

ОТВЕТ КЛЕТОК ЛИНИИ HeLa НА ДЕЙСТВИЕ МИТОМИЦИНА С. II. МОРФОМЕТРИЯ КЛЕТОК

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

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и ² Кафедра физико-химической биологии клетки
С.-Петербургского государственного политехнического университета;
* электронный адрес: uprezov@mail.ru

Анализировали клетки HeLa-M до и после 2 ч экспозиции в среде с 10 мкг/мл митомицина С. Показано, что после контакта с митостатиком часть клеток нормально проходит митоз, но их дочерние клетки больше не делятся. В течение 2 сут наблюдения площадь дочерних клеток линейно увеличивается, достигая двукратного размера контрольных клеток. При этом степень распластывания клеток, контактировавших с митомицином, снижается, а их поляризация не изменяется. Синхронно с площадью клеток увеличивается площадь их ядер, что наряду с увеличением размеров клетки указывает на синтез белка de novo. При анализе ядрышек обнаружено, что после некоторого уменьшения их площади в первые часы после контакта клеток с митомицином она опять возрастает и в целом превосходит площадь ядрышек клеток в контроле, что может происходить только при синтезе рРНК. Сшивая двойную спираль ДНК в ее малой бороздке, митомицин должен останавливать транскрипцию, так как считается, что она возможна только при локальном плавлении ДНК. Возникает противоречие между полученными данными и этой концепцией, которое может быть преодолено, если принять гипотезу о транскрипции, проходящей в большой бороздке ДНК без расплетения ее цепей.

Ключевые слова: площадь клетки, ядро, ядрышко, митоз, транскрипция.

В настоящее время механизмы токсического действия митомицина С на клетки достаточно хорошо известны. Тем не менее эти механизмы продолжают интенсивно изучаться в связи с применением митомицина в клинической онкологии (Hlavín et al., 2010; Vasquez, 2010). Установлено, что он ковалентно сшивает обе цепи ДНК и в итоге препятствует делению клеток (Tomasz et al., 1987). Это свойство митомицина нашло применение при культивировании клеток для получения подложки из фидерных клеток (Кольцова и др., 2012). Несмотря на такой прикладной характер использования митомицина С, этот антибиотик может быть полезным при исследовании биологии клеток в культуре. Поскольку точно известны его мишень (ДНК) и результат взаимодействия с ней (блокирование митоза), это дает возможность изучить поведение культивируемых клеток при точно известной причине ингибирования их пролиферации. Для клеток всех постоянных линий пролиферация является главным свойством их выживания в условиях культуры. Несмотря на гетерогенность популяций клеток по разным признакам (например, по числу хромосом), все они в отличие от клеток многоклеточного организма постоянно размножаются. Этот атрибут постоянных линий, по-видимому, можно считать наиболее важным фактором, детерминирующим эволюцию и становление клеточных культур.

Искусственное блокирование клеточной пролиферации должно вызывать ряд различных ответов (на разном уровне) как отдельных клеток, так и всей клеточной популяции. Мы полагаем, что все эти реакции в конечном счете в той или иной степени должны проявляться в из-

менении фенотипа клеток, т. е. на уровне клеточной морфологии. Задача настоящей работы — выявить некоторые особенности изменения морфологии и поведения клеток постоянной линии HeLa после воздействия на них митомицина С в концентрациях, используемых при получении фидерных клеток.

Материал и методика

В качестве объекта исследования использовали клетки постоянной линии HeLa-M (эпителиоидная карцинома шейки матки человека, сублиния HeLa), полученные из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН (Санкт-Петербург).

Клетки культивировали в пластиковых чашках Петри (35 мм; Nunck, Дания) на среде ДМЕМ (Gibco, США) в атмосфере с 5 % CO₂ при 37 °C. В питательную среду добавляли 10 % эмбриональной сыворотки коров (Gibco, США) и 100 мкг/мл гентамицина. Клетки рассеивали с плотностью 3—4 · 10³ кл/см².

Через 1 сут после пересева одну чашку с клетками оставляли в инкубаторе, вторую помещали на столик микроскопа AxioObserver.Z1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Германия), оборудованного устройствами для долговременного прижизненного наблюдения за клетками (поддержание температуры, влажности и CO₂). Еще через 1 сут в чашку, находящуюся в инкубаторе, добавляли митомицин С (Sigma, США) из расчета 10 мкг/мл и

клетки инкубировали еще 2 ч. После этого удаляли среду с митостатиком, дважды ополаскивали клетки PBS и добавляли свежую питательную среду без митомицина. Контрольную чашку с клетками убирали со столика микроскопа AxioObserver.Z1, а на ее место помещали чашку с клетками, подвергнутыми обработке митомицином. Чашку с интактными клетками помещали в инкубатор. Через 2 сут эксперимент завершали.

