

## МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОК ЛИНИИ NCTC КЛОН 929 ЧЕРЕЗ 1 СУТ ПОСЛЕ ПЕРЕСЕВА

© Ю. П. Петров,<sup>1</sup> Н. В. Цупкина

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194054;*

<sup>1</sup>электронный адрес: [yure3ov@mail.ru](mailto:yure3ov@mail.ru)

Развитие регенеративной медицины, основанное на использовании стволовых клеток, в значительной степени зависит от прогнозирования степени изменения этих клеток после необходимого во многих случаях культивирования их в искусственных условиях. В этой связи необходимо накопление знаний в области, которую можно обозначить как биология клеток в культуре. Особенности функционирования клеток *in vitro* лучше изучать на клетках постоянных линий, поскольку их морфофункциональные характеристики за время многочисленных пассажей можно рассматривать как результат адаптации клеток к росту вне организма. Задачей настоящей работы является проверка гипотезы о существовании связи между плотностью культуры (до начала образования монослоя) и морфометрическими параметрами клеток. Были исследованы фибробластоподобные клетки мыши NCTC клон 929 через 1 сут после посева. К этому времени плотность культуры такова, что между клетками практически отсутствуют прямые контакты. Оценивали площадь клеток, коэффициенты распластывания и поляризации. Показано, что в одном и том же культуральном сосуде в местах с большей плотностью клеток их площадь меньше, чем на участках с меньшей плотностью. При этом при увеличении плотности клеток увеличивается их поляризация. Зависимость морфометрических параметров клеток от их плотности может быть результатом дистанционной передачи информации между ними. Анализ полученных данных позволяет предположить, что изменение формы клеток связано с подготовкой к процессам формирования монослоя.

**Ключевые слова:** площадь клетки, распластывание, поляризация, морфометрия клеток.

В настоящее время одним из наиболее быстро развивающихся направлений современной медицины можно считать регенеративную медицину. Основная задача этого направления — создание функционально и морфологически полноценных тканей и органов после их повреждения или утраты в результате различных заболеваний (Yamada, Cukierman, 2007; Salibian et al., 2013). Пока решение этой задачи сводится к получению стволовых клеток с их последующей индуцированной (направленной) дифференцировкой в клетки тех или иных тканей (Hwang et al., 2008; Watt, Driskell, 2010; Brown et al., 2013). Такой подход предполагает культивирование клеток в искусственных условиях. В связи с этим уже недостаточно рассматривать культивирование клеток *in vitro* только как удобную модель для изучения клеток многоклеточного организма. Оно становится важным звеном на пути создания искусственных тканей и органов, поскольку после пребывания в условиях *in vitro* клетки должны вернуться в условия *in vivo*, при этом, что особенно важно, без отрицательных последствий для макроорганизма. Следовательно, возрастает необходимость изучения функционирования клеток в культуре, закономерностей их реагирования на условия искусственного культивирования, т. е. изучения биологии клеток в культуре. Накопление знаний в этой области имеет большое значение для понимания сходства и различия биологии клеток в культуре и в составе многоклеточного организма.

Как известно, форма клеток, образующих в культуре монослой, может быть условно разделена на два типа — эпителиоподобную и фибробластоподобную. Основное различие этих типов сводится к следующему. Эпителиоподобные клетки преимущественно малоподвижны и не имеют выраженных филоподий. Фибробластоподобные клетки, напротив, склонны к мобильности и изменению своей формы вследствие относительно быстрого образования (и исчезновения) филоподий. Наблюдая за живыми интактными фибробластоподобными клетками, в частности клетками линии NCTC клон 929, можно заметить, что в культуре с низкой плотностью клеток (до начала образования монослоя) они располагаются на подложке более или менее равномерно, практически не имея прямых контактов между собой. Иными словами, они находятся приблизительно на одном и том же расстоянии друг от друга. Можно предположить, что среднее расстояние между клетками — величина постоянная, которая может быть детерминирована самими клетками, взаимодействующими дистанционно. Данная гипотеза требует экспериментального подтверждения.

Полагая, что форма клетки может быть очень чувствительным индикатором ее функционального состояния, мы использовали морфометрию для количественной оценки реагирования клеток на плотность их расположения на подложке. Наиболее оптимальная плотность клеток для такого исследования достигается через 1 сут после посева — клетки уже адаптировались к культуре, но

еще не начали формировать монослой, т. е. отсутствуют прямые (физические) контакты между клетками. Поскольку при посеве клетки никогда не распределяются по подложке абсолютно равномерно, даже в пределах одного и того же культурального сосуда можно регистрировать и анализировать их число и форму в полях зрения с различной клеточной плотностью. Таким образом, задачей настоящей работы являлась проверка предположения о существовании связи между плотностью культуры (до начала образования монослоя) и морфометрическими параметрами клеток.

### Материал и методика

В качестве объекта исследования использовали постоянную линию клеток подкожной соединительной ткани мыши — NCTC клон 929, полученную из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН (Санкт-Петербург).

Клетки культивировали в пластиковых чашках Петри (35 мм; Nunk, Дания) для видеосъемки и во флаконах (25 см<sup>2</sup>; Nunk, Дания) для фотосъемки в ростовой среде, состоящей из среды DMEM (Gibco, США), 10 % сыворотки плодов коров (Gibco, США) и 40 мкг/мл гентамицина. Культуры клеток выращивали в инкубаторе в атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub> при 37 °С. Перед тем как клетки брали в опыт, их отделяли от подложки, инкубируя в течение 1 мин в 0.25%-ном растворе «трипсин-ЭДТА» (Gibco, США), и пересевали в новый культуральный сосуд.

