

## ОСОБЕННОСТИ РАСПЛАСТЫВАНИЯ КЛЕТОК НСТС КЛОН 929 ПОСЛЕ ПЕРЕСЕВА

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

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

<sup>2</sup>Кафедра медицинской физики С.-Петербургского политехнического университета;

\* электронный адрес: уирезов@mail.ru

Исследовано поведение клеток линии НСТС клон 929 (мышь) непосредственно после пересева (до 1 ч). В работе использовали цайтраферную видеосъемку с последующей обработкой полученных изображений клеток с помощью программы ImageJ. Параметрами, характеризующими состояние клетки, служили площадь ее проекции на подложку и соотношение Rp/Ra, предложенное ранее как коэффициент распластывания (Kuz'minykh, Petrov, 2004). Прикрепляясь к субстрату, клетки имеют вид шара (фаза «шар»), так же как и дочерние клетки после митоза. Однако нами показано, что после прохождения этой фазы пересеянные клетки не переходят непосредственно к обычному распластыванию и миграции по субстрату. Они проходят фазу, во время которой распластываются равномерно во всех направлениях, принимая форму круга (фаза «круг»). Эта фаза отсутствует у распластывающихся после митоза дочерних клеток. Сделано предположение о том, что фаза «круг» — результат адаптации клеток к пересевам при культивировании *in vitro* и необходима им для формирования собственной подложки — внеклеточного матрикса (ВКМ), чтобы облегчить переход к обычному распластыванию и миграции по субстрату.

**Ключевые слова:** адгезия, распластывание, морфометрия клеток, митоз, внеклеточный матрикс (ВКМ).

В последнее десятилетие интерес к стволовым клеткам, несмотря на определенные проблемы использования их в медицине, не снижается (Bobis et al., 2006; Deb, Sarda, 2008; Shi, 2009; Cordeiro-Spinetti et al., 2014). Он поддерживается в основном двумя направлениями: разработка методов заместительной терапии и создание тканеподобных структур (Hwang et al., 2008; Lai et al., 2011; Hosseinkhani et al., 2014). Очевидно, что в обоих случаях существуют свои специфические проблемы. Однако есть и общая проблема, связанная с необходимостью провести выделяемые из организма клетки через культивирование вне организма (Rosler et al., 2004; Stojkovic et al., 2004; Larson et al., 2008; Pawitan, 2014). Так, знание особенностей роста и размножения клеток *in vitro* особенно необходимо при использовании линий стволовых клеток в регенеративной медицине в связи с возможным появлением геномной нестабильности.

Всестороннее изучение морфофункциональных, поведенческих и биохимических особенностей любых культивируемых клеток позволит анализировать эти клетки в сравнении с клетками, входящими в состав макроорганизма. Это необходимо для того, чтобы данные, полученные на модельных экспериментах *in vitro*, корректно экстраполировать на клетки, функционирующие в многоклеточном организме.

Одна из важных отличительных особенностей жизни клеток в культуре — их периодические пересевы. В организме происходит естественный процесс клеточного обновления. На смену погибшим клеткам в результате ми-

тоза приходят новые. Процессы клеточного обновления, как и митоз, естественные, сбалансированы и находятся под влиянием макроорганизма (Fürthauer, González-Gaitán, 2009; Lindqvist et al., 2009; Fuller, 2010). В культуре контролировать численность клеточной популяции приходится искусственно, т. е. клетки периодически пересевают, заменяя отработанную питательную среду на свежую. При этом клетки, имеющие тенденцию к прикреплению и распластыванию на субстрате, заставляют принудительно открепляться от подложки, используя соответствующие агенты (трипсин и ЭДТА). Логично полагать, что такие манипуляции должны приводить к стрессовому состоянию клеток, поскольку в организме подобной ситуации для них не существует. Таким образом, попадая в условия изоляции и культивирования, клетки сталкиваются с факторами, к которым они должны адаптироваться, используя имеющийся у них естественный потенциал возможностей.

Мы исходим из предположения о том, что клетки постоянных линий за бесчисленное множество генераций прошли соответствующий отбор и адаптировались для преодоления стрессового состояния во время пересева. У клеток таких линий процесс адаптации можно считать законченным, т. е. он вышел на плато. Поэтому у них, скорее всего, легче выявить морфофункциональные особенности, которые можно считать результатом адаптации к условиям культивирования *in vitro*. Принимая во внимание эти аргументы, в качестве объекта исследования мы выбрали клетки постоянной линии, в частности

линии NCTC клон 929 (мышь). По-видимому, наиболее важный период, к которому клетки должны были адаптироваться, — это время от первых моментов адгезии к субстрату до начала распластывания. В связи с этим задача настоящей работы состояла в том, чтобы выявить и изучить специфические морфологические изменения клеток данной линии в начальный период (до 1 ч) после их пересева.

## Материал и методика

Объектом служила постоянная клеточная линия NCTC клон 929 (мышь; далее клетки NCTC), полученная 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 % сыроватки плодов коров (Gibco, США) и 40 мкг/мл гентамицина. Культуры клеток выращивали в инкубаторе в атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub> при 37 °C. Перед тем как клетки брали в опыт, их отделяли от подложки 0.25%-ным раствором трипсин—ЭДТА (Gibco, США) и пересевали в новую чашку Петри. В течение 15 мин клеткам давали возможность прикрепиться. Неприкрепившиеся клетки (погибшие, метафазные, плохо прикрепившиеся) удаляли вместе со средой, после чего добавляли свежую питательную среду. Затем эту чашку с клетками помещали на столик микроскопа AxioObserver.Z1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Германия), оборудованного устройствами для долговременного приживленного наблюдения за клетками (поддержание температуры, влажности и CO<sub>2</sub>). Регистрацию изображений проводили в течение 2–3 ч в режиме цайтраферной видеосъемки с различными интервалами времени между кадрами (0.5, 1 и 5 мин) в зависимости от задач конкретного опыта. Использовали объектив Plan-Neofluar ×20/0.4 и цифровую камеру Axio-Cam 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).

