

ОТВЕТ КЛЕТОК ЛИНИИ HeLa НА ДЕЙСТВИЕ МИТОМИЦИНА С. III. АНАЛИЗ ЯДРЫШЕК МАТЕРИНСКИХ И ДОЧЕРНИХ КЛЕТОК

© Ю. П. Петров,^{1,*} Ю. А. Незуляев,^{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: yure3ov@mail.ru

Проведен сравнительный анализ количества ядрышек в клетках постоянной линии M-HeLa до и после воздействия на них митомицина С в концентрации 10 мкг/мл в течение 2 ч. Используя цейтраферную съемку, подсчитывали ядрышки в материнских и в соответствующих им дочерних клетках. Показано, что у дочерних клеток среднее число ядрышек на клетку в целом выше, чем у материнских, а стандартное отклонение, напротив, уменьшается. Среднее количество ядрышек в дочерних клетках, материнские клетки которых были обработаны митомицином, выше, чем в соответствующих клетках контрольной группы. Отдельный анализ был выполнен для клеток, имеющих от 1 до 4 ядрышек. Показано, что неслучайное полное совпадение числа ядрышек у материнской и дочерних клеток составляет около 1/7 от всей клеточной популяции. Митомицин снижает эту величину приблизительно в 1.5 раза.

Ключевые слова: ядро, ядрышко, дочерняя клетка, материнская клетка.

Успехи развития биологии клеток в культуре в значительной степени зависят от наличия методик, дающих возможность количественно оценивать состояние клеточной популяции в целом. Чем больше набор различных параметров, характеризующих разные стороны клеточной популяции при стандартных (общепринятых) условиях культивирования, тем выше качество оценки морфофункционального состояния клеток, которое можно принять за норму для данной клеточной линии. Такой подход облегчает изучение реакции данной клеточной популяции как на изменение условий культивирования, так и на действие тех или иных агентов, влияющих на клетки или их отдельные структуры.

Как следует из наших предыдущих работ (Петров, 2013; Петров и др., 2013), для оценки состояния клеток в культуре, в частности клеток линии HeLa, можно использовать их ядрышки. В этих клетках при обычной световой микроскопии благодаря более высокой оптической плотности хорошо идентифицируются немногочисленные (обычно 2—3 на ядро, реже 4—5) крупные ядрышки. Это дает возможность анализировать их в живых клетках. В настоящей работе продолжен сравнительный анализ состояния клеток линии HeLa-M до и после воздействия митомицина С в концентрациях, используемых при получении фидерных клеток. Внутриклеточным объектом исследования были ядрышки только делящихся клеток и их дочерних потомков.

Материал и метод

Объектом исследования служили клетки постоянной линии M-HeLa (эпителиоидная карцинома шейки матки человека, сублиния HeLa), полученные из Российской кол-

лекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Культивировали клетки в пластиковых чашках Петри (35 мм; Nunk, Дания) на среде ДМЕМ (Gibco, США) в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °С. В питательную среду добавляли 10 % эмбриональной сыворотки коров (Gibco, США) и 40 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 культивировали еще 2 ч. После этого удаляли среду с митостатиком, дважды ополаскивали клетки PBS и добавляли свежую питательную среду без митомицина. Контрольную чашку с клетками убрали 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 завершили.

Полученные цифровые изображения клеток анализировали с помощью программы ImageJ 1.47j (Rasband, W. S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, США, <http://imagej.nih.gov/ij/>). Подсчитывали число ядрышек в ядрах материнских и дочерних клеток. Выборка материнских клеток в контроле составила 108 клеток, в опыте с митомицином С — 53. Соответственно количество дочерних клеток в 2 раза больше. Для статистической обработки данных и построения диаграмм использовали Excel 2010 (MS Corporation, США).

