

МОРФОЛОГИЯ КЛЕТОК ЛИНИИ NCTC КЛОН 929 ПОСЛЕ КОНТАКТА С КОЛЛАГЕНОМ I ТИПА, ДОБАВЛЕННЫМ В ПИТАТЕЛЬНУЮ СРЕДУ

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

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и

² Кафедра медицинской физики С.-Петербургского государственного политехнического университета;

* электронный адрес: upre3ov@mail.ru

Сравнивали морфометрические характеристики клеток линии NCTC до и после контакта с коллагеном I типа, добавленным в ростовую среду. Клетки сеяли на пластик в виде колоний. Через 1 сут после посева ростовую среду на 30 мин заменяли такой же средой, но содержащей 0,1 % коллагена I типа. После отмывания клеток от среды с коллагеном добавляли свежую среду и с помощью цейтраферной съемки в течение 7 ч регистрировали изображения клеток по краю колонии. Измеряли площадь клеток, степень их распластывания и поляризации. Показано, что после контакта клеток с коллагеном их площадь почти не изменялась, снижалась степень распластывания и резко падала доля поляризованных клеток. Высказано предположение о том, что коллаген активно участвует в формировании клетками длинных филоподий.

Ключевые слова: морфометрия, распластывание, поляризация клетки, ВКМ, филоподия, цитоскелет.

В связи с интенсивным развитием клеточных технологий особую значимость приобретают исследования поведения клеток в культуре. В частности, большое внимание уделяется взаимодействию культивируемых клеток с внеклеточным матриксом (ВКМ) и белками, входящими в его состав (Chen et al., 2007; Daley et al., 2008; Hanein, Horwitz, 2012; Hubmacher, Apté, 2013). Для этого исследуемые компоненты ВКМ, как правило, наносят на пластиковую подложку, а затем сажают исследуемые клетки (Couchman et al., 1983; Kurihara, Nagamune, 2005; Rhoads, Guan, 2007). В настоящее время для изучения поведения клеток все чаще используют 3D-культуры (Green, Yamada, 2007; Rhee, 2009; Seda et al., 2009; Tzezana et al., 2012). В этом случае клетки сеют не на субстрат, а внутрь его, например в коллагеновый гель (Rhee, Grinnell, 2007; Narunaga, Yamada, 2011). Считается, что такое культивирование в большей степени имитирует поведение клеток в составе тканей многоклеточного организма.

Однако 3D-модель не настолько соответствует строению тканей, как представляется на первый взгляд. В этих моделях клетки контактируют с избыточным количеством белков ВКМ, которые равномерно окружают клетки со всех сторон, тогда как в тканях взаимодействие происходит в первую очередь между клетками, а белки ВКМ в этом процессе могут выполнять лишь роль посредников. К тому же даже в тканях состав клеток неоднороден, а значит, и взаимодействие между отдельными клетками определяется степенью их индивидуальности. Типичный пример — эпидермис. В нем существует определенный (от базальной мембранны к поверхности) градиент клеток разной степени зрелости (Muroyama, Lechler, 2012). Если клетки, окружающие данную клетку, функционально не-

однородны, то можно предположить, что и синтезируемый ими ВКМ тоже неоднороден (в частности, по белковому составу). Эта неоднородность клеточного окружения должна приводить к тому, что доля интегриновых рецепторов, взаимодействующих с тем или иным белком ВКМ, будет неодинакова в разных областях поверхности данной клетки. Следовательно, и характер взаимодействия клеток в одной и той же популяции должен быть детерминирован индивидуальными особенностями каждой клетки.

Основываясь на этом предположении, мы предлагаем иную модель, имитирующую неоднородность окружающей клетку среды. В предлагаемой модели клетки сажают на обычную пластиковую подложку, а не на подложку, покрытую белками ВКМ. Дают клеткам время (не менее 30 мин) для прикрепления. Затем на короткое время в среду добавляют исследуемый белок ВКМ, полагая, что часть его молекул будет связываться рецепторами, расположеннымными на дорсальной поверхности клетки и не участвующими в данный момент в клеточной адгезии к подложке. Через 30 мин экспозиции среды с коллагеном заменяют обычной ростовой средой. Цель настоящей работы — используя морфометрические параметры, изучить реакцию клетки на ее кратковременное взаимодействие с растворенным в культуральной среде коллагеном I типа.

Материал и методика

В качестве объекта исследования была выбрана постоянная клеточная линия NCTC (клон 929, мышь), клетки которой имеют фибробластоподобную форму и склон-

ность к активной миграции по субстрату. Клетки получены из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН (Санкт-Петербург).

Для культивирования клеток использовали пластиковые чашки Петри (35 мм; Nunk, Дания), питательную среду, состоящую из среды DMEM (Gibco, США), 10 % сыроворотки плодов коров (Gibco, США) и 40 мкг/мл гентамицина. Культуры клеток выращивали в инкубаторе в атмосфере с 5 % CO₂ при 37 °C. Перед началом эксперимента клетки, достигшие монослоя, рассевали в виде колоний, как было описано ранее (Петров и др., 2011). Такой способ посева имеет определенные преимущества, когда по условиям эксперимента нет возможности одновременно регистрировать состояние контрольных и опытных клеток. Во-первых, миграция и размножение клеток по краю колонии практически постоянны во время экспоненциальной фазы роста клеточной популяции. Во-вторых, в этой области исключается зависимость роста плотности клеток от посевной концентрации. Для получения колоний на дно чашки Петри наносили по 5 мкл суспензии клеток в виде капель. Таким образом, в каждой чашке формировали по 4 колонии диаметром около 2—3 мм приблизительно на равном расстоянии друг от друга и от края чашки. Затем клетки помещали в CO₂-инкубатор на 1 ч, чтобы они могли прикрепиться к подложке. После этого неприкрепившиеся клетки удаляли, трижды ополаскивая чашки культуральной средой, добавляли свежую питательную среду и культивировали при стандартных условиях.