Для количественного анализа использовали отдельные изображения, записанные в формате JPEG. Их обработку проводили с помощью программ ImageJ 1.48v (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, США, <http://imagej.nih.gov/ij/>), Excel 2013 (MS Corporation, США) и Origin 6.1 (OriginLab Corporation, США). Параметры, используемые для анализа

клеток: площадь проекции клетки на подложку (площадь клетки) и коэффициент распластывания Rp/Ra (соотношение двух радиусов). Rp вычисляли из периметра клетки, приравненного к длине окружности, Ra — из величины площади клетки, принятой за площадь круга (Kuz'minukh, Petrov, 2004). Выборки анализировали с помощью среднего значения, стандартного отклонения, кривых регрессии (используя S-образную зависимость) и коэффициентов линейной корреляции. Поскольку все электронные изображения клеток были выполнены при одном и том же увеличении и разрешении, результаты измерения были оставлены в пикселях.

## Результаты

В первых опытах по распластыванию клеток сразу после пересева мы использовали 5-минутный промежуток между регистрируемыми изображениями. Было обнаружено, что за этот период времени большинство (до 80–100 %) прикрепившихся клеток, равномерно распластываясь во всех направлениях, изменяют свою форму и переходят из состояния шара (фаза «шар») в состояние круга (фаза «круг»). И только после этого они начинают приобретать типичную для клеток NCTC фиброластоподобную форму. Это иллюстрирует фрагмент поля зрения с 4 прикрепившимися клетками, динамика распластывания которых представлена на рис. 1. Несмотря на то что время начала распластывания у клеток различно, видно, что после фазы «шар» следует фаза «круг». И только после прохождения последней клетки становятся полигональными, приобретая индивидуальную форму. Кроме этого, можно отметить, что продолжительность фазы «шар» варьирует, а переход к фазе «круг» практически не превышает 5 мин.

Как известно, клетки имеют форму шара (в проекции круга) не только при адгезии после пересева, но и при входжении в митоз материнской клетки и образовании ее дочерних клеток. Типичную динамику митоза иллюстрируют две материнские клетки, представленные на рис. 2. В данном случае следует обратить внимание на то, что образовавшиеся дочерние клетки из фазы «шар» переходят непосредственно к распластыванию, минуя фазу «круг», характерную для клеток после пересева на новый субстрат.

Несмотря на то что мы наблюдаем резкий переход прикрепившихся к субстрату клеток от состояния «шар» к состоянию «круг» (рис. 1), можно предположить, что даже в течение 5 мин у клетки должны быть переходные формы от одного состояния к другому, например постепенное увеличение радиуса круга. В связи с этим мы со-

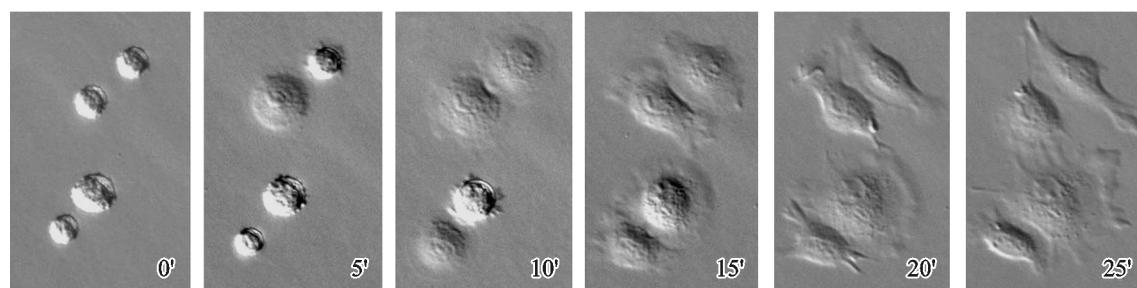


Рис. 1. Динамика изменения формы клеток линии NCTC клон 929 от момента прикрепления до начала приобретения ими типичной фиброластоподобной морфологии. Интервал между изображениями — 5 мин.

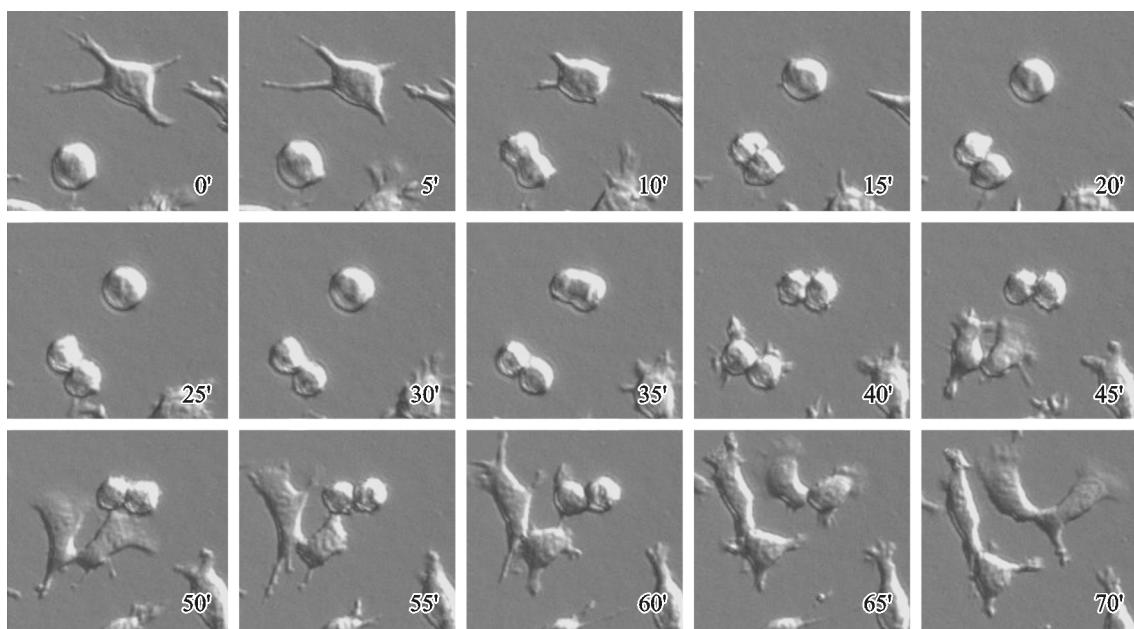


Рис. 2. Динамика распластывания дочерних клеток линии NCTC после деления материнских клеток.  
Интервал между изображениями — 5 мин.