Перед видеосъемкой несинхронизированную популяцию клеток сеяли на новую чашку Петри, забывавля суспензию клеток в разведении 1 : 10. После этого клеткам давали возможность прикрепиться к подложке, выдерживая их в условиях инкубатора в течение 1 ч. Затем 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 CO<sub>2</sub>). Регистрацию изображений проводили в течение 1 сут в режиме цейтраферной съемки с 5-минутным интервалом между кадрами по четырем полям зрения, отобранным произвольно, но с различным числом клеток в поле зрения. 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 (PLAS-DIC). Заданные условия эксперимента поддерживали автоматически с помощью программы AxioVision 4.8.2 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Германия). Для количественного анализа использовали отдельные изображения, записанные в формате JPEG.

Фотосъемку выполняли через 1 сут после посева клеток (также в разведении 1 : 10), а пересев осуществляли через 5—6 сут (до образования плотного монослоя), причем одновременно как в новый флакон, так и в старый. Регистрацию изображения клеток проводили в течение 8 пассажей после разморозки. Цифровые изображения живых интактных клеток получали, используя инвертированный микроскоп Nikon ECL IPSE TS100, объектив 20×, камеру Canon EOS 600D, разрешение 5184 × 3456 пикселей. В каждой из восьми фотосессий для каждого флакона использовали по 10—15 полей зрения, отобранных случайным образом.

Сравнительный анализ клеток и статистическую обработку данных 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); коэффициент расплывания 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'minykh, Petrov, 2004); коэффициент поляризации M/m, рассчитанный как соотношение длинной (M) и короткой (m) осей эллипса (для расчета осей есть соответствующие опции в программе ImageJ). При анализе выборок использовали среднее значение, стандартное отклонение, кривые регрессии (используя линейную или S-образную зависимость) и коэффициенты линейной корреляции (R). Поскольку для решения поставленной задачи не было необходимости анализировать абсолютные размеры клеток, а лишь относительные, результаты измерения приведены в пикселях.

### Результаты

Изменение формы клеток при культивировании *in vitro* зависит от многих причин — как внешних, так и внутренних. Вклад какого-либо фактора, как и степень реакции клетки на него, могут быть незначительными. Чтобы с высокой долей вероятности обнаружить подобные слабые взаимодействия, приводящие к незначительным морфологическим изменениям клеток, которые визуально практически невозможно зафиксировать, очень важно иметь выборки, достаточные для адекватной статистической обработки. Кроме этого, условия эксперимента должны уравнивать «фоновые воздействия» («шум») от других факторов, более мощных, чем исследуемые, во всех сравниваемых группах клеток. В связи с этим, в частности при расчете средних значений морфометрических параметров клеток, из выборок были удалены крупные клетки, представляющие собой, по-видимому, отдельную немногочисленную субпопуляцию, и круглые мелкие клетки, находящиеся на стадии метафазы. Однако их учитывали при определении общего числа клеток в поле зрения. Доля таких клеток в выборках невелика, но они могли вносить значительные искажения («шум») в величины средних значений, в частности площади клеток.

После криоконсервации клеткам обычно необходимо время для адаптации к росту и размножению в искусственных условиях. Не исключено, что в этот период следствием адаптации может быть изменение формы клеток от пассажа к пассажи. Как уже было сказано, при анализе морфологических особенностей клеток в процессе пассирования пересев клеток осуществляли не только в новый флакон, но и в старый. Следует заметить, что при рутинной работе с клеточными культурами использование старых флаконов нежелательно из-за неконтролируемых факторов, влияющих на культивирование клеток (остатки внеклеточного матрикса, живых и погибших клеток, следов использованной питательной среды и т. п.). Поскольку эти факторы неконтролируемые, их можно рассматривать как фон или «шум», в той или иной степени влияю-

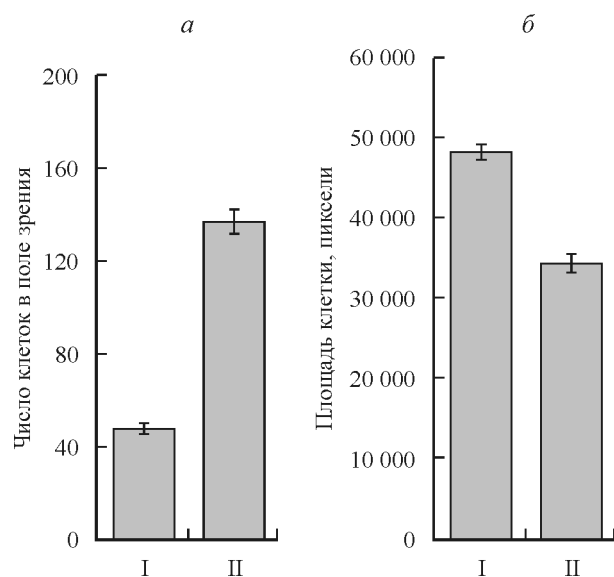


Рис. 1. Среднее число клеток линии NCTC клон 929 в поле зрения (а) и их средняя площадь (б) за весь период наблюдения (8 пассажей).

I — клетки, посеянные в новый флакон, II — клетки, посеянные в старый флакон. Представлены средние значения и их ошибки.

щий на адаптацию клеток к росту *in vitro*. С этих позиций имело смысл проверить степень этого влияния на клеточные параметры, анализируемые в настоящей работе.

Усредненные данные о числе клеток в поле зрения для всех пассажей представлены на рис. 1, а. Число клеток в старом флаконе оказывается больше, чем в новом ( $N_I = 47.8 \pm 2.2$ ,  $N_{II} = 137.2 \pm 5.2$ ,  $p < 0.01$ ). Это, скорее всего, связано с некоторым остаточным количеством клеток в старом флаконе после их пересева. Как следует из

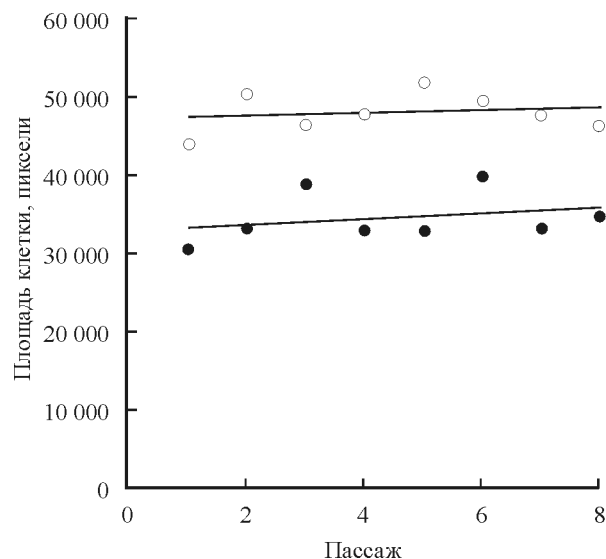


Рис. 2. Динамика изменения площади клеток по мере их пассирования.