Через 1 сут одну из чашек брали в эксперимент. Удаляли питательную среду, заменяя ее такой же, но содержащей 0.1 % коллагена I типа. Коллаген был любезно предоставлен Л. В. Кухаревой (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки помещали в CO₂-инкубатор на 30 мин. Затем среду с коллагеном удаляли, 4 раза ополаскивали чашку средой без коллагена и после добавления питательной среды приступали к цейтраферной съемке.

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 CO₂). Регистрацию изображений проводили в течение 7 ч 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). Заданные условия эксперимента поддерживались автоматически программой AxioVision 4.8.2 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Германия). Через 1 сут чашку с опытными клетками заменяли на такую же с контрольными клетками. Данная установка позволяет регистрировать клетки в 4 полях зрения (поэтому и сеяли клетки в виде 4 колоний). В каждом случае поле зрения выбирали по краю колоний со стороны центра чашки.

Для количественного анализа использовали отдельные изображения, записанные в формате JPEG. Их обработку проводили с помощью программ ImageJ 1.47j (Rasband, W. S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, США, <http://imagej.nih.gov/ij/>), Excel 2010 (MS Corporation, США) и Origin 6.1 (OriginLab Corporation, США). Параметры, используемые для анализа клеток: площадь проекции клетки на подложку (далее

площадь клетки); коэффициент распластывания Rp/Ra, вычисляемый как отношение радиуса (Rp), рассчитанного из величины периметра клетки, взятой как длина окружности, и радиуса (Ra), рассчитанного из величины площади клетки, принятой за площадь круга (Kuz'minukh, Petrov, 2004); коэффициент поляризации M/m, вычисляемый как соотношение длинной (M) и короткой (m) осей клетки, если ее форму представить в виде эллипса (Петров, Цупкина, 2012).

Результаты

На рис. 1 представлен общий вид контрольных и опытных клеток в начале и в конце цейтраферной съемки соответственно в одних и тех же полях зрения. Поля зрения выбирали таким образом, чтобы на первых снимках клетки занимали приблизительно половину поля изображения, исходя из того что со временем они центробежно мигрируют от колонии (Петров и др., 2011). Можно заметить, что к концу съемки количество клеток в полях зрения увеличилось. Какие-либо другие изменения клеток визуально практически не выявляются. Чтобы объективно оценить изменения морфологии клеток, были сделаны расчеты их морфометрических показателей и данные представлены в виде диаграмм и графиков.

Очевидно, что в каждом поле изображения количество клеток со временем должно увеличиваться. С одной стороны, это обусловлено миграцией клеток в направлении свободного пространства, а с другой — вхождением некоторых клеток в митоз. Нет оснований полагать, что коллаген может изменить округлую форму метафазных клеток или дочерних, только что вышедших из митоза. Поэтому такие клетки исключали из выборки. Их доля за период наблюдения была невелика. Через каждые 50 мин от начала съемки проводили подсчет и анализ всех клеток в каждом поле зрения. Динамика изменения количества клеток в полях зрения показана на рис. 2. То, что значения числа клеток в контроле выше, чем в опыте, не имеет принципиального значения для сравнения обеих групп клеток. Это связано с тем, что критерием выбора поля зрения было не точное количество в нем клеток перед началом съемки, а приблизительно равное соотношение частей поля зрения с клетками и без них. Этот критерий основан на предположении о том, что независимо от роста колонии только по ее краю морфофизиологическое состояние «средней» клетки остается постоянным во времени. Данные, представленные на рис. 2, показывают, что в среднем прирост числа клеток в обоих случаях один и тот же, о чем свидетельствует параллельность прямых линейной регрессии.

Полагая, что в процессе миграции каждая клетка изменяет свою морфологию, совокупность клеток в каждый данный момент времени можно рассматривать как относительно независимую выборку по любому из параметров, характеризующих клеточную форму. Измеряя морфологические параметры клеток в каждом поле зрения и объединяя их в общую выборку, можно рассчитать, например, среднюю площадь клетки за весь период наблюдения для контрольной и опытной популяций. Такой результат представлен на рис. 3, а. Различия между клетками по данному параметру очевидны ($P < 0.01$). Очень небольшая величина ошибки среднего связана с двумя факторами. Во-первых, как известно, она обратно пропорциональна величине выборки. В данном случае общее