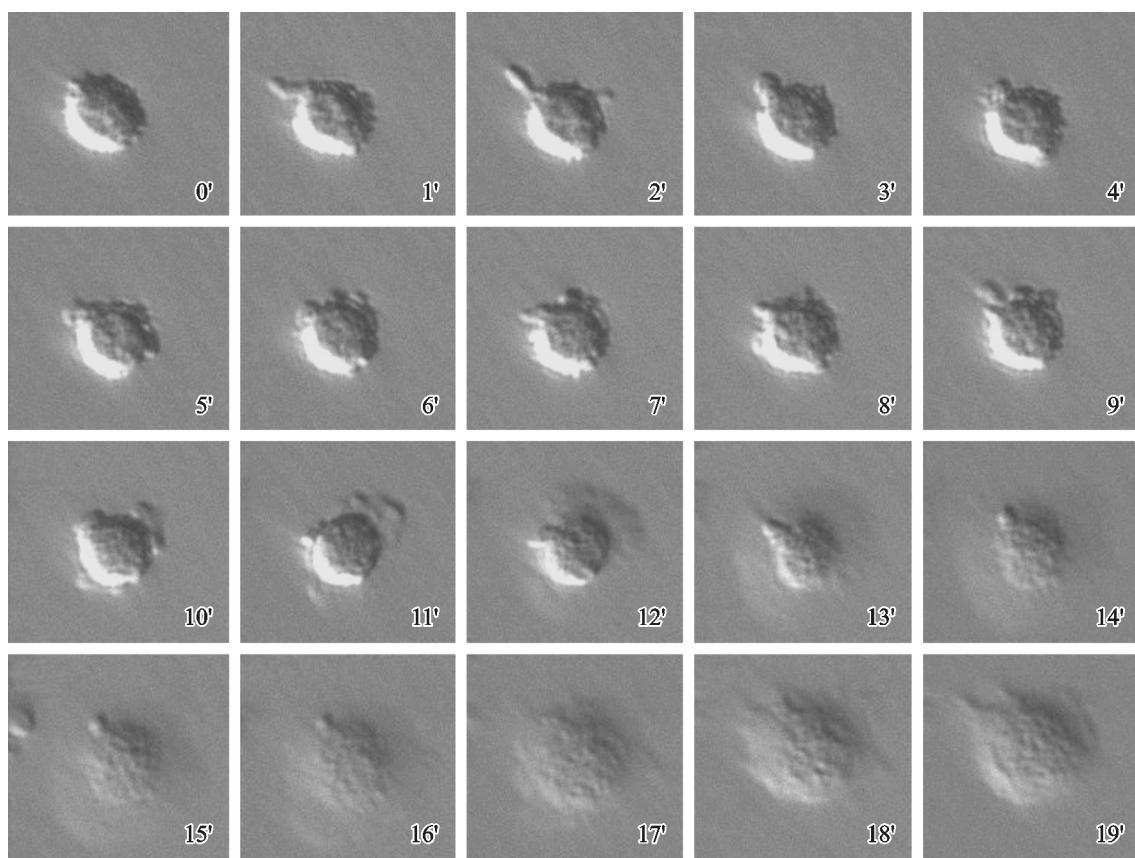


Рис. 3. Динамика изменения формы прикрепившейся клетки с регистрацией ее изображений с периодом в 1 мин.

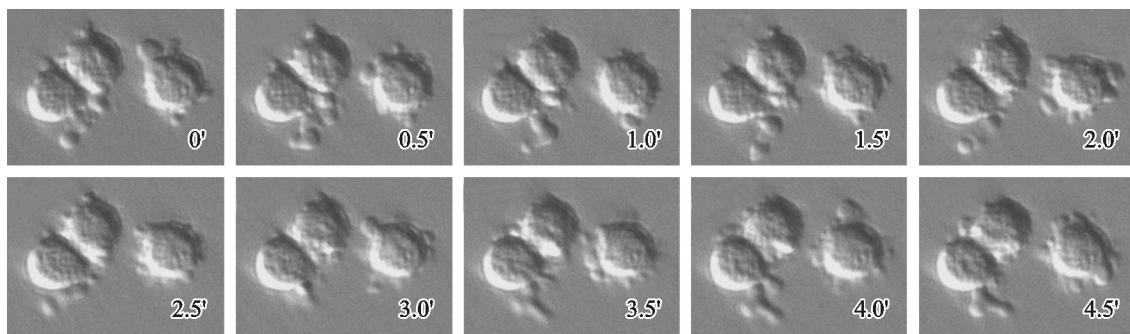


Рис. 4. Флюктуации образования выростов на поверхности прикрепившихся к субстрату клеток NCTC клон 929 в фазе «шар».

кратили промежуток между регистрируемыми изображениями до 1 мин. Типичную картину изменения формы клетки при этих условиях демонстрирует рис. 3. В этом случае можно отметить, что пока клетка имеет форму шара, на ее поверхности образуются некие преходящие выросты (назовем их «предфилоподиями»). Они постепенно замещаются образованиями, морфологически сходными с ламеллоподиями. И только после того, как такие «ламеллоподия» достигают определенного размера, они преобразуются так, что клетка приобретает форму, близкую к правильному кругу (13—14 мин). Далее начинается процесс перехода клеток к обычной фибробластоподобной форме (спустя 15 мин).

При сравнительном анализе клеток на рис. 2 и 3 можно заметить, что у дочерних клеток также происходит образование выростоподобных структур. Однако в отличие от клеток после пересева у дочерних клеток эти структуры являются настоящими предшественниками типичных фило- и ламеллоподий. Для прикрепившихся клеток, имеющих шаровидную форму, за образованием выростов не обязательно следует образование ламеллоподий, а тем более филоподий. Для них процесс образования выростов, скорее, имеет признаки флюктуаций. Это наглядно демонстрирует рис. 4, на котором время регистрации состояния клеток было сокращено до 30 с. Можно отметить не только появление выростов, но и их исчезновение. Такие выросты не имеют никакого отношения к пузырькам

при апоптозе. Клетки с выростами вполне жизнеспособны и позднее распластываются, мигрируют и делятся обычным образом.

Как бы ни были наглядны представленные изображения, они лишь обозначают и иллюстрируют типичные состояния единичных клеток. Доказательство описанных феноменов нуждается в формализации данных, полученных на представительных выборках клеток. Для этого были использованы два параметра. Первый — проекция площади клетки на подложку, или коротко — площадь клетки. Очевидно, что площадь клетки в виде шара в данном случае представляется как площадь круга. Второй параметр, ранее обозначенный нами как коэффициент распластывания ( $R_p/R_a$ ), в настоящей работе используется, скорее, как показатель степени отклонения формы клетки от правильного круга.