Результаты

В нашей предыдущей работе было показано, что у клеток M-HeLa общая площадь ядрышек в процессе роста культуры в целом изменяется пропорционально изменению площади ядра как в контроле, так и при воздействии на клетки митомицина С (Петров и др., 2013). Среднее число ядрышек на клетку в процессе роста культуры немного увеличивается и также не зависит от воздействия на клетки митомицина С. Следует заметить, что последние данные (о числе ядрышек на клетку), хотя они и получены с использованием большой выборки клеток, это усредненные данные для двух временных точек (0 и 1 сут, 0 и 2 сут), нивелирующие индивидуальные особенности клеток. При этом регистрацию изображений клеток проводили при обычной световой микроскопии.

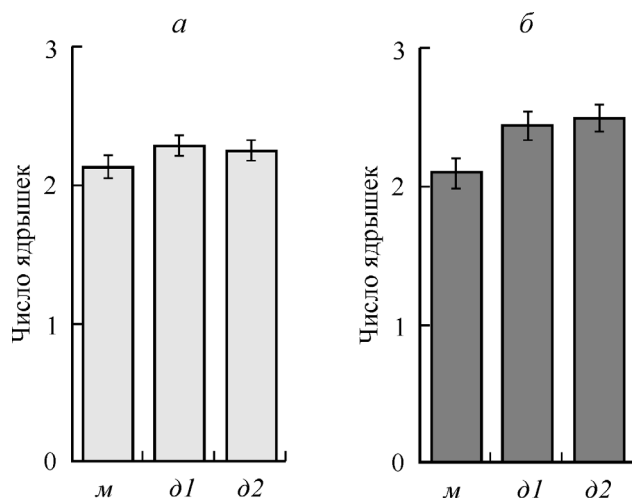


Рис. 1. Среднее число ядрышек на ядро в контрольной клеточной популяции (а) и в популяции клеток после 2 ч экспонирования в среде с 10 мкг/мл митомицина С (б).

m — материнские клетки, d1 и d2 — дочерние клетки (отбор в группы проведен случайным образом); вертикальные отрезки — ошибка среднего.

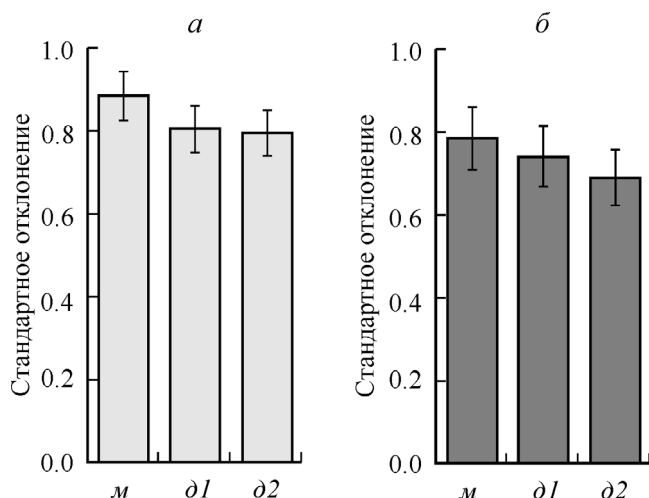


Рис. 2. Стандартное отклонение числа ядрышек на ядро в контрольных клетках (а) и в клетках после 2-часового действия 10 мкг/мл митомицина С (б).

Обозначение те же, что и на рис. 1.

Цейтраферная съемка, помимо того что позволяет значительно увеличить число точек регистрации, дает возможность проследить судьбу отдельных клеток. Таким образом, можно сравнивать состояние данной материнской клетки с ее дочерними клетками. В настоящей работе при одних и тех же условиях культивирования одной и той же клеточной популяции удалось зарегистрировать число ядрышек у 108 материнских и соответственно столько же пар дочерних клеток контрольной популяции. Для популяции клеток, обработанных митомицином, это число составило 53. Очевидно, что уменьшение выборки связано с тем, что в нее попали только те клетки, которые после обработки митомицином давали функционально активные дочерние клетки. Данные представлены на рис. 1.