Светлые кружки — площадь клеток, посеянных в новые флаконы, темные кружки — площадь клеток, посеянных в старые флаконы. Сплошные линии — соответствующие кривые линейной регрессии. Представлены средние значения и их ошибки по всем полям зрения для клеток данного пассажа (величины ошибок практически не превышают размера кружков).

рис. 1, б, средний размер клеток, пересейанных в старые флаконы, достоверно меньше, чем у клеток в новых флаконах ( $47\,996 \pm 896$  и  $34\,471 \pm 1132$  пикселя соответственно для I и II,  $p < 0.01$ ). Однако этот результат обобщенный и включает в себя не только различия по плотности клеток на единицу площади, но и те, которые связаны с различиями между отдельными флаконами (остатки

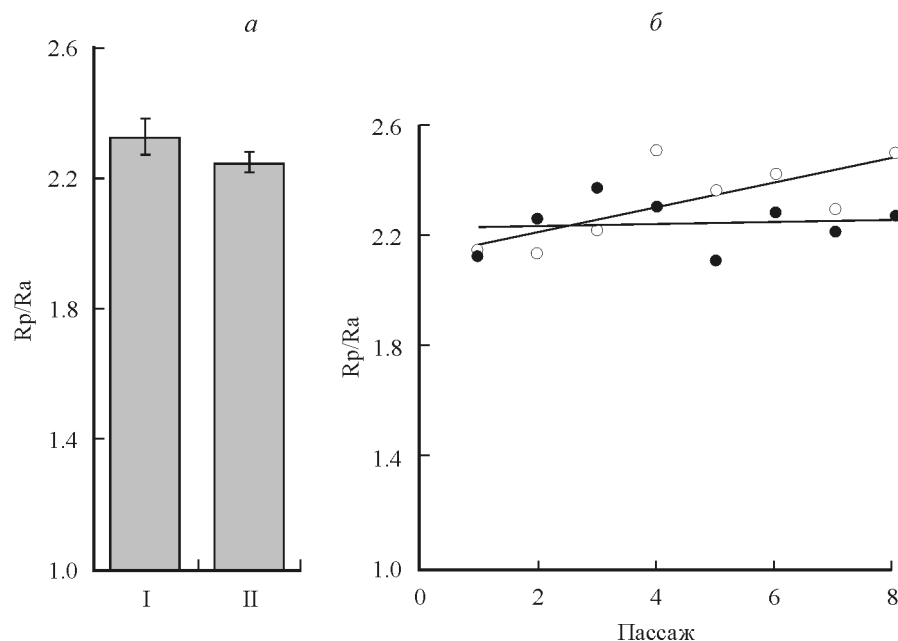


Рис. 3. Сравнение коэффициентов расплывания (Rp/Ra) клеток линии NCTC клон 929 при пассировании.

а — средние значения Rp/Ra клеток всех пассажей, посеянных в новые (I) и старые (II) флаконы; представлены средние значения и их ошибки. б — динамика Rp/Ra при пассировании клеток; представлены средние значения и их ошибки по всем полям зрения для клеток данного пассажа; коэффициенты линейной корреляции:  $R_I = 0.73 \pm 0.16$ ,  $R_{II} = 0.11 \pm 0.35$ . Светлые кружки — Rp/Ra клеток, посеянных в новые флаконы (I), темные кружки — Rp/Ra клеток, посеянных в старые флаконы (II). Сплошные линии — соответствующие кривой линейной регрессии.

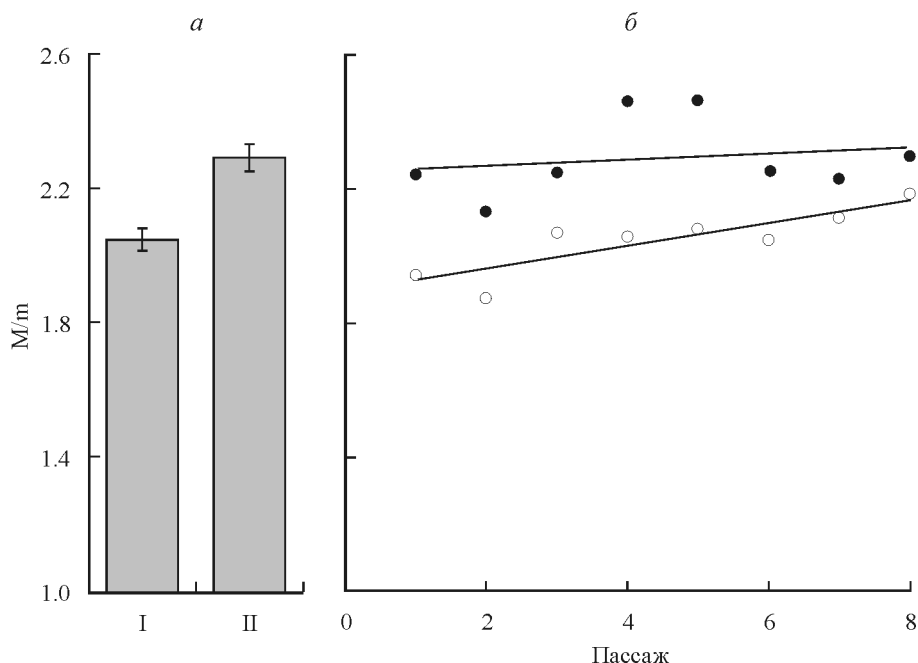


Рис. 4. Сравнение коэффициентов поляризации (M/m) клеток линии NCTC клон 929 при пассировании.