Расчетные данные по динамике изменения площади клеток и соответствующих коэффициентов  $R_p/R_a$  представлены на рис. 5. К этим результатам следует дать некоторые пояснения, связанные с техникой усреднения расчетных кривых.

Поскольку были использованы несинхронные клеточные культуры, то, естественно, время входления клеток в митоз было различно. В связи с этим мы использовали способ, который можно назвать «виртуальная синхронизация», поскольку синхронизацию клеток после прохождения митоза выполняли не в эксперименте

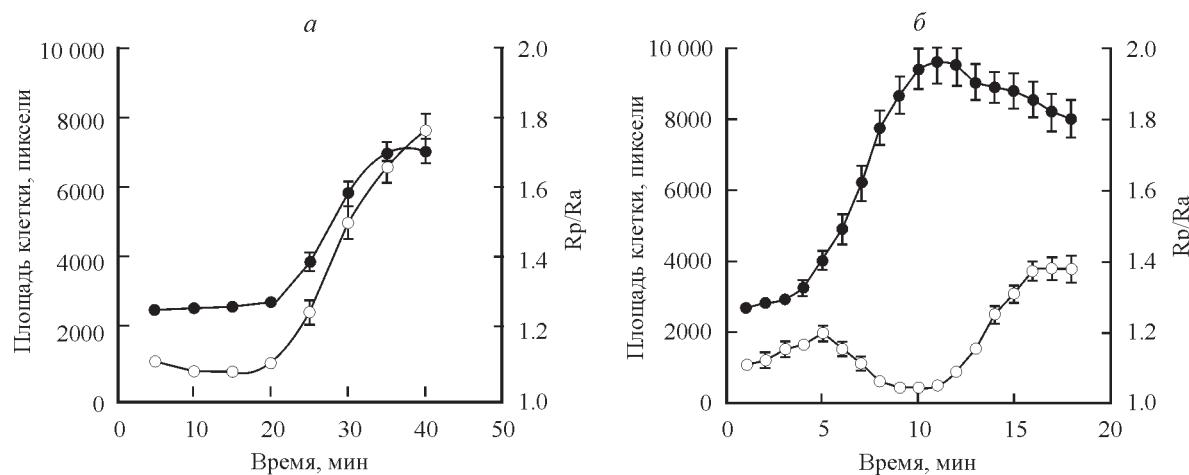


Рис. 5. Сравнение динамики изменения площади (черные кружки) и коэффициента распластывания  $R_p/R_a$  (светлые кружки) дочерних клеток (а) и клеток после пересева (б).

Представлены средние и их ошибки (вертикальные отрезки). Для наглядности кружки соединены линиями (это не линии регрессии). Объяснение в тексте.

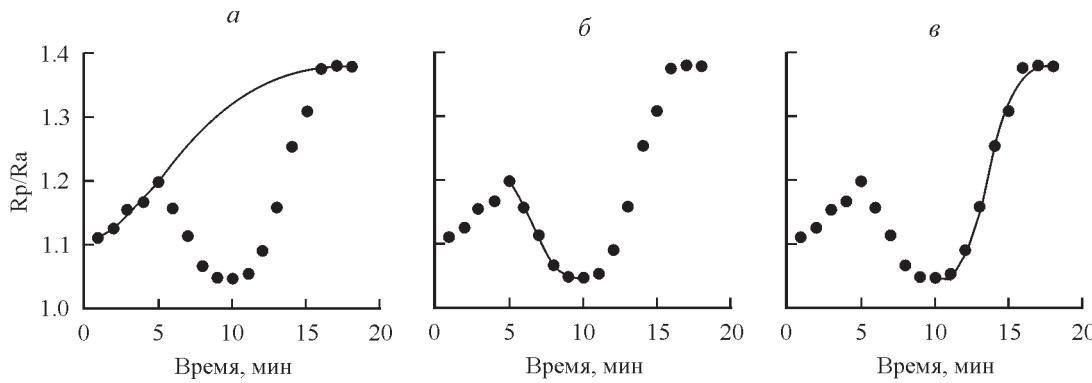


Рис. 6. Подбор кривых регрессии для анализа динамики распластывания клеток NCTC после пересева.

*a* — фаза «шар», 0—5 мин (с учетом точек 16—18 мин); *b* — фаза «круг» (5—10 мин); *c* — переход к обычному распластыванию (10—18 мин). Кружки — экспериментальные значения, сплошные линии — линии регрессии. Коэффициенты линейной корреляции — 0.9998 (*a*), 0.9987 (*b*) и 0.9986 (*c*).

Объяснение в тексте.

(с применением митостатиков), а на компьютере, используя возможности работы с цифровыми изображениями клеток, полученных с помощью видеосъемки. Для этого за нулевую точку отсчета (0 мин) брали момент полного разделения дочерних клеток. Далее, выравнивая экспериментальные значения относительно этой точки, усредняли полученные значения до точки 8 (40 мин) по каждой паре клеток. Всего усреднено 40 экспериментальных кривых соответственно по площади и коэффициенту  $Rp/Ra$  дочерних клеток (рис. 5, *a*).

Очевидно, что клетки после пересева начинали распластываться тоже несинхронно (см. рис. 1). В этом случае зафиксировать точку начала их перехода к распластыванию практически невозможно. Здесь для виртуальной синхронизации мы использовали другой принцип. Поскольку клетки проходят отчетливо регистрируемую фазу «круг», то за нулевую точку, по отношению к которой фиксируются все остальные временные точки, брали среднюю точку прохождения фазы «круг». По каждой отдельной кривой она определяется довольно легко. Эта точка на рис. 5, *b* соответствует 10 мин. Соответственно (назад и вперед) брали остальные точки, поэтому нулевая точка на этом рисунке условна и не означает начала распластывания прикрепившихся к субстрату клеток. Для расчетов в случайном порядке было отобрано 20 клеток. Усредненные значения по динамике изменения их площади и  $Rp/Ra$  представлены на рис. 5, *b*.