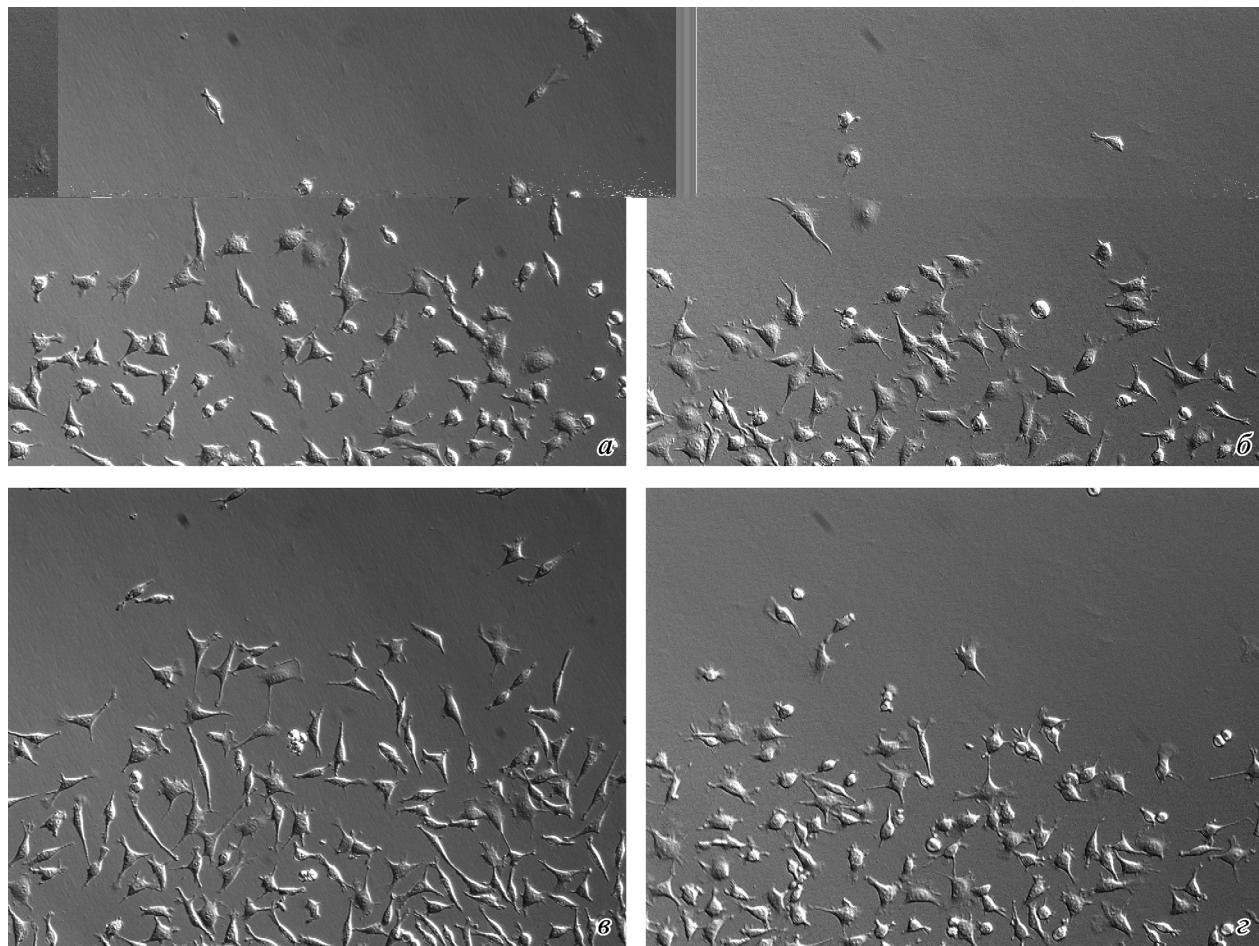


Рис. 1. Клетки NCTC в контроле (*a, b*) и после 30-минутного пребывания в ростовой среде, содержащей 0.1 % коллагена I типа (*c, d*).
a, b — начало цейтраферной съемки; *c, d* — те же поля зрения через 7 ч соответственно.

число контрольных клеток составило приблизительно 4500, а в опыте — 4000. Во-вторых, ошибка среднего будет тем меньше, чем стабильнее данный параметр во времени. Поэтому, несмотря на очевидные различия средних, необходимо проанализировать динамику изменения площади клеток обеих групп. Эти данные представлены на рис. 3, б.

Видно, что в целом значения площади клеток в опытной группе выше, чем в контрольной, что отражает и диаграмма рис. 3, *a*. Причем средняя площадь контрольных клеток практически не изменяется во времени, в то время как у клеток, контактировавших с коллагеном, она постепенно уменьшается, приближаясь к контрольным значениям в конце периода наблюдения. Несмотря на то что общая сумма клеток в 4 полях зрения достаточно велика даже для каждой временной точки (300—400 клеток), ошибка среднего заметно возрастает, особенно в начальных точках. Это признак относительно высокой дисперсии обеих выборок. Он лишний раз указывает на то, что у клеток NCTC из-за их высокой подвижности и соответственно постоянно изменяющейся морфологии данный параметр варьирует.

Регистрация изменений во времени только площади клеток недостаточна для характеристики клеток с повышенной склонностью к изменению своей формы. Для анализа степени распластывания клеток мы используем параметр Rp/Ra , названный нами коэффициентом распла-

стывания. Поскольку это соотношение положительных величин, он не может быть ниже 1. Значение 1 чисто теоретическое и соответствует правильному кругу. Чем выше этот коэффициент, тем в большей степени клетка отличается от круга. Очевидно, что высокие значения бу-

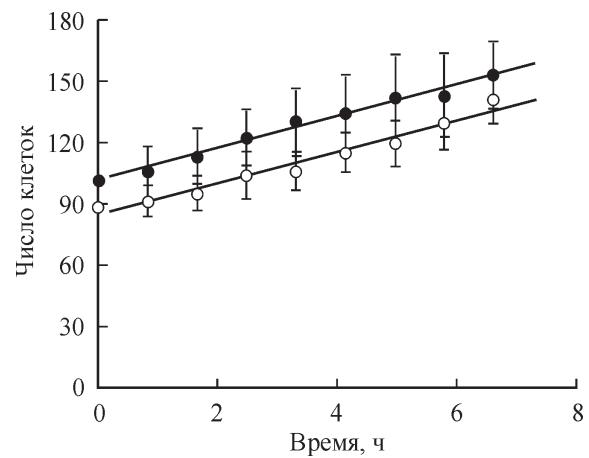


Рис. 2. Динамика изменения числа клеток в поле зрения.
 Чёрные кружки — контроль (интактные клетки), светлые кружки — клетки после контакта с коллагеном I типа. Сплошные линии — линейная регрессия. Представлены средние значения и их ошибки (вертикальные отрезки).