Следует отметить, что в данном случае пары дочерних клеток не были объединены в одну группу, а представлены двумя группами случайно отобранных клеток. Как и ожидалось, различия между группами дочерних клеток нет ни в контроле, ни в опыте. При этом число ядрышек в дочерних клетках выше, чем в материнских клетках. Правда, если подходить формально, то достоверные различия ($P < 0.05$) между материнскими и дочерними клетками (каждой группы) выявляются только для клеточной популяции, обработанной митомицином. Однако есть все основания утверждать, что тенденция к увеличению числа ядрышек в клетках в процессе роста культуры остается, поскольку такие данные были получены ранее (Петров и др., 2013). Кстати, если в контроле объединить обе группы дочерних клеток, то различия между ними и материнскими клетками будут также достоверны и в этом случае.

Если исходить из предположения о том, что варьирование числа ядрышек на клетку описывается нормальным распределением, то наряду со средним значением имеет смысл анализировать еще один параметр — стандартное отклонение. Такие данные представлены на рис. 2. Формально по этому параметру здесь нет достоверных различий между материнскими и дочерними клетками. Тем не менее это две принципиально разные группы, поскольку их достоверное различие подтверждено различием средних. Следовательно, можно анализировать особенности 2-го параметра нормального распределения — стандартного отклонения. Отчетливо проявляются две тенденции. В обоих случаях стандартное отклонение, указывающее на степень разброса значений в выборке, меньше для дочерних клеток (во всех четырех случаях). То же наблюдали при росте клеточной культуры в предыдущей работе, но данные не были опубликованы. Причем уменьшение стандартного отклонения для популяции клеток-потомков было достоверно меньше, чем для клеток-родителей.

Другая тенденция обнаруживается при сравнении данных рис. 1 и 2. Это разнонаправленное изменение среднего значения и стандартного отклонения как в контроле, так и при использовании митомицина при сравнении ядрышек материнских и дочерних клеток, т. е. дочерние клетки имеют тенденцию к увеличению среднего числа ядрышек на ядро при одновременном снижении величины стандартного отклонения. Такой вариант тоже говорит в пользу того, что материнские и дочерние клетки — это принципиально различные группы по данному признаку, что нетрудно обосновать логически. Представим группу объектов, которая по данному параметру может быть описана нормальным распределением. Если на эту группу воздействовать каким-либо внешним факто-

ром, приводящим к увеличению среднего значения исследуемого параметра, то одновременно произойдет (как правило, пропорциональное) увеличение (но не уменьшение!) стандартного отклонения.

Регистрация поведения отдельно взятой клетки при цитраферной съемке позволяет оценить степень совпадения числа ядрышек у дочерних клеток в сравнении с материнской. Поскольку основная масса клеток HeLa имеет не более четырех ядрышек, это количество было взято за верхний предел. Нижний соответственно равен 1 ядрышку на клетку. Нетрудно представить, что число вариантов, при котором количество ядрышек для материнской и ее дочерних клеток будет одним и тем же, равно 4. Сложнее представить, но нетрудно рассчитать, что количество вариантов, при котором число ядрышек в дочерних клетках одно и то же, но отличается от их числа в соответствующих материнских клетках, будет равно 12 (при максимальном числе ядрышек на клетку 4). Соответственно несовпадение числа ядрышек между тремя клетками (материнской и двумя ее дочерними) будет также равно 12. Если эти числа выразить в %, то они составят соответственно 14, 43 и 43 %. Если объединить первый и второй варианты совпадений, то получим 57 и 43 %. Это очень важные ожидаемые значения, совпадение которых с экспериментальными будет означать, что число ядрышек наследуется случайным образом.

После обработки экспериментальных данных были получены следующие результаты. Общее число совпадений количества ядрышек как у пар дочерних клеток, так и в сочетании с материнской клеткой составило в контроле 55 %, в эксперименте с митомицином — 57 %. Очевидно, эти величины соизмеримы с ожидаемым значением 57 %, что указывает на случайный характер совпадений числа ядрышек у клеток этих групп. Однако если рассматривать вариант совпадения для трех клеток (две дочерние и соответствующая материнская), то обнаруживаются значительные (в 1.5—2 раза) отличия от ожидаемой величины: для клеток в контроле — 28 %, для клеток, обработанных митомицином, — 23 % при ожидаемом значении 14 %. Такие различия указывают на неслучайный характер совпадения числа ядрышек у близкородственных клеток как в контроле, так и в эксперименте, хотя клетки, обработанные митомицином, проявляют некоторую тенденцию к уменьшению совпадений числа ядрышек.