*a* — средние значения M/m клеток всех пассажей, посеянных в новые (I) и старые (II) флаконы; представлены средние значения и их ошибки. *б* — динамика M/m при пассировании клеток; представлены средние значения и их ошибки по всем полям зрения для клеток данного пассажа; коэффициенты линейной корреляции:  $R_1 = 0.85 \pm 0.10$ ,  $R_2 = 0.22 \pm 0.34$ . Светлые кружки — M/m клеток, посеянных в новые флаконы (I), темные кружки — M/m клеток, посеянных в старые флаконы (II). Сплошные линии — соответствующие кривые линейной регрессии.

внеклеточного матрикса, компонентов питательной среды и т. п.). Дифференцировать действие фактора плотности клеток от всех иных факторов («шума») могут данные, представленные на рис. 2.

Очевидно, что различие по площади клеток обеих групп сохраняется в течение всех пассажей. Теоретические кривые линейной регрессии указывают на то, что по

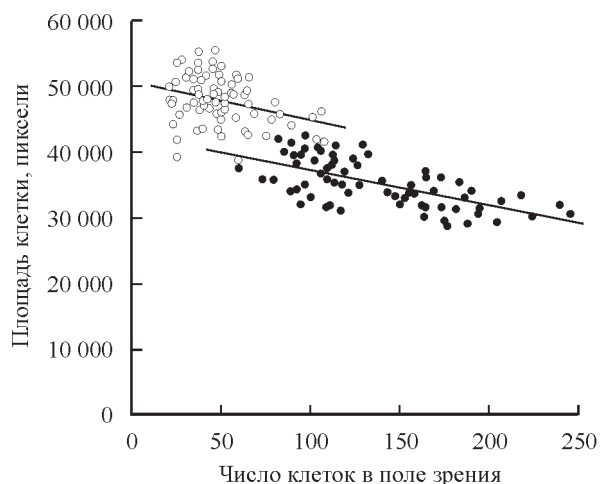


Рис. 5. Зависимость площади клеток линии NCTC клон 929 от их числа в поле зрения.

Коэффициенты  $a$  линейного уравнения ( $y = ax + b$ ) равны  $-59.6 \pm 19.5$  и  $-52.5 \pm 7.7$  для I и II соответственно (различия недостоверны). Коэффициенты  $b$  равны  $50676 \pm 1009$  и  $42377 \pm 1103$  для I и II соответственно (различия достоверны,  $p < 0.01$ ). Коэффициенты линейной корреляции:  $R_1 = -0.33 \pm 0.10$ , ( $p < 0.05$ );  $R_2 = -0.64 \pm 0.07$  ( $p < 0.01$ ). Светлые кружки — площадь клеток в новых флаконах (I), темные кружки — площадь клеток в старых флаконах (II). Каждая точка — среднее значение площади клеток в данном поле зрения. Сплошные линии — кривые линейной регрессии.

мере пассирования площадь клеток незначительно, но устойчиво возрастает в обоих случаях. Однако, несмотря на положительные коэффициенты линейной корреляции ( $R_1 = 0.19$ ,  $R_2 = 0.29$ ), этот результат может быть рассмотрен лишь как тенденция (формально оба коэффициента  $R$  достоверно не отличаются от 0).

Усреднение значений коэффициента распластывания ( $R_p/R_a$ ) по всем клеткам обеих выборок показывает, что достоверных различий между группами I и II нет (рис. 3, *a*). Сравнение клеток по данному коэффициенту на разных пассажах показано на рис. 3, *б*. Из него понятно, почему средние значения в обеих группах приблизительно одни и те же — все экспериментальные точки (темные и светлые кружки) лежат кучно. Тем не менее при расчете теоретических кривых (используя линейную регрессию) можно видеть, что коэффициент распластывания клеток по мере пассирования достоверно растет у клеток, посеянных в новые флаконы ( $R_1 = 0.73 \pm 0.16$ ,  $p < 0.01$ ).

Коэффициент распластывания очень чувствителен к числу и длине клеточных филоподий. Он растет не только при увеличении периметра клетки за счет многочисленных филоподий, но и при поляризации клетки. Чтобы отделить поляризованные (вытянутые) клетки, лучше использовать коэффициент поляризации M/m (Петров, Цупкина, 2012). Такие данные представлены на рис. 4. По среднему значению коэффициента M/m клетки обеих групп достоверно различны ( $p < 0.01$ ), причем клетки в старых флаконах более поляризованы (рис. 4, *a*). Динамика изменения M/m от пассажа к пассажию в целом повторяет динамику коэффициента  $R_p/R_a$ . Рост значений достоверно растет для клеток в новых флаконах, и взаимосвязь поляризации клеток с ростом порядкового номера пассажа очень тесная ( $R_1 = 0.85 \pm 0.10$ ,  $p < 0.01$ ).

Представленные выше данные касались динамики морфологических особенностей клеток в зависимости от