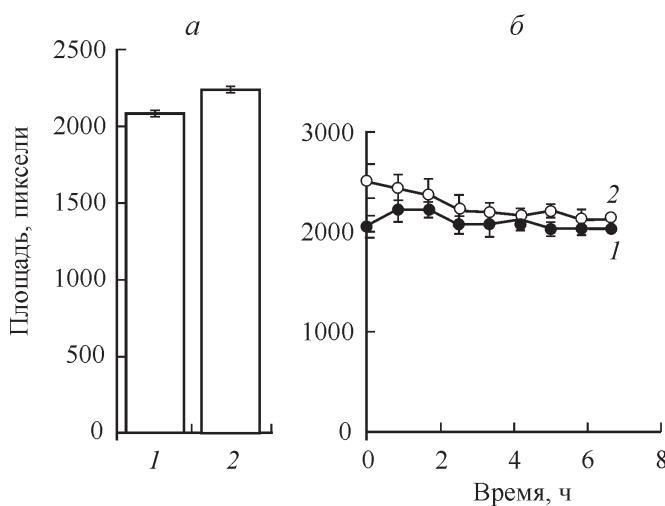


Рис. 3. Площадь контрольных клеток NCTC (столбец и кривая 1) и клеток после 30-минутного пребывания в ростовой среде, содержащей 0.1 % коллагена I типа (столбец и кривая 2). а — средняя площадь клетки всей выборки, б — динамика изменения площади клеток во времени. Вертикальные отрезки — соответствующие ошибки среднего.

дуть иметь те клетки, у которых много филоподий. На рис. 4, а представлены диаграммы средних значений коэффициентов распластывания, рассчитанных, как и для площади (рис. 3, а), исходя из общего количества регистрируемых клеток. Эта диаграмма наглядно демонстрирует, что в целом степень распластывания клеток, имевших контакт с коллагеном, значительно меньше ($P < 0.01$). Это же подтверждает график, отражающий динамику данного параметра во времени (рис. 4, б). В отличие от площади степень распластывания клеток обеих групп в начале наблюдения различается меньше, чем в конце.

Несмотря на то что коэффициент распластывания показал выраженные различия между обеими группами клеток, для их характеристики необходимо рассчитать и другой параметр — коэффициент поляризации (M/m). Его

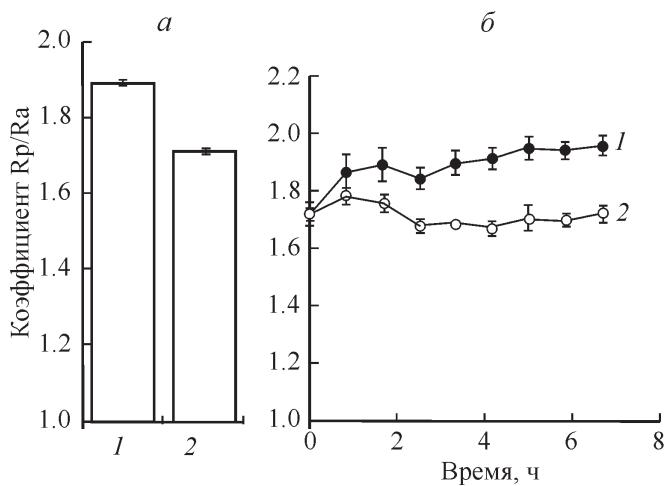


Рис. 4. Коэффициент распластанности (Rp/Ra) контрольных клеток NCTC (столбец и кривая 1) и клеток после 30-минутного пребывания в ростовой среде, содержащей 0.1 % коллагена I типа (столбец и кривая 2). а — коэффициент Rp/Ra клеток с учетом всей выборки, б — динамика его изменения во времени. Вертикальные отрезки — соответствующие ошибки среднего.

величина также зависит от степени распластывания клеток, но в большей степени от их поляризации, особенно при образовании длинных филоподий. Как и коэффициент Rp/Ra, коэффициент M/m не может быть ниже 1. Результаты расчета коэффициента поляризации представлены на рис. 5. Как видно, различия клеток по этому коэффициенту между обеими группами выражены еще сильнее, чем в случае коэффициента распластывания. Причем эти различия увеличиваются во времени только за счет роста коэффициента поляризации контрольных клеток. Значения этого параметра у клеток, контактирующих с коллагеном, практически не изменяются.

Представленные выше данные указывают на то, что кратковременный контакт коллагена I типа с уже прикрепленными и распластанными на пластике клетками вызывает изменение их морфологии. Однако однозначность этого вывода может быть верна только в случае однородной популяции. Тем не менее из рис. 1 этого не следует — даже визуально можно отметить, что клетки в обеих группах имеют выраженные морфологические различия. Оценить степень этих различий можно с помощью гистограмм, представленных на рис. 6.

При построении гистограмм, так же как и при расчетах диаграмм, использовали все изображения клеток в контрольных и экспериментальных группах — соответственно 4500 и 4000. Это позволило увеличить количество разрядов (карманов) на графиках, чтобы нагляднее представить вариабельность популяций по исследуемым параметрам. Полагая, что клеточная популяция состоит (условно) из отдельных более однородных субпопуляций, для их обнаружения рассчитывали отдельные кривые частот, считая, что они имеют нормальное распределение. Во всех случаях было достаточно рассчитать не более 3 пиков, чтобы суммарные кривые регрессии соответствовали экспериментальным значениям с коэффициентами корреляции не менее 0.99.