Обсуждение

С развитием вычислительной техники в медико-биологические исследования стал широко внедряться компьютерный анализ цифровых изображений различных биологических объектов, в частности ядрышек (Kodiha et al., 2011; Moore et al., 2011). Морфометрический анализ ядрышек широко используют в практической медицине при диагностике некоторых заболеваний, в том числе и онкологических (Aaltomaa et al., 1993; Olinici et al., 1997; Штейн и др., 1999; Лазарев и др., 2002; Мамаев и др., 2002; Chen et al., 2002). Сравнивают ядрышки (площадь, число и т. д.) опухолевых и здоровых тканей, для которых установлены нормативные величины по данному ядрышковому параметру. Несмотря на то что клетки перерабатываемых линий относятся к трансформированным и в терминах медицины являются патологией, с позиций биологии клеток в культуре их состояние при стандартных (для данной линии) условиях культивирования мож-

но рассматривать как нормальное. По аналогии с такими дисциплинами, как например нормальная физиология или нормальная анатомия, речь идет о нормальной биологии клеток в культуре. Для ее создания необходимо иметь определенный комплект морфофункциональных параметров, характеризующих клетки данной линии. Морфометрические характеристики ядрышек культивируемых клеток, как и клеток тканей многоклеточных, — надежный показатель для оценки нормального состояния постоянных клеточных линий.

Из данных литературы известно, что число ядрышек и их размер увеличиваются при трансформации нормальных клеток в опухолевые (Derenzini et al., 2009; Болгова и др., 2012). Этот феномен связывают с усилением белкового синтеза в раковых клетках. Однако относительно клеток HeLa такую интерпретацию нельзя считать удовлетворительной. Эти клетки уже трансформированы. Есть данные, указывающие на корреляцию между числом ядрышек и плоидностью клеток (Анисимова, Анисимов, 2005). Как известно, клетки постоянных линий (и HeLa в том числе) в отличие от клеток в организме не имеют постоянного числа хромосом. Для таких линий соотношение клеток с разным кариотипом при прочих равных условиях величина постоянная. При изменении условий культивирования она может изменяться, но со временем возвращается к первоначальному состоянию (Полянская, Кольцова, 2013).

Если эти факты связать с тем, что ядрышковые организаторы имеют не все хромосомы человека (10 на диплоидный набор), то логично представленные в настоящей работе данные рассматривать в предположении связи между числом ядрышек и числом хромосом в клетке. Иными словами, по числу ядрышек на ядро можно судить о числе ядрышковых организаторов, а следовательно, и об относительном числе хромосом в клетке.

Принимая во внимание сказанное, рассмотрим результаты настоящей работы. В контрольной популяции клеток можно отметить тенденцию к росту числа ядрышек у дочерних клеток. Это указывает на то, что в первом же поколении даже при обычных условиях культивирования в популяции клеток HeLa нарушается постоянство соотношения клеток с различным кариотипом и, по-видимому, возрастает число клеток с большим числом хромосом. Митомицин С усиливает этот эффект. Строго говоря, это не столько действие митомицина, сколько его последствие, поскольку данные получены на клетках, отмытых от этого антибиотика. Так как митомицин связывается с ДНК в ее малой бороздке, он может изменять нативную структуру ДНК и тем самым влиять на соотношение клеток с разным кариотипом.

Представленные результаты указывают на специфичность последствия митомицина. Во-первых, уменьшение стандартного отклонения при увеличении среднего значения означает, что дисперсия клеток по числу ядрышек у клеток, обработанных митомицином, уменьшается. Уменьшение может произойти только в том случае, если в популяции будут преобладать клетки с каким-то предпочтительным кариотипом. Данных о предпочтительном взаимодействии митомицина с теми или иными хромосомами в литературе нет. Более вероятным можно считать предположение о том, что изменение каких-то определенных хромосом материнской клетки после ее обработки митомицином снижает жизнеспособность ее дочерних клеток, т. е. специфичность действия митомицина вторична. Этот факт может быть полезным для изучения

важности той или иной хромосомы для выживания клеток линии HeLa при стандартных условиях культивирования.