Как следует из данных рис. 5, *a*, дочерние клетки приблизительно в течение 20 мин имеют форму шара, поскольку их коэффициент  $Rp/Ra$  близок к 1. Площадь их проекции в это время минимальна. Далее с ростом площади клеток синхронно растет величина их коэффициента  $Rp/Ra$ , указывая на интенсивное распластывание. Наглядно динамику этого процесса можно видеть у клеток, представленных на рис. 2. Это типичное поведение клеток NCTC после завершения ими митоза (Петров и др., 2012).

Процесс распластывания этих же клеток после пересева принципиально отличается от их распластывания после митоза. Тем не менее есть смысл сравнивать оба процесса, поскольку перед началом распластывания клетки морфологически сходны и формально находятся в одной и той же фазе «шар». Об этом свидетельствуют почти равные значения начальных точек на обоих графиках (рис. 5): площадь —  $2370 \pm 52$  и  $2677 \pm 96$  пикселей соответственно у дочерних клеток и клеток после посева (их

площадь немного выше из-за выростов); коэффициент  $Rp/Ra$  —  $1.098 \pm 0.010$  и  $1.109 \pm 0.015$  соответственно.

Приблизительно за 5 мин до начала интенсивного увеличения площади у пересеянных клеток происходит постепенное и синхронное увеличение и площади, и коэффициента  $Rp/Ra$ . Однако эти изменения невелики, поэтому клетки в это время все еще находятся в фазе «шар». Далее наступает резкий переход к интенсивному росту площади клеток и одновременному падению коэффициента  $Rp/Ra$  до значений, близких к 1. Это означает, что клетки, равномерно распластываясь во всех направлениях, переходят в фазу «круг». Она продолжается около 5 мин. После достижения клетками максимальных размеров их площадь начинает уменьшаться, сопровождаясь повышением значений  $Rp/Ra$ . Начинается обычный процесс распластывания.

Таким образом, принципиальное различие перехода тех и других клеток из шарообразного состояния в распластанное связано с тем, что у дочерних клеток в отличие от пересеваемых отсутствует фаза «круг». Несмотря на сложный характер кривой, отражающей динамику изменения коэффициента  $Rp/Ra$  у клеток после пересева (рис. 5, *b*, светлые кружки), мы попытались реконструировать этот процесс с помощью кривых регрессии, используя формулу Больцмана для S-образных кривых из программы Origin 6.1. Данные представлены на рис. 6.

Один и тот же экспериментальный результат (рис. 5, *b*) представлен в виде трех графиков, чтобы нагляднее продемонстрировать три фазы распластывания, через которые проходят клетки после пересева: *a* — фаза «шар», *b* — фаза «круг», *c* — переход к обычному распластыванию клеток. Каждая фаза с очень высокой вероятностью, о чем свидетельствуют соответствующие коэффициенты линейной корреляции, описывается S-образными кривыми, причем переход от первой фазы ко второй очень резкий. Кроме этого, обращает на себя внимание то, что экстраполяция линии регрессии на рис. 6, *a* проходит через общие точки с линией регрессии на рис. 6, *c*, когда клетки начинают свой обычный процесс распластывания.

В заключение приведем данные сравнительного анализа формы клеток, когда их проекция на подложку имеет форму, близкую к форме круга. Предварительно заметим следующее. Обведение контура клетки в программе ImageJ выполнялось нами вручную. Несмотря на то что в этой программе есть возможность автоматического

«оконтуривания» клеток, при работе с реальными изображениями наших клеток эта возможность по разным причинам дает результаты с очень высокой погрешностью. Основной недостаток ручной обработки, если не считать затраченного времени, связан с неточностью обведения контура клетки, что с неизбежностью приводит к некоторому увеличению коэффициента  $Rp/Ra$ . Поскольку мы анализировали клетки, форма которых приближалась к форме правильного круга, необходимо было знать точно, насколько велика погрешность ручного измерения. Для этого были использованы полистироловые шарики (рис. 7), соизмеримые с нашими клетками. Как видно, площадь проекции шарика на подложку — это практически идеальный круг. Следовательно, его коэффициент  $Rp/Ra$  должен быть равен 1. Реальное отклонение от этого математического ожидания можно считать технической погрешностью ручной обработки изображения объектов, близких к форме круга. Расчеты показали, что реальные значения выше ожидаемых на 3 % — среднее значение  $Rp/Ra$  равно  $1.0306 \pm 0.0003$ . Ожидаемое стандартное отклонение должно быть равно 0. Реально оно оказалось равным  $0.0029 \pm 0.0002$ .

Несмотря на эти, казалось бы небольшие, отклонения, их надо принимать во внимание, потому что они могут заметно искажать объективные отклонения реальных объектов, имеющих форму, близкую к кругу. Поэтому представляя данные по измерению коэффициента  $Rp/Ra$  для дочерних клеток, для клеток в фазе «шар» и для клеток в фазе «круг», внесли соответствующую поправку в расчетные данные. Конечный результат показан на рис. 8.

Из данных рис. 8, а следует, что самое незначительное отклонение от правильного круга имеют дочерние клетки до начала их распластывания (0.6 %), немногим больше (1.7 %) оно у клеток в фазе «круг», несмотря на то что площади проекции этих клеток различаются в разы. В то же время при практически равной площади проекции на подложку различие дочерних клеток и клеток в фазе «шар» очень велико (0.6 против 9.8 %). Данные рис. 8, б визуально указывают на подобность значений стандартного отклонения среднему значению  $Rp/Ra$  на рис. 8, а, т. е. обе картинки внешне похожи. Поэтому создается впечатление, что наибольшая дисперсия значений коэффициента  $Rp/Ra$  у клеток после пересева (II), а наименьшая — у дочерних клеток после митоза (I). Одна-

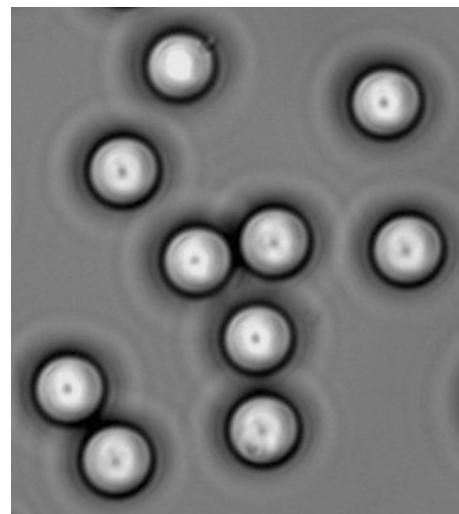


Рис. 7. Вид полистироловых шариков, используемых для оценки погрешности измерения коэффициента  $Rp/Ra$ .