Рис. 6, а демонстрирует соотношение клеток с различной величиной площади для обеих групп исследуемых клеток. Видно, что каждая группа (показаны черными и белыми кружками) состоит из 3 подгрупп, показан-

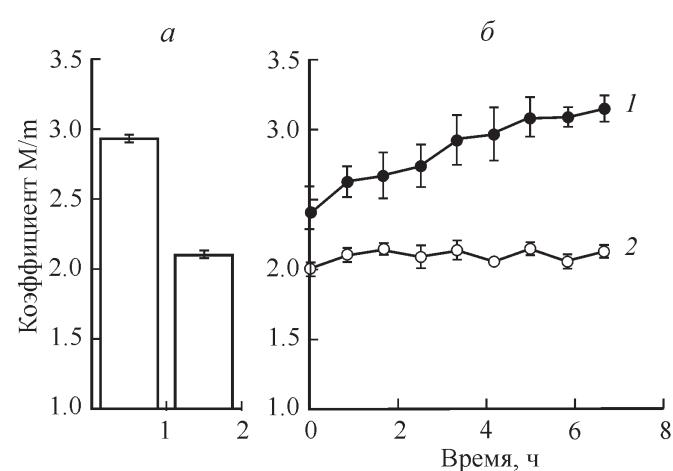


Рис. 5. Коэффициент поляризации (M/m) контрольных клеток NCTC (столбец и кривая 1) и клеток после 30-минутного пребывания в ростовой среде, содержащей 0.1 % коллагена I типа (столбец и кривая 2). а — коэффициент M/m клеток с учетом всей выборки, б — динамика его изменения во времени. Вертикальные отрезки — соответствующие ошибки среднего.

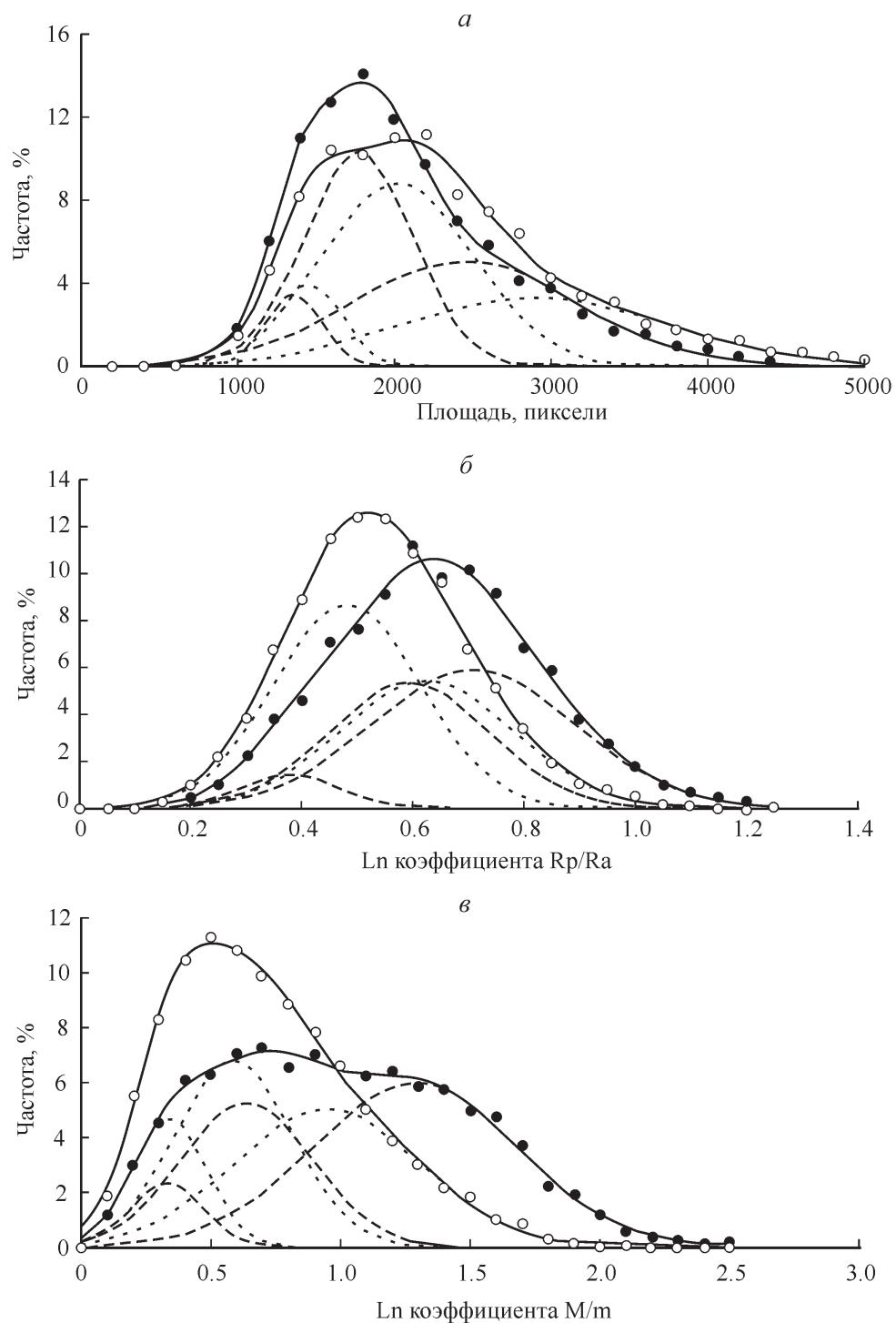


Рис. 6. Гистограммы распределения клеток с различной площадью (а), коэффициентами распластирования (б) и поляризации (в) с учетом выборки всех клеток, анализируемых за период наблюдения.