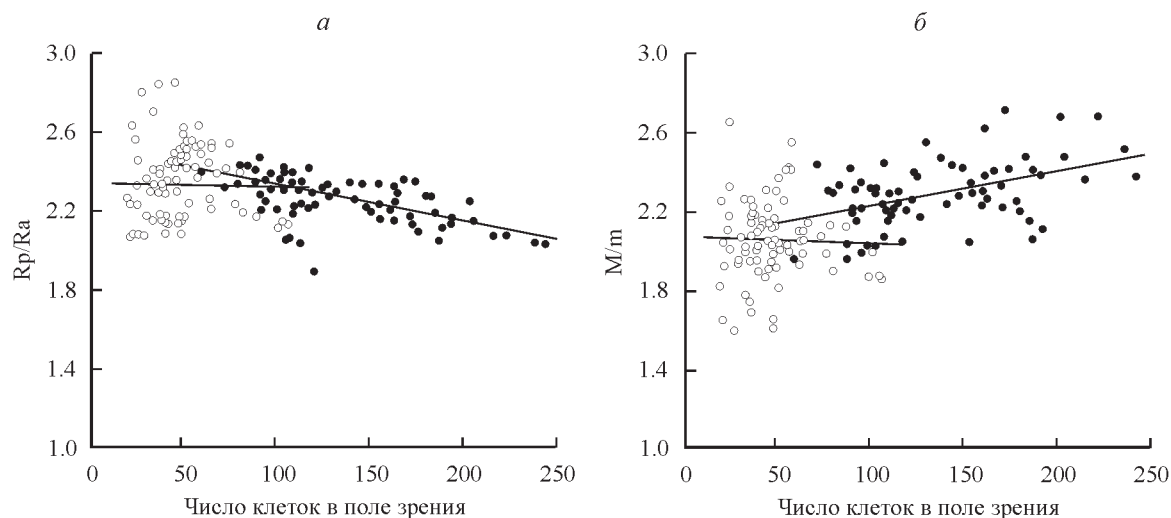


Рис. 6. Зависимость коэффициентов распластывания (а) и поляризации (б) от плотности линии NCTC клон 929 на подложке. Светлые кружки — данные для клеток в новом флаконе, темные кружки — в старом флаконе. Сплошные линии — расчетные кривые линейной регрессии. Объяснения см. в тексте.

пассажа. Данные по этим же клеткам можно сгруппировать по-другому — по их количеству в поле зрения независимо от пассажа. Суммарно таких полей зрения для клеток в новых флаконах было 79 (рис. 5).

Данные, представленные на рис. 5, показывают, что площадь данной клетки зависит от плотности окружающих ее клеток. С ростом числа клеток на единицу поверхности культурального сосуда их площадь уменьшается (отрицательная корреляция). Несмотря на разброс значений, что является одной из причин (влияние «шума») снижения коэффициентов корреляции, они в обоих случаях достоверно отличаются от 0 ( $R_I = -0.33 \pm 0.10$ ,  $R_{II} = -0.64 \pm 0.07$ ). Можно отметить, что скорость уменьшения площади клеток не зависит от типа флакона (старый или новый). Об этом говорит равенство

коэффициентов  $a$  в линейных уравнениях ( $y = ax + b$ ) каждой из групп. Поскольку коэффициент  $a$  находится при  $x$ , именно он, а не  $b$  определяет степень зависимости площади клеток от их числа в исследуемой выборке. Достоверное различие коэффициентов  $b$  ( $p < 0.01$ ) указывает лишь на различные условия культивирования, т. е. он в первую очередь связан с различием флаконов, но не с клетками.

Данные по коэффициентам распластывания и поляризации не так однозначны. Они представлены на рис. 6. В целом можно отметить, что говорить о какой-либо тенденции в изменении обоих коэффициентов для клеток, пересеваемых в новые флаконы, не имеет смысла. Корреляция отсутствует (в обоих случаях коэффициенты линейной корреляции достоверно не отличаются от 0). Кро-

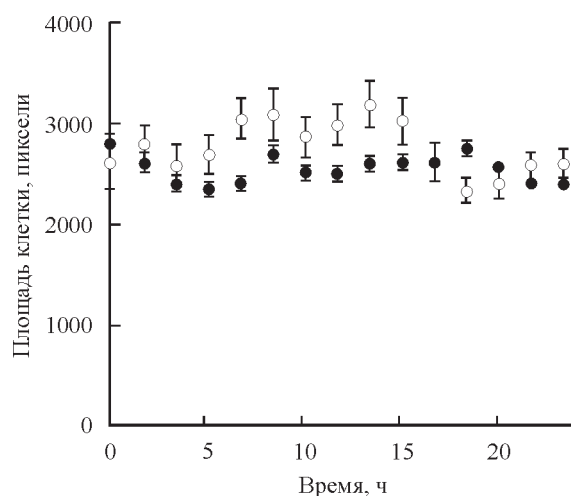


Рис. 7. Сравнение динамики площади клеток линии NCTC клон 929 в группах с разной плотностью в пределах одного и того же культурального сосуда.

Светлые кружки — площадь клеток при их редком расположении относительно друг друга (группа 1\_4), темные кружки — то же для клеток с большей плотностью (группа 2\_3). Представлены средние значения и их ошибки.

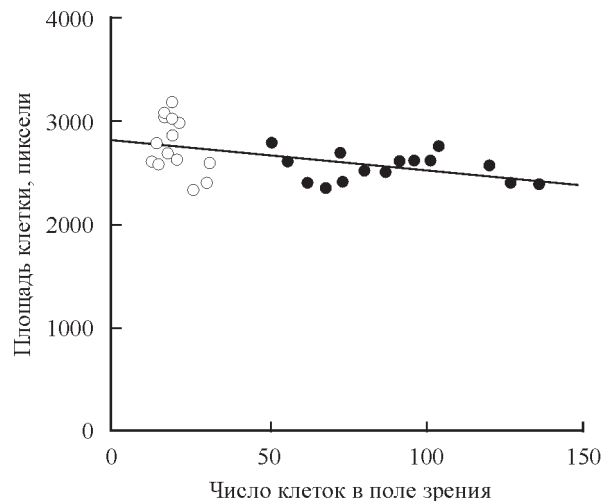


Рис. 8. Связь площади клеток линии NCTC клон 929 с их количеством в поле зрения при видеосъемке. Коэффициент линейной корреляции  $R = -0.49 \pm 0.14$  ( $p < 0.01$ ).

Светлые кружки — площадь клеток при их редком расположении относительно друг друга (группа 1\_4), темные кружки — то же для клеток с большей плотностью (группа 2\_3). Сплошная линия — кривая линейной регрессии, рассчитанная при учете данных площади клеток в обеих группах.