ко в данном случае можно более точно судить о различиях клеток по коэффициенту  $Rp/Ra$ , если рассчитать отношение его среднего значения к соответствующему стандартному отклонению. Тогда получим следующие значения: I — 1.14, II — 1.66, III — 0.81. Поскольку третье значение минимально, правильнее считать, что наиболее однородна по  $Rp/Ra$  группа клеток в фазе «круг» (III).

## Обсуждение

Ранее, изучая особенности распластывания мезенхимных эмбриональных клеток человека на разных субстратах, мы регистрировали их состояние (без использования цейтраферной видеосъемки) в пяти временных точках — от 0.5 до 6 ч после пересева (Petrov et al., 2007; Крылова и др., 2012). Поскольку при таких условиях нет возможности следить во времени за морфологией отдельно взятых клеток, использование способа «виртуальной синхронизации» усреднения экспериментальных значений исключалось. Тем не менее статистический анализ достаточно больших выборок клеток указывал на то, что

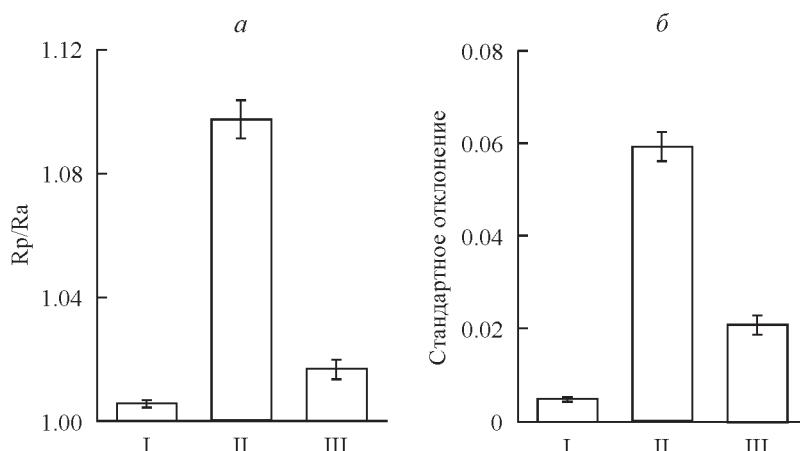


Рис. 8. Сравнение средних значений (а) и их стандартных отклонений (б) коэффициента распластывания  $Rp/Ra$  дочерних клеток (I), клеток в фазе «шар» (II) и клеток в фазе «круг» (III).

Вертикальные отрезки — ошибки средних значений.

обычному распластыванию клеток, по-видимому, предшествует этап, во время которого клетки распластываются в виде круга. Расчеты показывали, что через 30 мин после посева доля таких клеток составляла около 9 %. Эти результаты статистически достоверны, но тем не менее они опосредованы. В настоящей работе получены прямые доказательства (регистрация во времени морфологии отдельно взятых клеток) того, что переходу клеток к фибробластоподобной форме после пересева предшествует фаза «круг».

Мы не обнаружили в литературе работ, в которых авторы указывали бы на описываемый нами феномен предварительного распластывания клеток в форме, близкой к правильному кругу. Тем не менее имеется ряд публикаций с иными исследовательскими задачами, но приводимые в них данные (фотографии и графики) можно рассматривать и интерпретировать как наши. Так, на одном из рисунков авторы (Dubin-Thaler et al., 2004) приводят динамику распластывания иммортализованного фибробласта эмбриона мыши в первые 15 мин после прикрепления к субстрату. Ряд изображений этой клетки демонстрирует сходство изменения ее формы с изменениями клетки NCTC на рис. 3 настоящей работы. Хорошо видно, как из фазы «шар» фибробласт мыши переходит в фазу «круг», хотя авторы и не обратили на это никакого внимания.

В работе по исследованию распластывания эндотелиальных клеток аорты быка (BAECs) приводятся графики изменения во времени площади клеток и соотношения «периметр/площадь» (Reinhart-King et al., 2005). Несмотря на то что последний параметр не совсем адекватен, поскольку периметр изменяется пропорционально радиусу в 1-й степени, а площадь — радиусу во 2-й степени, графики этой работы соответствуют нашим (рис. 5). Их сопоставление показывает, что увеличение площади клеток происходит в соответствии с S-образной зависимостью, достигая плато к 100-й мин, а соотношение «периметр/площадь» сначала уменьшается, а затем, приблизительно с 50-й мин, начинает возрастать. Несмотря на то что здесь есть временные отличия от наших данных (см. рис. 6), динамика процесса распластывания клеток одна и та же в обоих случаях. Это означает, что клетки аорты тоже проходят фазу «круг».

В некоторых работах есть рисунки с изображениями различных клеток, отражающих динамику их распластывания, на которых также можно заметить описываемую нами фазу «круг» (Mooney et al., 1995; Grzesik et al., 1998; Boulter et al., 2006; Xia et al., 2008).

Получение даже единичных, но совпадающих результатов, выполненных в разное время, на разных типах и линиях клеток, на различных субстратах и разными авторами, позволяет сделать следующее, по-видимому вполне вероятное, предположение. Если клетки, помещенные в условия *in vitro*, способны прикрепляться к какому-либо субстрату (фаза «шар»), то высока вероятность того, что распластывающиеся они начнут после прохождения фазы «круг». К этому можно добавить, что наибольшую долю клеток, способных последовательно проходить обе фазы, скорее всего, имеют клетки постоянных линий, например таких, как линия NCTC клон 929. Разумеется, это предположение нуждается в дополнительном подтверждении с привлечением исчерпывающего экспериментального материала, выполненного на различных типах и линиях клеток.

Если описанный феномен считать общебиологическим, то ответ на вопрос о том, почему при переводе кле-

ток в условия *in vitro* у них появляется фаза «круг», должен разрабатываться по крайней мере по двум направлениям. Во-первых, надо понять, почему такая форма становится обязательной для большинства клеток постоянной линии (до 80—100 % у клеток линии NCTC). Во-вторых, какие внутриклеточные механизмы приводят клетки в такое состояние. В этой связи можно сделать несколько весьма общих спекуляций.