Темные кружки — экспериментальные значения клеток в контроле, светлые кружки — значения клеток после 30-минутного пребывания в ростовой среде, содержащей 0.1 % коллагена I типа. Штриховые линии (контроль), пунктирные линии (коллаген) — отдельные линии регрессии (пики), рассчитанные из предположения о нормальном распределении клеток по параметру «площадь клетки», сплошные линии — соответствующие усредненные линии регрессии. Объяснение см. в тексте.

ных тремя штриховыми и тремя пунктирными линиями на рисунке. Количество клеток в каждой из соответствующих подгрупп приблизительно одно и то же (формально оно численно равно площади под соответствующей кривой). Средние размеры площади (они соответствуют вершинам пиков кривых) под кривыми в подгруппах

для клеток, контактировавших с коллагеном, возрастают, но их соотношение в целом остается тем же, что и в контроле.

Подобные гистограммы также были рассчитаны для коэффициентов распластирования и поляризации. Предварительно их абсолютные значения были переведены в ло-

гарифмы. Это позволило сделать шкалу оси абсцисс равномерной, чтобы адекватно использовать нормальное распределение для расчета теоретических кривых. К тому же тогда отсчет по абсциссе начинается с 0, а не с 1, так как $Ln1 = 0$.

Гистограммы распределения клеток в зависимости от величины коэффициента распластывания представлены на рис. 6, б. Усредненные расчетные кривые распределения в обоих случаях относительно симметричны, без выраженных пиков. В целом после контакта клеток с коллагеном их коэффициент распластывания снижается. Несмотря на то что визуально пики не выявляются, в обоих случаях более корректное соответствие теоретических кривых экспериментальным значениям получили при использовании 3 расчетных кривых в контроле и 2 в эксперименте. В контрольной группе почти все клетки сосредоточены в пиках с довольно близкими высокими значениями коэффициента Rp/Ra , небольшая подгруппа клеток имеет низкую степень распластывания (на рис. 6, б небольшой пик слева). При уменьшении степени распластывания «коллагеновых» клеток эта небольшая подгруппа либо исчезает, либо не обнаруживается, из-за того что ее клетки ассимилируются подгруппой, соответствующей левому пику клеток этой группы. В целом при анализе этих кривых, так же как и в случае площади клеток, наиболее вероятным представляется пропорциональное снижение коэффициентов распластывания всех типов клеток, контактировавших с коллагеном, по сравнению с контрольными клетками. Об этом говорят приблизительно то же соотношение количества клеток в пиках обеих групп (без учета малого пика контрольных клеток) и приблизительно пропорциональный сдвиг их в сторону меньших значений коэффициента распластывания для «коллагеновых» клеток.

Различие клеток обеих групп по коэффициенту поляризации имеет свои особенности (рис. 6, в). Обе группы также можно представить в виде трех подгрупп. Однако локализация первых двух пиков одна и та же в обоих случаях. Они различаются только по амплитуде, что указывает на увеличение доли таких клеток после контакта клеточной популяции с коллагеном. При этом третий пик (крайний правый) заметно смещается в сторону меньших значений. Это приводит к тому, что в среднем клетки экспериментальной группы имеют низкие значения коэффициента поляризации.

Обсуждение

Для изучения взаимодействия культивируемых клеток с белками ВКМ используют либо традиционную методику, когда клетки сажают на поверхность, покрытую тем или иным компонентом ВКМ, либо помещают в гель, например в коллагеновый, и такая методика получила название «3D-культурирование». В обоих случаях контакт клеток с экзогенным ВКМ сохраняется до следующего пересева. Отдельного внимания заслуживает работа, в которой исследовали распластывание клеток (в виде монослоя) между двумя поликариламидными подложками (Beningo et al., 2004). Занимая некоторое промежуточное положение между 2D- и 3D-культуриванием, именно такой способ, по-видимому, в наибольшей степени имитирует взаимодействие клеток друг с другом и ВКМ в условиях *in vivo*. В отличие от этих методик мы использовали относительно короткий (30 мин) контакт клеток с

коллагеном и меньшее его количество (0.1 %), чем при использовании коллагеновой подложки или коллагенового геля для 3D-культур. Выбирая эти условия, исходили из того, что такие экспозиция и концентрация должны быть достаточными для адсорбции коллагена интегринами клетки на ее дорсальной (верхней) поверхности и для возможности отслеживания реакции клетки на этот белок. Задачи проследить сигнал на молекулярном, внутриклеточном уровне не ставили, а рассчитывали на его конечное проявление — изменение морфологии клетки.

Используемый нами посев клеток в виде колоний имеет особенность, облегчающую сравнение контрольных и опытных клеток при цайтраферной видеосъемке. На границе колонии относительно длительное время концентрация клеток на единице площади практически остается постоянной, несмотря на увеличение размеров самой колонии. Последнее в определенной степени создает ограничения при анализе морфометрических параметров клеток, поскольку во время цайтраферной съемки поле зрения должно быть фиксировано. Тем не менее выбранный нами промежуток времени в 7 ч был достаточен, чтобы граница колонии еще не уходила за пределы поля зрения и чтобы в нем не появились участки колонии с клетками, уже сформировавшими монослои. Таким образом, фактически достигалась определенная перманентность эквивалента редкого посева, при котором сохраняется возможность свободного перемещения клеток относительно друг друга. Такой методический прием позволил одновременно посеять клетки одной и той же популяции, а использовать их для цайтраферной съемки в разное время после пересева без искажения конечного результата за счет сдвига во времени. Этим была достигнута возможность избежать различий в морфологии исследуемых клеток, связанных с увеличением их количества на единицу площади при росте культуры в обычных условиях.

