. Reprod. Develop.* 56 : 20—30.

Uings I. J., Farrow S. N. 2000. Cell receptors and cell signaling. *Mol. Pathol.* 53 : 295—299.

Wang N., Ingber D. E. 1994. Control of cytoskeletal mechanics by extracellular matrix, cell shape, and mechanical tension. *Biophys. J.* 66 : 2181—2189.

Поступила 20 XII 2011

THE ESTIMATION OF SIMILARITY IN CHARACTERISTICS OF THE POST-MITOTIC DAUGHTER L-929 CELLS DURING THEIR MIGRATION ALONG THE SUBSTRATE

Yu. P. Petrov,^{1,*} Yu. A. Negulyaev,^{1,2} N. V. Tsupkina¹

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, and ² Chair of Physical and Chemical Biology of the Cell, St. Petersburg State Polytechnic University

* e-mail: yupe3ov@mail.ru

Using time-lapse microscopy, spreading of the post-mitotic daughter cells has been studied. The work was performed on non-synchronized cells of established L-929 cell line. The study was aimed to characterize the morphology of the cells as they move along the substrate and to determine whether the area of the migrating cells changes nonrandom. Two new parameters have been proposed for comparison of cell morphology: the identity indicator (II) and the synchronism indicator (SI). Time-dependent changes in the area in pairs of cells were measured to calculate these parameters. The first indicator shows the degree of coincidence between the absolute values of the area in the pair of the cells, whereas the second indicator shows synchronism of the changes in the cell areas and does not depend on their absolute values. The lower are the indicators, the higher is the similarity in the time-dependent changes in the areas of cell pairs studied. The indicators were shown to be approximately 1.5-fold lower for the pairs of the post-mitotic daughter cells than those for any other pair of the cells. The results indicate a nonrandom pattern of change in the morphology of the cells during their movement along the substrate.

Key words: cell area, cellular cycle, identity indicator, synchronization indicator.