Через 1 сут после пересева (до начала цейтраферной съемки интактных клеток), через 2 (перед началом съемки обработанных митомицином С клеток) и 4 сут (после окончания съемки клеток, контактировавших с митомицином С) для контрольных и опытных клеток получали цифровые изображения с помощью инвертированного светового микроскопа ECL IPSE TS100 (Nikon, Япония). Использовали объектив 20×, цифровую камеру EOS 1000D (Canon, Япония), разрешение 2816×1880 пикселей.

Условия цейтраферной съемки на микроскопе AxioObserver.Z1 — объектив Plan-Neofluar ×20/0.4 и цифровая камера AxioCam HRm с разрешением 1388×1040 пикселей, обычная микроскопия в проходящем свете (без использования дифференциального интерференционного контраста), съемка с 5-минутным интервалом между кадрами. Заданные условия эксперимента поддерживались автоматически программой AxioVision 4.8.2 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Германия). Для количественного анализа использовали отдельные изображения, записанные в формате «JPEG».

Цифровые изображения клеток анализировали с помощью программы ImageJ 1.47j (Rasband, W. S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, США). Измеряли площадь проекции клеток на подложку (далее площадь клеток), площадь ядер, коэффициенты распластывания Rp/Ra (Kuz'minykh, Petrov, 2004) и поляризации M/m (Петров и др., 2013). Площадь ядрышек рассчитывали, исходя из гистограмм частоты пикселей с различной оптической плотностью, выраженной в условных единицах от 0 до 255. Контуры клеток и

их ядер обводили вручную, а их площади и гистограммы светопоглощения рассчитывались автоматически.

Для статистической обработки данных, построения графиков и диаграмм использовали Excel 2010 (Microsoft, США) и Origin 6.1 (OriginLab, США).

Результаты

Динамику изменения количества клеток в культуре демонстрирует рис. 1. В процессе цейтраферной съемки по мере роста культуры считали число клеток в одних и тех же полях зрения. Поскольку число клеток при посеве было одним и тем же как в контроле, так и в опыте, на графике представлены объединенные данные. Темные кружки соответствуют числу клеток контрольной чашки, а светлые — клеткам, подвергнутым воздействию митомицина С. Число интактных клеток растет линейно. Напомним, что в это же время опытные клетки тоже оставались интактными и только за 2 ч до начала цейтраферной съемки были подвергнуты обработке митомицином. Поэтому нет ничего удивительного в том, что первый светлый кружок на графике оказался в продолжение ряда темных точек. Второй светлый кружок тоже находится на линии регрессии, отражающей экспоненциальный рост культуры. Однако в дальнейшем рост этой культуры останавливается и число клеток остается на постоянном уровне весь последующий период наблюдения (2 сут после экспозиции клеток в среде с митомицином). Таким образом, можно констатировать, что пролиферация клеточной популяции, обработанной митостатиком, блокируется не сразу.

Одновременно с подсчетом общего количества клеток у некоторой их части измеряли площадь проекции на подложку. Для наблюдения в каждом случае визуально отбирали клетки в одной и той же части поля зрения, обладающие приблизительно сходными морфологическими характеристиками при начале цейтраферной съемки. В каждой группе было по 6 клеток.

Общий вид клеток (в одном масштабе) показан на рис. 2, а результаты представлены на рис. 3. Исследуя динамику роста культуры, измеряли площадь только тех клеток, которые не были в митозе (из-за их округлости, неадекватно уменьшающей размер клеток при измерении). Синусоидальный характер динамики изменения площади интактных клеток связан с их делением — до митоза площадь клеток относительно велика, а после — относительно мала. Количество этих клеток за период наблюдения увеличилось с 6 до 14. Число клеток, обработанных митомицином, не изменилось — те же 6 клеток как в начале, так и в конце наблюдения. Очевидно, что во время наблюдения средний размер площади контрольных клеток в целом оставался постоянным — 3693 ± 120 пикселей. Площадь клеток, обработанных митомицином, в начале была даже меньше, чем площадь клеток в контроле. Мы полагаем, это связано с тем, что эти клетки недавно прошли фазу митоза. Затем размер клеток стал линейно расти, и к концу периода наблюдения площадь этих клеток увеличилась более чем в 2 раза по сравнению с контрольными. При этом у них не было обнаружено никаких признаков наступления ни митоза, ни апоптоза.