Несмотря на то что число клеток в поле зрения увеличивается (рис. 2), при данных условиях культивирования оно детерминировано не столько размножением клеток, сколько их миграцией из колонии. Поскольку темп прироста числа клеток в контроле и эксперименте один и тот же в течение всего периода наблюдения, можно считать, что 30-минутный контакт клеток с коллагеном не влиял на скорость их передвижения. В то же время морфометрические параметры клеток (площадь, коэффициенты распластывания и поляризации) изменились. Отсюда следует, что изменения формы клеток в целом не связаны со скоростью их миграции.

Анализ площади клеток обнаружил ее незначительное увеличение после контакта клеток с коллагеном и постепенное снижение до уровня величин, соизмеримых с площадью контрольных клеток. Фактически это можно расценивать как отсутствие влияния коллагена на размеры клеток при его добавлении в питательную среду. Однако на форму клеток его влияние достаточно выражено. Коллаген снижает степень распластывания клеток и в значительной мере препятствует их поляризации, которая со временем возрастает у клеток контрольной группы. Клетки, имеющие высокий коэффициент поляризации, нельзя рассматривать как отдельную (генетическую) субпопуляцию, что формально следует из гистограмм рис. 6, в. Скорее всего, это подгруппы клеток, имеющие общее функциональное состояние и имитирующие истинные субпопуляции. Дело в том, что клетки мигрируют к краю колонии из зон, где они находятся в виде не очень плотного монослоя, поэтому там их поляризация меньше,

чем у клеток, где они разобщены. Мы полагаем, что низкие значения коэффициента поляризации у клеток, имевших контакт с коллагеном, обусловлены не только тем, что коллаген активно уменьшает поляризацию клеток на границе колонии, но и тем, что он блокирует поляризацию клеток, мигрирующих из монослоя к периферии колонии.

Причиной этого феномена может быть следующее. Экзогенный коллаген, связывая интегрины на дорсальной поверхности клетки, снижает их долю на вентральной поверхности, что в итоге может быть достаточным для снижения поляризации. В естественных условиях полимеризация коллагена детерминирована клеткой, причем в этом процессе наряду с другими компонентами ВКМ важную роль играют интегриновые рецепторы (Kadler et al., 2008). Одна полимерная молекула коллагена, по-видимому, может одновременно акцептироваться несколькими рецепторами. Тогда образовавшиеся коллагеноинтегриновые комплексы могут повысить ригидность плазматической мембраны. Можно предположить, что снижение гибкости мембранны в первую очередь будет препятствовать формированию длинных филоподий, снижая поляризацию клетки в целом.

Таким образом, можно утверждать, что при данных условиях коллаген I типа практически не влияет на площадь клеток, заметно уменьшает степень их распластывания и в значительной степени препятствует клеточной поляризации. Ранее на мезенхимных клетках человека нами было показано, что коллаген I типа, напротив, способствует поляризации клеток (Петров и др., 2013). Вряд ли это противоречие можно связать с типом клеток, скорее, эффект коллагена зависит от условий эксперимента. Мезенхимные клетки культивировали на подложке, предварительно покрытой коллагеном, а в настоящей работе клетки линии NCTC контактировали с этим белком, растворенным в культуральной среде. Объединяя эти результаты, можно прийти к заключению о том, что связывание поверхностных рецепторов с коллагеном необходимо клетке в первую очередь для формирования филоподий.

Как известно, важную роль в формировании филоподий играет актин. Полимеризация актина способствует формированию выпячивания плазматической мембранны в направлении роста актинового филамента (Mullins, Hansen, 2013). При этом актин полимеризуется таким образом, что наращивание полимерной молекулы происходит с конца, обращенного к внутренней поверхности плазматической мембранны (Yang, Svitkina, 2011; Grantham et al., 2012). С наружной стороны этот участок мембранны будет соответствовать кончику филоподии. При таком способе ее формирования полимер может увеличиваться в длину и одновременно быть фиксирован относительно клетки в целом. Видимо, в процессе эволюции этот механизм для клеток был закреплен не случайно. Очевидно, что при полимеризации актина с противоположного конца у клетки были бы дополнительные проблемы.

В работе Бенинго с соавторами (Beningo et al., 2004) показано, что культивирование 3T3-клеток между двумя полиакриламидными подложками, покрытыми фибронектином, приводит к удлинению клеток (как следует из представленных в этой работе фотографий, за счет длинных филоподий) и исчезновению у них ламеллоподий. Фактически при таком способе культивирования у клеток вдвое увеличивается возможность защоривания, что,

по-видимому, в большей степени облегчает формирование таких вытянутых клеточных структур, как филоподии.

Фиксировать актиновый микрофиламент клетка может, защоривая удлиняющуюся филоподию за субстрат. Этому способствуют интегриновые рецепторы, опосредуя связь клетки с подложкой через белки ВКМ (Huttenlocher, Horwitz, 2011; Weber et al., 2011; Wolfenson et al., 2013). Такое взаимодействие всех участников клеточной адгезии не только не препятствует полимеризации актина, а даже облегчает ее. Эта модель *in vitro*, по-видимому, адекватно отражает клеточные взаимодействия в тканях многоклеточного организма.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-00700-а).