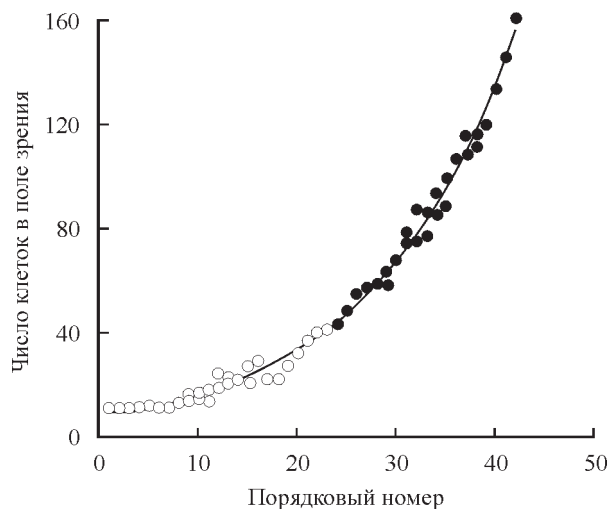


Рис. 9. Реконструкция ранжирования по возрастанию числа клеток линии NCTC клон 929 в полях зрения при видеосъемке.

Светлые кружки — число клеток при их редком расположении относительно друг друга (значения клеток групп 1 и 4 взяты по отдельности), темные кружки — то же для клеток с большей плотностью (значения клеток групп 2 и 3 взяты по отдельности). Сплошная линия — кривая регрессии, рассчитанная с использованием уравнения S-образной кривой при учете всех клеток. Коэффициент линейной корреляции  $R = 0.996 \pm 0.01$  ( $p < 0.1$ ). Объяснения см. в тексте.

ме того, заметна высокая дисперсия. В старых флаконах, где плотность клеток выше, практически при той же дисперсии можно отметить отчетливую, но разнонаправленную корреляцию обоих коэффициентов ( $R_p/R_a$  и  $M/m$ ) в зависимости от плотности клеток. Для коэффициента распластывания корреляция отрицательная с  $R_1 = -0.74 \pm 0.05$ ,  $p < 0.01$ , для коэффициента поляризации, напротив, положительная с  $R_{II} = +0.45 \pm 0.10$  ( $p < 0.01$ ).

Несмотря на то что в среднем число клеток в поле зрения в старых флаконах выше, нельзя однозначно утверждать, что оно влияет на уменьшение размера клеток. Сами флаконы по условиям эксперимента различны для роста клеток. Чтобы исключить этот фактор, была

выполнена видеосъемка клеток в одном и том же культуральном (новом) сосуде. Съемку вели в двух полях зрения с редким расположением клеток и в двух полях с большей плотностью клеток. Данные были соответственно объединены в две группы (первая обозначена как 1\_4, вторая как 2\_3). Регистрацию клеточных параметров вели в течение 1 сут. Для анализа были отобраны изображения клеток в одних и тех же полях зрения с периодичностью в 50 мин.

При поверхностном анализе данных, представленных на рис. 7, создается впечатление, что здесь нет как различий между группами, так и изменений площади клеток во времени — в обоих случаях коэффициент линейной корреляции достоверно не отличается от 0. Однако можно выделить период времени, когда различия средних значений между группами имеют достоверные различия. В связи с этим представляется разумным разделить все время наблюдения на три периода: 1) 0—3.5 ч (первые 3 точки), 2) 5—15 ч (с 4-й по 10-ю точку); 3) 17—24 ч (с 11-й по 15-ю точку) — и рассчитать средние значения для этих периодов. Получаем следующие значения соответственно для групп 1\_4 и 2\_3: 1)  $2665 \pm 29$  и  $2606 \pm 51$  (нет различий), 2)  $2985 \pm 41$  и  $2531 \pm 31$  (различия достоверны,  $p < 0.01$ ), 3)  $2513 \pm 33$  и  $2551 \pm 39$  (различий нет). Кроме того, в группе 1\_4 достоверные различия есть между средним значением площади клеток 1-го и 3-го периодов. Последнее означает, что при небольшой плотности клеток на подложке есть тенденция к уменьшению их площади в процессе культивирования.

По условиям данного эксперимента число клеток в каждом поле зрения со временем должно увеличиваться в связи с их делением. Это позволяет проверить наличие корреляции между площадью клеток и их количеством в поле зрения. Соответствующие данные представлены на рис. 8. Достоверного уменьшения площади клеток при увеличении их количества в каждой из групп нет. Однако и те и другие клетки находятся в условиях одного и того же флакона, поэтому их можно объединить. Тогда отчетливо проявляется связь между величиной площади клеток и числом их в поле зрения. О достоверности этого факта говорит коэффициент корреляции. Несмотря на то

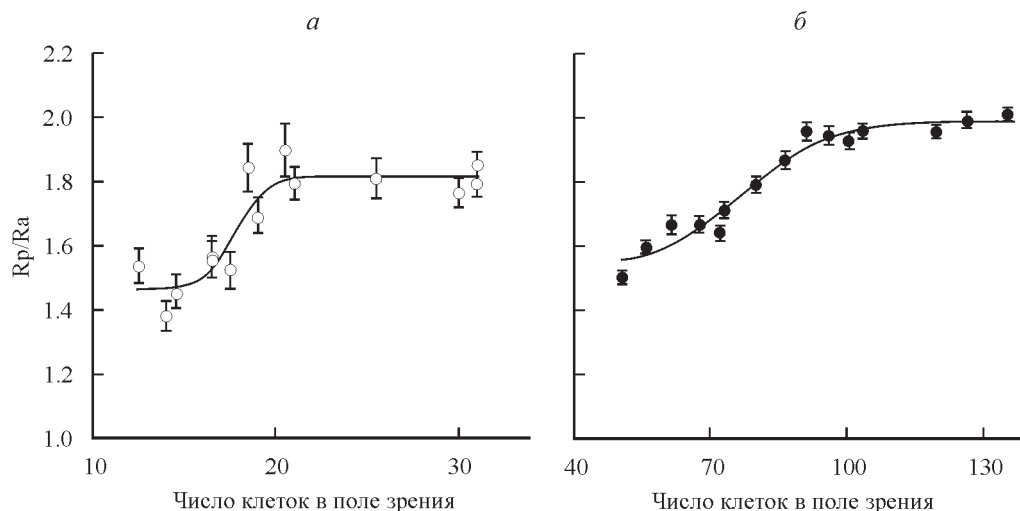


Рис. 10. Динамика изменения коэффициента распластывания клеток линии NCTC клон 929 при относительно низкой (а) и высокой (б) плотностях популяции.