У этих групп клеток помимо измерения общей площади измеряли площадь ядер. Данные представлены на рис. 4. Практически полное подобие рис. 3 и 4 свидетельствует в пользу того, что в целом площадь ядер изменяет-

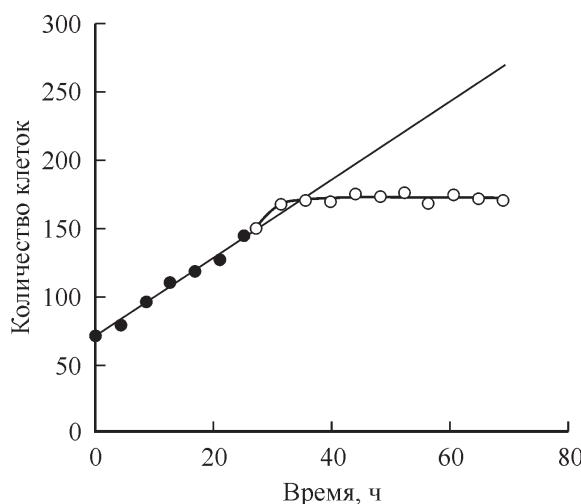


Рис. 1. Изменение количества клеток HeLa по мере роста культуры.

Темные кружки — число клеток в поле зрения до экспозиции в митомицине С; светлые кружки — после 2 ч в среде с митомицином С. Сплошная линия соответствует расчетным значениям роста культуры без использования митомицина.

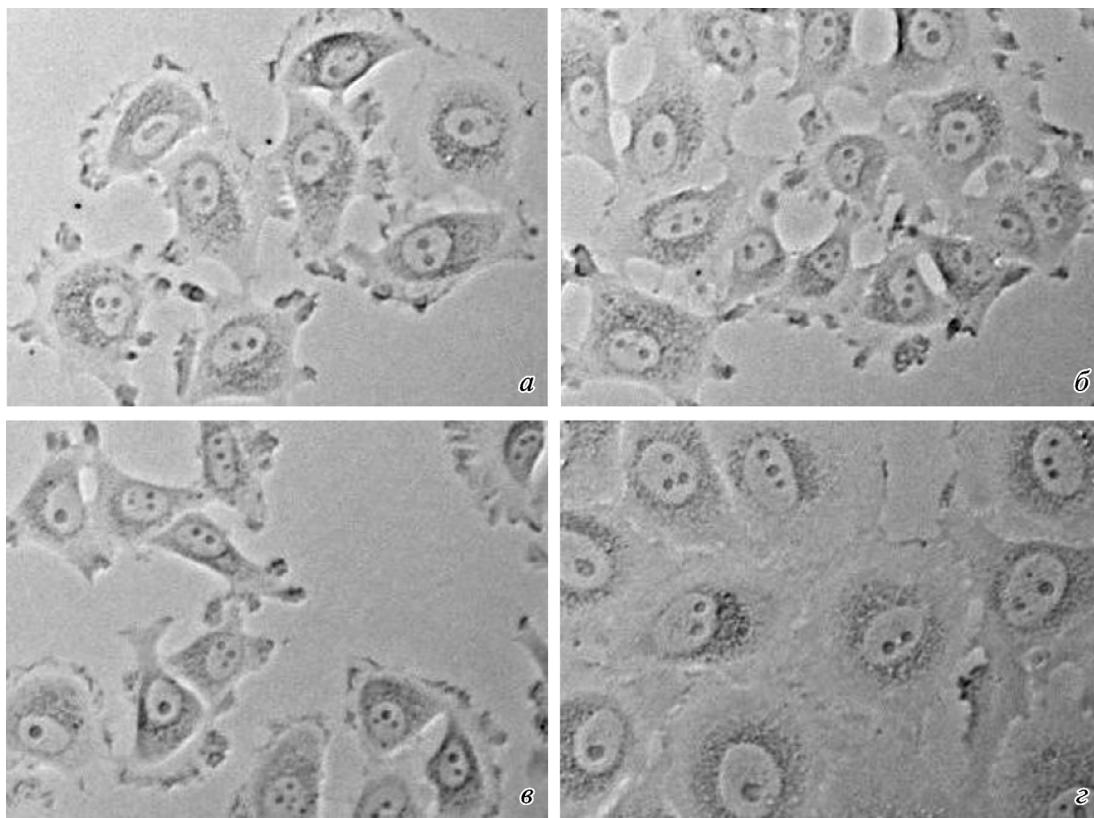


Рис. 2. Изменение морфологии клеток HeLa-M под воздействием митомицина С.

a — контрольные клетки перед началом цайтраферной съемки; *б* — те же клетки после завершения (через 24 ч) цайтраферной съемки; *в* — клетки сразу после 2 ч контакта с митомицином (начало съемки); *г* — те же клетки через 48 ч (окончание съемки). Увел.: 20×. Объяснения в тексте.

ся синхронно с изменением площади всей клетки как в контрольной группе, так и после обработки митомицином С.