Список литературы

- Петров Ю. П., Кухарева Л. А., Крылова Т. А. 2013. Влияние коллагена I типа и фибронектина на морфологию мезенхимных стромальных клеток человека в культуре. Цитология. 55 (7) : 452—462. (Petrov Yu. P., Kukhareva L. V., Krylova T. A. 2013. Effect of type I collagen and fibronectin on cell morphology of human MSCs *in vitro*. Tsitologiya. 55 (7) : 452—462.)
- Петров Ю. П., Негуляев Ю. А., Цупкина Н. В. 2011. Ориентация борозды деления у культивируемых клеток на примере линий L-929 и СНО. Цитология. 53 (11) : 839—847. (Petrov Yu. P., Negulyaev Yu. A., Tsupkina N. V. 2011. The position of cleavage furrow in cultivated cells on the example of lines L-929 and CHO. Tsitologiya. 53 (11) : 839—847.)
- Петров Ю. П., Цупкина Н. В. 2012. Особенности роста культуры клеток линии СНО. Цитология. 54 (10) : 754—760. (Petrov Yu. P., Tsupkina N. V. 2012. Growth features of CHO cells in culture. Tsitologiya. 54 (10) : 754—760.)
- Beningo K. A., Dembo M., Wang Y. L. 2004. Responses of fibroblasts to anchorage of dorsal extracellular matrix receptors. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 101 : 18 024—18 029.
- Chen S. S., Fitzgerald W., Zimmerberg J., Kleinman H. K., Margolis L. 2007. Cell-cell and cell-extracellular matrix interactions regulate embryonic stem cell differentiation. Stem Cells. 25 : 553—561.
- Couchman J. R., Höök M., Rees D. A., Timpl R. 1983. Adhesion, growth, and matrix production by fibroblasts on laminin substrates. J. Cell Biol. 96 : 177—183.
- Daley W. P., Peters S. B., Larsen M. 2008. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. J. Cell Sci. 121 : 255—264.
- Grantham J., Lassing I., Karlsson R. 2012. Controlling the cortical actin motor. Protoplasma. 249 : 1001—1015.
- Green J. A., Yamada K. M. 2007. Three-dimensional microenvironments modulate fibroblast signaling responses. Adv. Drug Deliv. Rev. 59 : 1293—1298.
- Hanein D., Horwitz A. R. 2012. The structure of cell-matrix adhesions: the new frontier. Curr. Opin. Cell Biol. 24 : 134—140.
- Harunaga J. S., Yamada K. M. 2011. Cell-matrix adhesions in 3D. Matrix Biol. 30 : 363—368.
- Hubmacher D., Apte S. S. 2013. The biology of the extracellular matrix: novel insights. Curr. Opin. Rheumatol. 25 : 65—70.
- Huttenlocher A., Horwitz A. R. 2011. Integrins in cell migration. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 3 : 1—16.
- Kadler K. E., Hill A., Canti-Laird E. G. 2008. Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators. Curr. Opin. Cell Biol. 20 : 495—501.
- Kurihara H., Nagamune T. 2005. Cell adhesion ability of artificial extracellular matrix proteins containing a long repetitive Arg-Gly-Asp sequence. J. Biosci. Bioeng. 100 : 82—87.

- 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.
- Mullins R. D., Hansen S. D. 2013. *In vitro* studies of actin filament and network dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 25 : 6—13.
- Muroyama A., Lechler T. 2012. Polarity and stratification of the epidermis. *Semin. Cell Develop. Biol.* 23 : 890—896.
- Rhee S. 2009. Fibroblasts in three dimensional matrices: cell migration and matrix remodeling. *Exp. Mol. Med.* 41 : 858—865.
- Rhee S., Grinnell F. 2007. Fibroblast mechanics in 3D collagen matrices. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 : 1299—1305.
- Rhoads D. S., Guan J. L. 2007. Analysis of directional cell migration on defined FN gradients: role of intracellular signalling molecules. *Exp. Cell Res.* 313 : 3859—3867.
- Seda T. R., Ghosh S., Laha M. M., Shevde N. K., Daheron L., Gimble J., Gumusderelioglu M., Kaplan D. L. 2009. Comparative chondrogenesis of human cell sources in 3D scaffolds. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 3 : 348—360.
- Tzezana R., Reznik S., Blumenthal J., Zussman E., Levenberg S. 2012. Regulation of stem cell differentiation by control of retinoic acid gradients in hydrospun 3D scaffold. *Macromol. Biosci.* 12 : 598—607.
- Weber G. F., Bjerke M. A., DeSimone D. W. 2011. Integrins and cadherins join forces to form adhesive networks. *J. Cell Sci.* 124 : 1183—1193.
- Wolfenson H., Lavelin I., Geiger B. 2013. Dynamic regulation of the structure and functions of integrin adhesions. *Develop. Cell.* 24 : 447—458.
- Yang C., Svitkina T. 2011. Filopodia initiation: focus on the Arp2/3 complex and formins. *Cell Adh. Migr.* 5 : 402—408.

Поступила 26 III 2014

MORPHOLOGY OF NCTC CELLS UPON A CONTACT WITH TYPE I COLLAGEN
ADDED TO CULTURE MEDIUM

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

¹ Institute of Cytology RAS, St.Petersburg, and ² Department of Medical Phisics,
St. Petersburg State Polytechnical University,
* e-mail: yupe3ov@mail.ru

The morphometric characteristics of NCTC cells upon their contact with type I collagen added to culture medium were studied. The cells were plated on plastic in the colony form. In a day after seeding, the culture medium was changed for the same medium complemented with 0.1 % type I collagen. And the cells were incubated in this medium for 30 min more. Then the cells were washed out of collagen. Using time-lapse microscopy, the cell state at a colony edge was registered during 7 h. The area, spreading, and polarization of the cells were evaluated. It is shown that the contact with collagen did not affect the cell area, decreased cell spreading and sharply reduced a portion of polarized cells. These results probably demonstrate sensitivity of NCTC cells to the presence of type I collagen in culture medium and suggest that the cell response involves inhibition of long filopodia formation.

Ключевые слова: морфометрия, распространение, клеточная поляризация, ECM, филоподий, цитоскелетон.