Во-вторых, при отсутствии специфического эффекта митомидина не должен был бы влиять на соотношение наследуемости числа ядрышек. Как следует из представленных данных, вероятность совпадения числа ядрышек в материнских и дочерних клетках в контроле в 2 раза выше по сравнению с ожидаемым (28 % против 14). В случае митомидина случайность такого совпадения возрастает (23 % против 14). Этот результат можно интерпретировать как снижение точности расхождения хроматид с «митомидиновыми» ДНК у материнских клеток.

Относительная простота морфологии ядрышек, видимая в световой микроскоп, безусловно, не отражает их сложного функционального состояния. К тому же ядрышки — очень динамичные структуры, исчезающие, как и хромосомы, во время митоза (Жарская, Зацепина, 2007). Поэтому нельзя делать категоричные утверждения на основании одной работы. Однако можно предположить, что в норме (при прочих равных условиях) доля клеток линии M-HeLa, у которых в первом поколении число ядрышек в дочерних клетках такое же, как в материнских, составляет приблизительно 1/7 от всей клеточной популяции ($28 - 14 = 14$ (%), т. е. около 1/7).

Список литературы

- Анисимова А. А., Анисимов А. П. 2005. Морфофункциональные параметры ядрышек полиплоидных слизистых и белковых клеток слюнной железы улитки *Succinea lauta*. Цитология. 47 (1) : 14—22. (Anisimova A. A., Anisimov A. P. 2005. Morpho-functional parameters of nucleoli in polyploid mucous and albumen cells of salivary gland in the snail *Succinea lauta*. Tsitologiya. 47 (1) : 14—22.)
- Болгова Л. С., Туганова Т. Н., Алексеенко О. И. 2012. Морфофункциональные типы ядрышек при дисплазиях цилиндрического эпителия и железистом раке шейки матки. Клини. онкология. 5 (1) : 158—162. (Bolgova L. S., Tuganova T. N., Alekseenko O. I. 2012. Morphofunctional types of nucleoli in dysplasia of columnar epithelium and cervical adenocarcinoma. Klin. Oncologiya. 5 (1) : 158—162.)
- Жарская О. О., Зацепина О. В. 2007. Динамика и механизмы реорганизации ядрышка в митозе. Цитология. 49 (5) : 355—369. (Zharskaya O. O., Zatssepina O. V. 2007. The dynamics and mechanisms of nucleolar reorganization during mitosis. Cell Tissue Biol. 1 (4) : 277—290.)
- Лазарев А. Ф., Климачев В. В., Бобров И. П., Лубенников В. А. 2002. Характеристика ядрышкового аппарата опухолевых клеток при раке желудка. Архив патологии. 64 (6) : 30—32. (Lasarev A. F., Klimachev V. V., Bobrov I. P., Lubennikov V. A. 2002. The characteristic of the nucleolar apparatus of tumour cells at a gastric cancer. Arhiv Pathologii. 64 (6) : 30—32.)
- Мамаев Н. Н., Гиндина Т. Л., Скороход И. А., Кондакова Е. В., Подольцева Э. И. 2002. Количественная характеристика гемопоэза у больных множественной миеломой по данным серебрения ядрышек. Гематология и трансфузиология. 47 (4) : 24—27. (Mamaev N. N., Gindina T. L., Skorokhod I. A., Kondakova E. V., Podoltseva E. I. 2002. Hematologiya and Transfusiologiya. 47 (4) : 24—27.)
- Петров Ю. П. 2013. Ответ клеток линии HeLa на действие митомидина С. I. Деление клеток. Цитология. 55 (12) : 874—878. (Petrov Yu. P. 2013. Response of HeLa cells to mitomycin C. I. Cell division. Cell Tissue Biol. 8 (2) : 000—000.)
- Петров Ю. П., Негуляев Ю. А., Цупкина Н. В. 2014. Ответ клеток линии HeLa на действие митомидина С. II. Морфометрия клеток. Цитология. 55 (12) : 879—885. (Petrov Yu. P., Negulyaev Yu. A., Tsupkina N. N. 2014. Response of HeLa cells to mitomycin C. II. Morphometry of the cells. Cell Tissue Biol. 8 (2) : 115—120.)