Измеряя площадь ядер, одновременно регистрировали их оптическую плотность в единицах яркости пикселей (от 0 до 255 усл. ед.). Поскольку оптическая плотность ядрышек выше, чем кариоплазмы, по полученным гистограммам можно рассчитать их площадь. Данные о

средней площади ядрышек (всех) на одно ядро представлены на рис. 5, *а*.

В целом можно считать, что динамика изменения площади ядрышек следует за изменением площади клетки и ее ядра. Но имеются и особенности. В начальный период отмечается снижение площади ядрышек в обоих случаях. Такой результат может указывать на нечто общее в поведении обеих групп клеток. Общее у них

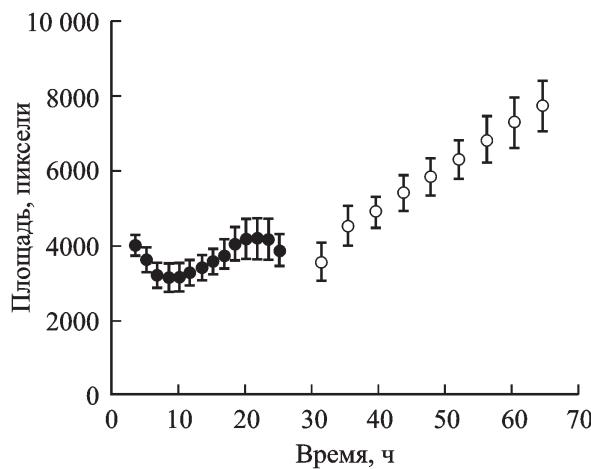


Рис. 3. Динамика изменения площади клеток до (темные кружки) и после 2 ч экспозиции в митомицине (светлые кружки).

Вертикальные отрезки — ошибки среднего. Объяснения в тексте.

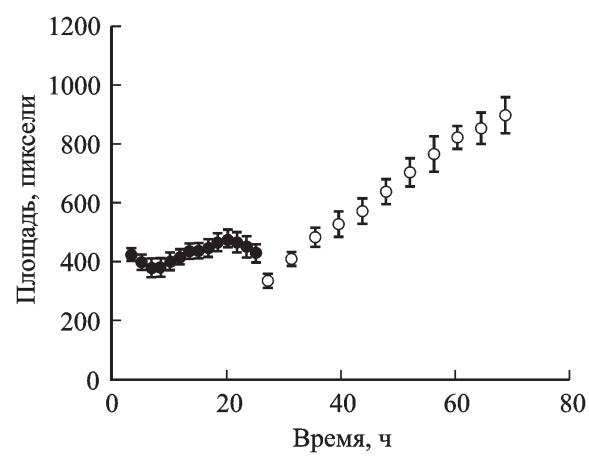


Рис. 4. Динамика изменения площади ядер (темные кружки) и после 2 ч экспозиции в митомицине (светлые кружки) клеток HeLa.

Вертикальные отрезки — ошибки среднего.

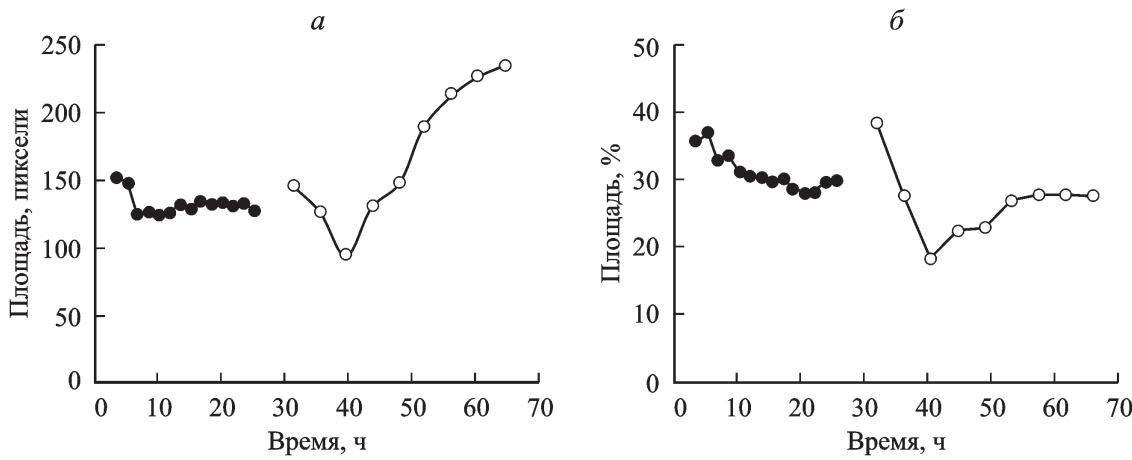


Рис. 5. Динамика изменения площади ядрышек до (темные кружки) и после 2 ч экспозиции в митомицине С (светлые кружки). а — абсолютные значения, пиксели; б — доля от площади ядра, %. Объяснения в тексте.