Как следует из представленных в настоящей работе данных, процесс перехода клеток из фазы «шар» в фазу «круг» очень резкий. Следовательно, здесь должен быть задействован очень простой и быстродействующий механизм. По-видимому, не должно быть сомнений, что в пересеваемых на новый субстрат клетках, как и в дочерних после митоза, отсутствуют упорядоченные структуры цитоскелета, наблюдаемые у распластанных клеток. После митоза до начала распластывания дочерние клетки NCTC находятся в шарообразном состоянии около 15—20 мин (рис. 5, а). За это время, надо полагать, идут процессы подготовки и синхронизации механизмов построения цитоскелетных структур, естественным образом демонтированных при вступлении материнской клетки в митоз. Исчезновение таких структур у клеток при пересеве вряд ли можно назвать естественным, поскольку клетки насищенно открепляются от субстрата, что может приводить лишь к хаотическому разрушению их цитоскелетных структур.

Отметим еще один важный факт. Продолжительность митоза — величина относительно постоянная. Именно поэтому, беря за точку отсчета момент образования отдельных дочерних клеток, можно способом «виртуальной синхронизации» довольно точно определить начало перехода этих клеток к распластыванию (см. рис. 5, а). После пересева время пребывания клеток NCTC в виде шара варьирует приблизительно от 0 до 30 мин (проверено на предварительном этапе настоящей работы). По этой причине для «виртуальной синхронизации» клеток после пересева использовали в качестве нулевой точки среднее время нахождения клеток в фазе «круг» (рис. 5, б). Если считать, что у всех пересеваемых клеток дезорганизация цитоскелета идет хаотично, а не по какой-то определенной программе, как у вступающих в митоз клеток, то и вариантов таких состояний может быть бесконечно много. От их качества и количества, по-видимому, будет зависеть время подготовки клеток к переходу в фазу «круг». В этой фазе форма клетки наиболее близка к правильному кругу. Это может указывать на отсутствие цитоскелетных структур, типичных, например, для филодий, но не исключает образования циркулярных (по краю) цитоскелетных образований, активно и специфически участвующих в клеточном распластывании в фазе «круг».

Несмотря на то что в фазе «круг» могут быть задействованы механизмы, формирующие цитоскелет, представляется реальным и другой механизм, связанный с плазматической мембраной. Либо происходит резкое изменение ее упругости, что, по-видимому, менее вероятно, либо резко падает внутриклеточное давление, что кажется более вероятным. В первом случае необходимы какие-то структурные перестройки, изменяющие физические параметры плазматической мембранны. Во втором — достаточно открытия определенных (водных или ионных) каналов, чтобы сделать прямой или опосредованный сброс жидкости из клетки во внешнюю среду. Последний вариант, возможно, наиболее адекватен для резкого перехода

клетки из фазы «шар» в фазу «круг». Тем не менее это лишь предположение, требующее основательного экспериментального подтверждения.

Ответить на вопрос о том, почему фаза «круг» (как фенотип) поддерживается отбором при адаптации клеток к условиям культивирования *in vitro*, вероятно, еще труднее, поскольку теории эволюции клеток в культуре пока не существует. Поэтому любые спекуляции в этом плане как излишни, так и вполне допустимы. Нам кажется, что заслуживает внимание следующее предположение. Клетка переходит в фазу «круг» для того, чтобы, нарабатывая свой собственный ВКМ, создать оптимальную подложку для дальнейшего распластывания и миграции. Какие факты могут говорить в пользу этого предположения?

Формально при минимальном периметре наибольшей площадью обладает круг. Если внимательно проанализировать данные рис. 5, б, можно заметить, что наибольшей площадью клетки обладают тогда, когда их форма все еще близка к кругу. С ростом коэффициента Rp/Ra, т. е. с началом обычного распластывания, площадь клетки начинает уменьшаться. При этом клетки еще не приступают к миграции, а остаются на месте, что можно видеть даже на рис. 1. Это означает, что с началом распластывания они находятся в пределах того же локуса, который клетка занимала в фазе «круг».

Упоминавшиеся выше наши данные, полученные ранее на мезенхимных клетках, культивируемых на различных подложках, показали, что матрикс определяет не столько форму распластанной клетки, сколько время перехода от округлой распластанной формы к типичной фибробластоподобной. В частности, было установлено, что процесс распластывания мезенхимных клеток начинается раньше, если их сеять не на пластик, а на матригель (Petrov et al., 2007; Крылова и др., 2012).

Клетки при входжении в митоз не меняют своего местоположения. Надо полагать, что при этом внеклеточный матрикс, до того наработанный распластанной материнской клеткой, остается на том же месте и не исчезает. Следовательно, после деления дочерние клетки начинают распластываться по уже готовому матриксу. В отличие от них клетки после пересева прикрепляются к подложке без матрикса.

В сумме эти факты, кажется, достаточно убедительно обосновывают идею о том, что фаза «круг» наиболее предпочтительна для начала распластывания пересеянных на новый субстрат клеток.

Если придерживаться концепции, объясняющей фазу «круг» пересеваемых клеток необходимостью синтеза собственного внеклеточного матрикса на максимально возможной площади для инициации последующего распластывания и миграции данной клетки, то преходящее появление выростов на ее поверхности в фазе «шар» (см. рис. 3, 4) можно объяснить следующим. Эти выросты, по-видимому, являются попыткой клетки образовать филоподии, чтобы, за jakiкаясь ими за подложку, начать распластывание и миграцию. После митоза такой процесс естествен для дочерних клеток (см. рис. 2). В обоих случаях образуемые выросты морфологически сходны, однако у дочерних клеток они постепенно трансформируются в филоподии и ламелоподии, а у пересеянных клеток в фазе «шар» они из-за невозможности за jakiкиания исчезают. Поэтому такие выросты можно считать предфилоподиями или псевдофилоподиями.

Процесс образования таких предфилоподий очень интенсивен и происходит, по-видимому, у всех клеток

NCTC после их пересева. Об этом свидетельствует их гораздо более высокий коэффициент Rp/Ra по сравнению с дочерними клетками (рис. 8, а). Высокую дисперсию этого показателя (рис. 8, б) можно рассматривать как следствие вариабельности размеров предфилоподий при относительно одной и той же форме шара клетки в целом. Можно предположить, что после серии неудачных попыток за jakiкиания с помощью предфилоподий в какой-то момент времени (определенный для каждой клетки) происходит резкий переход к фазе «круг». Пройдя последнюю, клетка возвращается к своему обычному процессу распластывания, о чем свидетельствуют данные, приведенные на рис. 6.