- Полянская Г. Г., Кольцова А. М. 2013. Влияние субстрата, включающего в себя белки внеклеточного матрикса, на карิโอтипическую изменчивость в двух клеточных линиях фибробластов кожи индийского мунтжака. Цитология. 55 (7) : 463—471. (Poljanskaya G. G., Koltsova A. M. 2013. The Influence of a substrate including extracellular matrix proteins on karyotypic variability in two cell lines of indian muntjac skin fibroblasts. Cell Tissue Biol. 7 (5) : 417—425.)
- Штейн Г. И., Кудрявцева М. В., Кудрявцев Б. Н. 1999. Изменение морфометрических параметров окрашенных серебром ядрышек гепатоцитов крыс при циррозе печени и в процессе ее реабилитации. Цитология. 41 (7) : 574—579. (Stein G. I., Kudryavtseva M. V., Kudryavtsev B. N. 1999. Change of morphometric parameters of the rat hepatocyte nucleoluses dyed by silver during hepatocirrhosis and rehabilitation. Tsitologiya. 41 (7) : 574—579.)
- Altomaa S., Lipponen P., Syrjanen K. 1993. Nucleolar organizer regions related to morphometry, flow cytology, sex steroid receptor content, tumor histology and prognosis in female breast cancer. Path. Res. Pract. 189 : 415—421.
- Chen M., Lee J. C., Wu X., Lo S. 2002. Morphometric analysis of AgNORs in nonkeratinizing carcinoma and adjacent normal epithelia in the nasopharynx. Anal. Quant. Cytol. Histol. 24 : 173—177.
- Derenzini M., Montanaro L., Treré D. 2009. What the nucleolus says to a tumour pathologist. Histopathology. 54 : 753—762.
- Kodiha M., Bański P., Stochaj U. 2011. Computer-based fluorescence quantification: a novel approach to study nucleolar biology. BMC Cell Biol. 3 : 12—25.
- Moore H. M., Bai B., Boisvert F. M., Latonen L., Rantanen V., Simpson J. C., Pepperkok R., Lamond A. I., Laiho M. 2011. Quantitative proteomics and dynamic imaging of the nucleolus reveal distinct responses to UV and ionizing radiation. Mol. Cell Proteomics. 10 : 1—14.
- Olinici C. D., Crisan D., Olinici C. I., Vaida M. 1997. Computer-based image analysis of nucleoli in prostate carcinoma. Rom. J. Morphol. Embryol. 43 : 163—167.

Поступила 4 IX 2013

RESPONSE OF HeLa CELLS TO MITOMYCINE C. III. THE ANALYSIS OF NUCLEOLI
OF MOTHER AND DAUGHTER 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

The comparative analysis of the number of nucleoli in cells of the established HeLa-M line was carried out before and after exposure to mitomycin C in a concentration of 10 µg/ml for 2 h. Using time-lapse microscopy, nucleoli in mother and their respective daughter cells were computed. It has been shown that the average number of nucleoli per cell is generally higher in daughter cells than in mother cells, and a standard deviation, on the contrary, decreases. An average number of nucleoli in daughter cells, whose mother cells had been treated with mitomycin C, was higher than in corresponding cells of control group. The separate analysis has been performed for the cells having from 1 to 4 nucleoli. Nonrandom complete coincidence of the number of nucleoli in mother and daughter cells has been typically shown for about 1/7 of the total cell population. Mitomycin C reduces this value of about 1.5 times.

Key words: a nucleus, a nucleolus, a daughter cell, a mother cell.