одно — перемещение из обычного инкубатора в инкубатор, где проводится цейтраферная съемка. Возможно, клетки реагируют на это перемещение, однако это вряд ли является единственной причиной уменьшения площади ядрышек. Как известно, ядрышки исчезают перед началом митоза, а появляются вскоре, но не сразу, после деления клеток. Поэтому снижение площади ядрышек можно рассматривать как результат, связанный с делением клеток. Но только для клеток в контроле. Скорее всего, это связано с небольшой выборкой интактных клеток в начальный период наблюдения. В дальнейшем средняя площадь ядрышек остается постоянной. Это не противоречит логике, поскольку трудно представить функциональные флюктуации ядрышек, подобные флюктуациям клетки, связанным с изменением ее формы при перемещении или периодическом образовании филоподий.

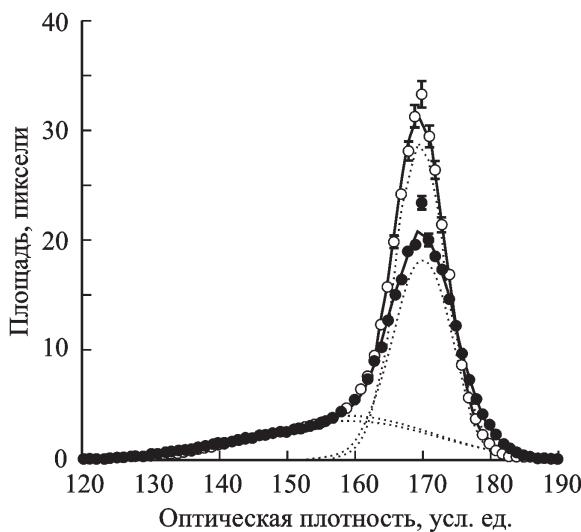


Рис. 6. Гистограммы соотношения площадей ядра и ядрышек клеток HeLa.

Темные кружки — средние значения для интактных клеток в течение первых 12 ч после начала цейтраферной съемки; светлые кружки — средние значения для клеток в первые 8 ч после 2 ч контакта с митомицином С. Сплошные линии — линии регрессии, пунктирные линии — расчетные линии для площади ядрышек (левые пики) и кариоплазмы (правые пики). Вертикальные отрезки — ошибки среднего.

Отсутствие митоза у группы клеток, обработанных митомицином С, требует иной интерпретации, не связанной с клеточным делением. По-видимому, наблюдавшиеся в этом случае изменения площади ядрышек детерминированы токсичным действием митомицина на рибосомы, обнаруженным ранее на других клетках (Snodgrass et al., 2010). Тем не менее приблизительно через 6—8 ч после контакта клеток с митомицином можно отметить, что площадь их ядрышек начинает постепенно возрастать и уже через 10—12 ч начинает превосходить площадь ядрышек клеток в контроле (в абсолютных единицах). Однако их процентное соотношение по отношению к ядру клетки в это время стабилизируется и остается постоянным, как и в контроле (рис. 5, б).

В предыдущей работе (Петров, 2013) было отмечено, что клетки после инкубации с митомицином С можно разделить на две группы: М-I и М-II. Первые после деления дают дочерние клетки, которые визуально остаются функционально активными в последующие 2 сут, но не делятся. Вторые вступают в митоз, становятся округлыми, но либо не могут поделиться, либо после деления дают дочерние клетки, которые тоже остаются округлыми без признаков распластывания. Критическое время, после которого различия между клетками обеих групп становятся очевидными, составляет 6.7 ± 1.2 ч после контакта с митомицином. Клетки группы М-II в конечном счете погибают, что можно видеть даже в этот короткий период наблюдения (2 сут). Как было сказано выше, анализируемые в настоящей работе клетки, подвергнутые действию митомицина, видимо дочерние, материнские клетки которых поделились сразу по окончании экспозиции в среде с митостатиком. Поэтому их можно отнести к группе М-I. Образование двух групп клеток после контакта с митомицином С говорит об увеличении гетерогенности популяции, что важно учитывать при анализе и интерпретации результатов.

Полагая, что в начальный период после контакта клеток с митомицином еще нет визуальных признаков, позволяющих разделить их на две группы, были определены площади их ядер и ядрышек с использованием относительно больших выборок. Анализировали случайно выбранные группы клеток в одном и том же поле зрения. В контроле было от 20 клеток в начале наблюдения до 50 в конце (через 12 ч). В опытной выборке — от 40 до 60 клеток в течение 8 ч после контакта с митомицином.

Данные представлены в виде усредненных гистограмм на рис. 6.