Подводя итог, можно сделать следующий вывод. Адаптация клеток к режиму пересева, обязательного при их культивировании, приводит к появлению промежуточной фазы распластывания, отсутствующей у клеток после их митотического деления. Эта фаза, названная нами фазой «круг», по-видимому, необходима клетке для предварительной наработки собственного внеклеточного матрикса, чтобы более комфортно начать миграцию по субстрату.

Работа выполнена при частичной поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00068) и ФАНО России.

### Список литературы

- Крылова Т. А., Кухарева Л. А., Петров Ю. П. 2012. Два состояния распластывания мезенхимных клеток эмбриона человека *in vitro*. Цитология. 54 (2) : 112—118. (Krylova T. A., Kukhareva L. V., Petrov Yu. P. 2012. Two spreading states of mesenchymal cells of the human embryo *in vitro*. Tsitologiya. 54 (2) : 112—118.)
- Петров Ю. П., Негуляев Ю. А., Цупкина Н. В. 2012. Динамика распластывания клеток линии L-929 после митоза. Цитология. 54 (4) : 307—312. (Petrov Yu. P., Negulyaev Yu. A., Tsupkina N. V. 2012. Dynamics of spreading of cells of L-929 line after the mitosis. Tsitologiya. 54 (4) : 307—312.)
- Bobis S., Jarocha D., Majka M. 2006. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. Folia Histochem. Cytophiol. 44 : 215—230.
- Boulter E., Grall D., Cagnol S., Obberghen-Schilling E. V. 2006. Regulation of cell-matrix adhesion dynamics and Rac-1 by integrin linked kinase. FASEB J. 20 : E640—E651.
- Cordeiro-Spinetti E., de Mello W., Trindade L. S., Taub D. D., Taichman R. S., Balduino A. 2014. Human bone marrow mesenchymal progenitors: perspectives on an optimized *in vitro* manipulation. Front. Cell Develop. Biol. 2 : 1—7.
- Deb K. D., Sarda K. 2008. Human embryonic stem cells: pre-clinical perspectives. J. Translat. Med. 6 : 1—8.
- Dubin-Thaler B. J., Giannone G., Dobereiner 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.
- Fuller B. G. 2010. Self-organization of intracellular gradients during mitosis. Cell Division. 5 : 2—21.
- Fürthauer M., González-Gaitán M. 2009. Endocytosis and mitosis. A two-way relationship. Cell Cycle. 8 : 3311—3318.
- Grzesik W. J., Ivanov B., Robey F. A., Southerland J., Yamuchi M. 1998. Synthetic integrin-binding peptides promote adhesion and proliferation of human periodontal ligament cells *in vitro*. J. Dent. Res. 77 : 1606—1612.
- Hosseinkhani M., Mehrabani D., Karimfar M. H., Bakhitiary S., Manafi A., Shirazi R. 2014. Tissue engineered scaffolds in regenerative medicine. World J. Plast. Surg. 3 : 3—7.
- Hwang N. S., Varghese S., Elisseiff J. 2008. Controlled differentiation of stem cells. Adv. Drug Deliv. Rev. 60 : 199—214.

- 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.
- Lai M. I., Wendy-Yeo W. Y., Ramasamy R., Nordin N., Rosli R., Veerakumarasivam A., Abdullah S. 2011. Advancements in reprogramming strategies for the generation of induced pluripotent stem cells. *J. Assist. Reprod. Genet.* 28 : 291—301.
- Larson B. L., Ylostalo J., Prockop D. J. 2008. Human multipotent stromal cells undergo sharp transition from division to development in culture. *Stem Cells.* 26 : 193—201.
- Lindqvist A., Rodriguez-Bravo V., Medema R. H. 2009. The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *J. Cell Biol.* 185 : 193—202.
- Mooney D., 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.
- Pawitan J. A. 2014. Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine. *Biomed. Res. Int.* 2014 : 1—14.
- 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.
- Reinhart-King C. A., Dembo M., Hammer D. A. 2005. The dynamics and mechanics of endothelial cell spreading. *Biophys. J.* 89 : 676—689.
- Rosler E. S., Fisk G. J., Ares X., Irving J., Miura T., Rao M. S., Carpenter M. K. 2004. Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Develop. Dynamics.* 229 : 259—274.
- Shi Y. 2009. Induced pluripotent stem cells, new tools for drug discovery and new hope for stem cell therapies. *Curr. Mol. Pharmacol.* 2 : 15—18.
- Stojkovic M., Lako M., Strachan T., Murdoch A. 2004. Derivation, growth and applications of human embryonic stem cells. *Reproduction.* 128 : 259—267.
- Xia N., Thodeti Ch. K., Hunt T. P., Xu Q., Ho M., Whitesides G. M., Westervelt R., Ingber D. E. 2008. Directional control of cell motility through focal adhesion positioning and spatial control of Rac activation. *FASEB J.* 22 : 1649—1659.

Поступила 6 III 2015

#### SPREADING OF NCTC CLON 929 CELLS AFTER RESEEDING

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

<sup>1</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, and

<sup>2</sup> Department of Medical Physics, St. Petersburg State Polytechnical University;

\* e-mail: yupe3ov@mail.ru

The period (1 h after reseeding) of behaviour of mouse NCTC clone 929 cells to the conditions of artificial cultivation was studied. The time-lapse imaging followed the processing of the cells with ImageJ program was applied. To characterize the parameters cell status we used the cell area (projection of the cell on substrate) and Rp/Ra ratio introduced earlier as a spreading coefficient (Kuz'minykh, Petrov, 2004). After attaching a substratum, cells have a form of sphere (the phase «sphere») as the daughter cells after a mitosis. We revealed however that after this phase the reseeded cells do not start usual spreading and migration along substratum. They pass a phase of equally spreading in all directions and shaping their area as a circle (phase «circle»). This phase is absent of the daughter cells spreading after mitosis. We assume that the phase «circle» is a result of adaptation of the cells to reseedings at artificial cultivation. It is necessary for formation of a substrate composed of own extracellular matrix components (ECM) of the cells. Own ECM facilitates transition of the cells to their usual spreading and migration along substratum.

**Key words:** adhesion, spreading, cell morphometry, mitosis, ECM, filopodium.