а, б — соответственно группы 1\_4 и 2\_3. Представлены средние значения и их ошибки. Сплошные линии — кривые регрессии, полученные с использованием уравнения S-образной зависимости. Коэффициенты корреляции:  $R_{1_4} = 0.91 \pm 0.03$  и  $R_{2_3} = 0.98 \pm 0.01$ .

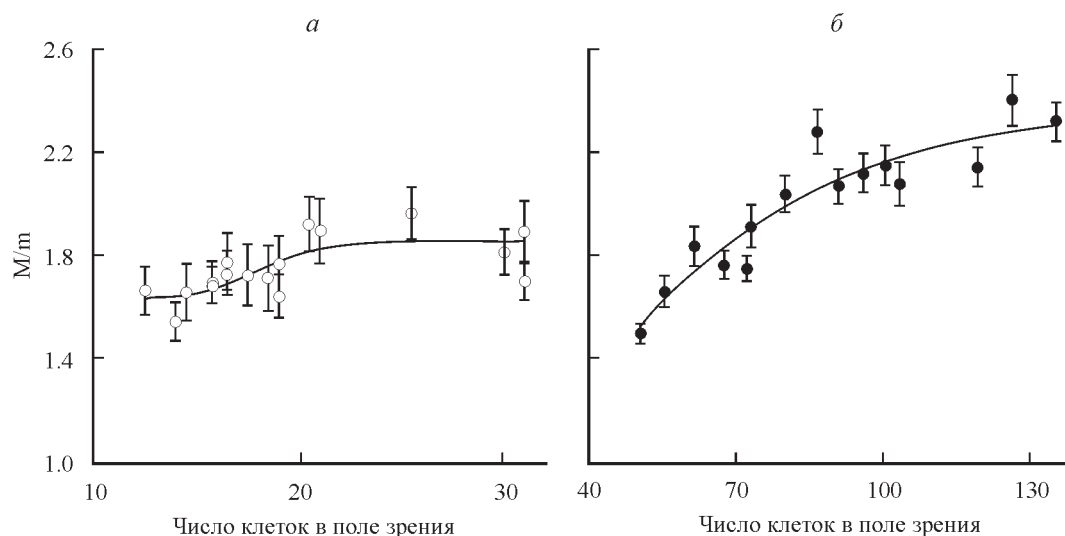


Рис. 11. Динамика изменения коэффициента поляризации клеток линии NCTC клон 929 при относительно низкой (а) и высокой (б) плотностях популяции.

а, б — соответственно группы 1\_4 и 2\_3. Представлены средние значения и их ошибки. Сплошные линии — кривые регрессии, полученные с использованием уравнения S-образной зависимости. Коэффициенты корреляции:  $R_{1_4} = 0.72 \pm 0.09$  и  $R_{2_3} = 0.93 \pm 0.03$ .

что его значение невысоко ( $-0.55$ ), оно достоверно отличается от 0.

Тем не менее в этом случае нельзя игнорировать временной фактор. За период наблюдения число клеток во всех полях зрения естественным образом растёт. Если ранжировать поля зрения по числу клеток, можно получить последовательность значений, хорошо описываемых уравнением S-образной зависимости (рис. 9). Такой участок кривой отражает экспоненциальный рост культуры, что соответствует выбранному времени наблюдения — в течение 24 ч через 1 сут после посева. Это означает, что в каждом поле зрения увеличение числа клеток описывается одним и тем же уравнением. Принимая во внимание этот факт, можно адекватно анализировать связь коэффициентов распластывания и поляризации с числом клеток в поле зрения (рис. 10, 11). Как видно, во всех случаях имеется выраженная корреляция расчетных кривых экспериментальным данным. Оба коэффициента по мере роста плотности популяции растут, стремясь к некоторому плато. При этом в полях зрения с изначально большей плотностью клеток значения этих коэффициентов выше.

## Обсуждение

Прежде чем обсуждать полученные результаты, обратимся к рис. 12, на котором в качестве примера приведены два изображения клеток линии NCTC клон 929 одного и того же поля зрения в начале и в конце видеосъемки. Нетрудно заметить, что увеличение числа клеток еще не приводит к формированию монослоя. Клетки по-прежнему дистанцированы друг от друга, практически не имея прямых контактов. Таким образом, становится очевидным, что представленные в настоящей работе данные в целом можно объяснить опосредованным взаимодействием клеток между собой.

Представленные снимки отражают типичное взаиморасположение фибробластоподобных клеток в культуре в экспоненциальной фазе роста. Оно типично для клеток *in vitro*, но для клеток *in vivo* не описано. В последнее десятилетие с развитием современных методов биохимии было обнаружено большое количество белков, секретируемых клетками как *in vivo*, так и *in vitro*, с еще неизвестными на сегодня функциями (Brown et al., 2012). Не исключено, что среди них могут оказаться белки, с по-