Площадь под сплошными линиями равна количеству пикселей, соответствующих площади ядер. Видно, что площадь ядер интактных клеток в среднем меньше, чем обработанных митомицином (380 против 327 пикселей). Однако площадь ядрашек (левые пунктирные линии) одна и та же в обоих случаях (соответственно 116 и 114 пикселей). Таким образом, в ранний период после обработки клеток митомицином площадь их ядрашек в среднем та же, что и у интактных клеток.

Для характеристики формы клеток мы используем такие параметры, как коэффициент распластывания R_p/R_a (Kuz'minykh, Petrov, 2004) и коэффициент поляризации M/m (Петров и др., 2013). Для клеток, изменение площади которых представлено на рис. 3, оба коэффициента остаются практически постоянными за весь период наблюдения для обеих групп клеток. Отсутствие динамики позволяет сравнивать их средние значения, которые представлены на рис. 7. Можно отметить, что митомицин С достоверно уменьшает распластывание клеток ($P < 0.05$), но не оказывает влияния на их поляризацию.

Есть еще один показатель, который можно использовать для характеристики клеточной популяции, — среднее число ядрашек на ядро (рис. 8). Число ядрашек подсчитывали на изображениях клеток, полученных при обычной световой микроскопии. В каждом случае считали клетки в 10 полях зрения. Общее количество обработанных клеток для каждой группы составило около 300 на момент перед началом цейтраферной съемки контрольных клеток (через 1 сут после посева). Число исследованных клеток после завершения эксперимента было более 600 в каждом случае (2 сут для контрольных и 3 сут для опытных клеток от момента их отмычки от митомицина). Следует отметить, что в случае $M(+)$ по понятным причинам регистрация ядрашек была возможна в основном для клеток группы $M-I$.

Большая выборка позволила с высокой точностью продемонстрировать, во-первых, увеличение среднего числа ядрашек на ядро по мере культивирования клеток ($P < 0.01$), во-вторых, независимость этого параметра от воздействия митомицина на клетки.

Обсуждение

Антибиотики группы митомицина были открыты в 50-е годы прошлого века (Hata et al., 1956). С тех пор основной антибиотик этой группы — митомицин С — получил широкое распространение в клинической онкологии в качестве цитостатика (Hofheinz et al., 2008; Sorenson, 2008; Kahmann et al., 2010; Turner et al., 2012). Работ, в которых он целенаправленно используется для изучения биологии клеток в культуре, нет. Хотя его токсическое действие нередко проверяется на культивируемых клетках (Crowston et al., 2006; Bargonetti et al., 2010). Поскольку в этих работах моделируются условия использования митомицина в клинике, используются короткая (5–10 мин) экспозиция клеток с митостатиком и высокая (вплоть до 400 мг/мл) его концентрация (Anjos et al., 2012). В нашей работе мы выбрали щадящие условия обработки клеток митомицином, принятые для получения фидерных клеток.

При таких условиях контакта с митомицином клетка остается жизнеспособной, но не может вступить в митоз,

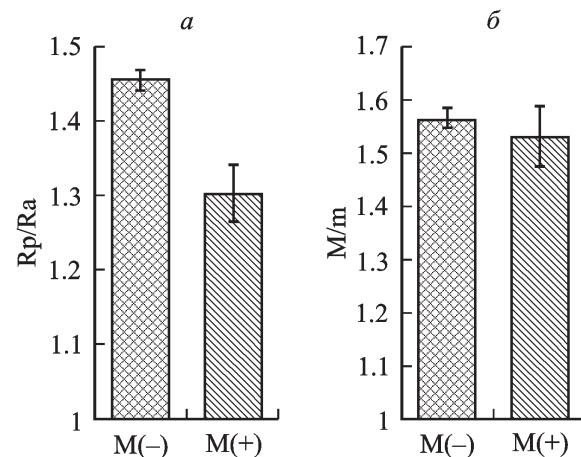


Рис. 7. Сравнение коэффициентов распластывания (а) и поляризации (б) интактных клеток ($M(-)$) после их контакта с митомицином С ($M(+)$).

Представлены средние значения с соответствующими ошибками. Объяснения в тексте.

а если и вступает, то не происходит ее распластывания. Из этого следует, что даже если и происходит репарация сшитых митомицином цепей ДНК, полного ее восстановления не происходит. Если кроме двухспиральных сшивок ДНК существуют какие-либо неспецифические воздействия митомицина на другие структуры клетки, они либо репарируются, либо не препятствуют ее выживанию. Независимо от того, в какой фазе клеточного цикла произошли сшивки ДНК, они не препятствуют входению клетки в митоз. По-видимому, того пула циклинов, который есть в клетке на момент ее атаки митомицином, достаточно для индукции митоза. Однако выйти из митоза с образованием способных к распластыванию дочер-

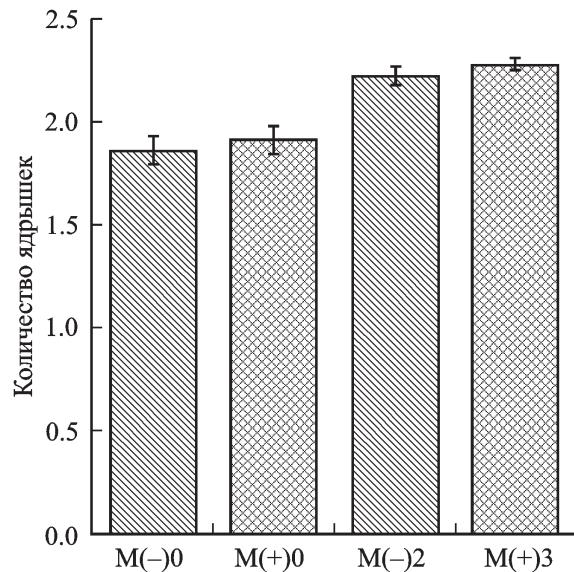


Рис. 8. Сравнение числа ядрашек на ядро у контрольных клеток и клеток, обработанных митомицином С.
 $M(-)$ — контрольные клетки, $M(+)$ — клетки, подвергнутые обработке митомицином через 2 сут после посева. Точка 0 соответствует регистрации клеток перед началом цейтраферной съемки контрольных клеток. Точки 2 и 3 — регистрация клеток после завершения цейтраферной съемки. Представлены средние значения, вертикальные отрезки — ошибки среднего.

них клеток могут только те клетки, которые получили повреждение митомицином в фазе G₂.

В целом логика этих рассуждений, которые могут быть продолжены, приводит к следующему важному выводу. Какими бы ни были внутриклеточные нарушения вследствие воздействия митомицина, клетки полностью теряют способность к размножению, даже если они выживают. Это означает, что полного восстановления по крайней мере двойных швивок ДНК не происходит. Однако это не мешает клеткам оставаться жизнеспособными даже после следующего ожидаемого («планового») митоза.

Как показывают результаты настоящей работы, после прохождения времени ожидаемого второго митоза выжившие клетки продолжают увеличиваться в размере. Они хорошо распластаны, хотя и в несколько меньшей степени, чем клетки в контроле. У них происходит увеличение площади ядра, но, как и в контроле, пропорционально увеличению общей площади клетки. Хорошее распластывание клеток означает, что они функционально активны, иначе бы они откреплялись от подложки, округлялись и погибали в результате апоптоза или некроза. Функциональная активность клеток и увеличение их площади (т. е. массы клетки), как нам кажется, являются необходимыми и достаточными признаками того, что в клетках идут процессы метаболизма с нарастанием пула различных белков.

Для синтеза белка необходимы рибосомы. Синтез рРНК происходит в ядрышках. Несмотря на то что из упоминавшихся выше данных литературы следует, что митомицин оказывает токсическое влияние на рибосомы, а следовательно вызывает повреждения ядрышек, наши данные не полностью этому соответствуют. Как следует из рис. 5, а, в первые 2–3 ч после завершения контакта с митомицином в клетках, остающихся жизнеспособными, происходит уменьшение площади ядрышек, что отчасти, возможно, является следствием действия митостатика. Затем происходит прогрессивное увеличение площади ядрышка синхронно с увеличением как площади ядра, так и всей клетки. В целом же для всех клеток, обработанных митомицином, количество ядрышек не отличается от их числа в интактных клетках. Мы полагаем, что у клеток группы М-I происходит восстановление не только структуры ядрышек, но и их активного функционирования.

Представленные в настоящей (как и в предыдущей) работе результаты указывают на то, что при наличии митомициновых швивок спиралей ДНК в клетках должна происходить транскрипция. Это противоречит общепринятой гипотезе об образовании «транскрипционного пузырька» во время синтеза РНК. Конечно, можно представить, что митомицин специфически повреждает участки ДНК, имеющие лишь второстепенное значение для выживания клеток. Однако рибосомные гены никак нельзя считать второстепенными. Сохранение одного и того же числа ядрышек в интактных и обработанных митомицином клеток опровергает такое предположение. Это означает, что участки генома (ядрышковые организаторы), принимающие участие в формировании ядрышек, одинаково активны как в тех, так и в других клетках.

Таким образом, наши данные, как нам представляется, ставят под сомнение представление о транскрипции с локальным плавлением ДНК, указывая на возможность синтеза РНК в большой бороздке ДНК. Вариант такой возможности реализован в модели, ранее предложенной одним из авторов настоящей работы (Petrov, 2006).

Список литературы

- Кольцова А. М., Воронкина И. В., Гордеева О. Ф., Зенин В. В., Лифанцева Н. В., Мусорина А. С., Смагина Л. В., Яковлева Т. К., Полянская Г. Г. 2012. Разработка новой бесфибриновой системы и характеристика полученных в ней сублиний эмбриональных стволовых клеток человека при аутогенном и аллогенном культивировании. Цитология. 54 (12) : 637—651.
- Петров Ю. П. 2013. Ответ клеток линии HeLa на действие митомицина С. И. Деление клеток. Цитология. 55 (12) : 874—878.
- Петров Ю. П. Кухарева Л. В., Крылова Т. А. 2013. Влияние коллагена I типа и фибронектина на морфологию мезенхимных клеток стромы человека в культуре. Цитология. 55 (7) : 452—462.
- Anjos C. P., Vasconcelos A. C., Crosara P. F., Anjos G. C., Becker C. G., Guimaraes R. E. 2012. Apoptosis in eosinophilic nasal polyps treated in vitro with mitomycin C. Braz. J. Otorhinolaryngol. 78 : 32—37.
- Bargonetti J., Champel E., Tomasz M. 2010. Differential toxicity of DNA adducts of mitomycin C. J. Nucleic Acids. 2010 : 1—6.
- Crowston J. G., Wang X. Y., Khaw P. T., Zoellner H., Healey P. R. 2006. Human serum reduces mitomycin-C cytotoxicity in human tenon's fibroblasts. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 47 : 946—952.
- Hata T., Hoshi T., Kanamori K., Matsumae A., Sano Y., Shima T., Sugawara R. 1956. Mitomycin, a new antibiotic from Streptomyces. I. J. Antibiot. (Tokyo). 9 : 141—146.
- Hlavin E. M., Smeaton M. B., Miller P. S. 2010. Initiation of DNA interstrand cross-link repair in mammalian cells. Environ. Mol. Mutagen. 51 : 604—624.
- Hofheinz R. D., Beyer U., Al-Batran S. E., Hartmann J. T. 2008. Mitomycin C in the treatment of gastrointestinal tumours: recent data and perspectives. Onkologie. 31 : 271—281.
- Kahmann L., Beyer U., Mehlhorn G., Thiel F.C., Strnad V., Fasching P. A., Lux M. P. 2010. Mitomycin C in patients with gynecological malignancies. Onkologie. 33 : 547—557.
- 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.
- Petrov Y. P. 2006. Is RNA synthesis possible without transcription bubble formation? J. Biol. Sci. 6 : 532—539.
- Sørensen J. B. 2008. Current concepts in chemotherapy for malignant pleural mesothelioma. Clin. Respir. J. 2 : 74—79.
- Snodgrass R. G., Collier A. C., Coon A. E., Pritsos C. A. 2010. Mitomycin C inhibits ribosomal RNA. A novel cytotoxic mechanism for bioreductive drugs. J. Biol. Chem. 285 : 19 068—19 075.
- Tomasz M., Lipman R., Chowdary D. 1987. Isolation and structure of a covalent cross-link adduct between mitomycin C and DNA. Science. 235 : 1204—1208.
- Turner K., Varghese S., Alexander H. R., Jr. 2012. Current concepts in the evaluation and treatment of patients with diffuse malignant peritoneal mesothelioma. J. Natl. Compr. Canc. Netw. 10 : 49—57.
- Vasquez K. M. 2010. Targeting and processing of site-specific DNA interstrand crosslinks. Environ. Mol. Mutagen. 51 : 527—539.

Поступила 1 VIII 2013

RESPONSE OF HE LA CELLS TO MITOMYCINE C. II. MORPHOMETRY OF THE CELLS

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 Polytechnical University;
* e-mail: yupe3ov@mail.ru

HeLa-M cells were analyzed after the 2h incubation in the medium with mitomycin C (10 µg/ml). It has been shown that a part of the cells contacted with the cytostatic agent passes mitosis normally, but the daughter cells no longer divide. During the observation period (2 days), the area of the cells increased linearly reaching twice the size of intact cells. Thereby spreading of the cells contacted with mitomycin decreased, and their polarisation was not changed. Along with the increasing cell size, the nucleus size is also increased indicated *de novo* protein synthesis. Analysis of nucleoli revealed a small decrease of their area during the first hours after the contact with mitomycin followed by an increase of the area. Finally, the nucleolus area exceeded that of control cells, which can only happen if rRNA was synthesized. On the other hand, DNA cross-linking by mitomycin should inhibit transcription because the mechanism of transcription is assumed to involve local melting of DNA within its minor groove. This contradiction can be overcome by assuming that transcription occurs in a DNA major groove without separation of the chains.

Key words: cell area, cell nucleus, nucleolus, mitosis, transcription.