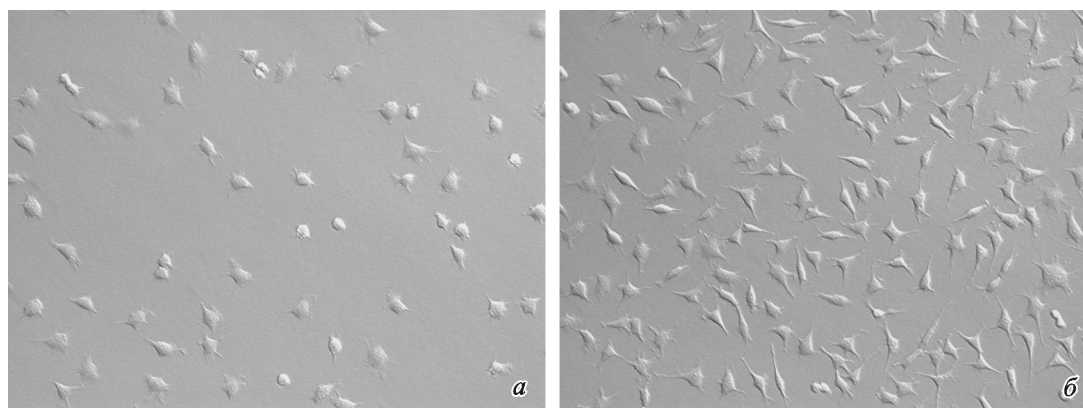


Рис. 12. Общий вид (одно поле зрения) клеток линии NCTC клон 929 в начале видеосъемки (а) и через 1 сут (б). Об. 20 $\times$ .

мощью которых осуществляется дистанционная передача информации о плотности клеток на единицу площади в культуре.

Независимо от причин, вызывающих изменение формы клеток, процесс этот сложный, многокомпонентный, многоэтапный. Тем не менее с большой долей вероятности можно полагать, что в него вовлечены как рецепторы, воспринимающие внешние сигналы, так и цитоскелет, за структурно-функциональными перестройками которого следуют изменения формы клетки (Burrige, Wittchen, 2013).

В настоящее время для понимания закономерностей поведения клеток в организме делается акцент на изучение их поведения в трехмерных культурах (Kutys et al., 2013; Miron-Mendoza et al., 2013). Большое внимание уделяется процессам непосредственного взаимодействия клеток либо с внеклеточным матриксом, либо друг с другом (Bettinger et al., 2009; Vlagovic et al., 2013). Работ, посвященных изучению взаимного дистанционного влияния клеток на морфологические особенности друг друга, практически нет. Ранее на эпителиоподобных клетках линии CHO нами было показано, что в экспоненциальной фазе роста культуры средний размер клеток остается относительно постоянной величиной (Петров, Негуляев, 2011), даже несмотря на то что после деления дочерние клетки в течение длительного времени (6 ч) имеют площадь меньше, чем материнские клетки. Эти факты можно объяснить только существованием механизма, координирующего взаимодействие делящихся и неделящихся клеток, в результате чего средний размер клеток данной популяции поддерживается на постоянном уровне.

Остается открытым вопрос о биологическом смысле дистанционных взаимодействий между клетками в культуре. В организме дистанционное координированное взаимодействие клеток детерминировано необходимостью поддержания целостности макроорганизма. Если этот механизм задействован в системе взаимодействий культивируемых клеток, он, по-видимому, должен выполнять какую-то функцию, необходимую для данного клеточного сообщества (популяции клеток в данном культуральном сосуде), например увеличивать вероятность выживания клеток при снижении их посевной концентрации или после криоконсервации.

В нашей работе (Петров, Цупкина, 2012) было показано, что рост популяции клеток CHO и формирование ими монослоя являются относительно автономными процессами. При этом образованию монослоя сопутствуют уменьшение размеров клеток и увеличение их поляризации. Несмотря на то что в настоящей работе использованы фибробластоподобные клетки, были получены сходные результаты. По мере роста популяции клеток (в том числе и при увеличении их числа в поле зрения) также происходят как уменьшение площади клеток, так и увеличение их поляризации. Однако в отличие от клеток CHO эти закономерности выявлены у фибробластоподобных клеток и во время экспоненциальной фазы роста. Если полагать, что эти данные не противоречат, а допол-

няют друг друга, то можно сделать следующее предположение. Изменения морфологии клеток линии NCTC клон 929 во время экспоненциальной фазы роста — это подготовка клеток к формированию монослоя. Иными словами, это не случайные вариации морфологических особенностей клеток, а регулируемый ими дистанционно специфический процесс самоорганизации клеточной популяции в условиях *in vitro*.

Авторы благодарят Ю. А. Негуляева за помощь в работе.

#### Список литературы

- Петров Ю. П., Негуляев Ю. А. 2011. Средний размер клетки как фактор, отражающий взаимодействие клеток линии CHO в процессе их пролиферации. Цитология. 53 (8) : 671—678. (Petrov Yu. P., Negulyaev Yu. A. 2011. Average cell size is a factor reflecting the interaction of CHO cells during their proliferation. Cell Tissue Biol. 5 (6) : 595—602.)
- Петров Ю. П., Цупкина Н. В. 2012. Особенности роста культуры клеток линии CHO. Цитология. 54 (10) : 754—760. (Petrov Yu. P., Tsupkina N. V. 2012. Growth characteristics of CHO cells in culture. Cell Tissue Biol. 7 (1) : 754—760.)
- Bettinger Ch. J., Langer R., Borenstein J. T. 2009. Engineering substrate micro- and nanotopography to control cell function. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 48 : 5406—5415.
- Blagovic K., Gong E. S., Milano D. F., Natividad R. J., Asthagiri A. R. 2013. Engineering cell-cell signaling. Curr. Opin. Biotechnol. 24 : 940—947.
- Brown K. J., Formolo C. A., Seol H., Marathi R. L., Duguez S., An E., Pillai D., Nazarian J., Rood B. R., Hathout Y. 2012. Advances in the proteomic investigation of the cell secretome. Expert. Rev. Proteomics. 9 : 337—345.
- Brown P. T., Handorf A. M., Jeon W. B., Li W. J. 2013. Stem cell-based tissue engineering approaches for musculoskeletal regeneration. Curr. Pharm. Des. 19 : 3429—3445.
- Burrige K., Wittchen E. S. 2013. The tension mounts: stress fibers as force-generating mechanotransducers. J. Cell Biol. 200 : 9—19.
- Hwang N. S., Shyni Varghese S., Elisseeff J. 2008. Controlled differentiation of stem cells. Adv. Drug Deliv. Rev. 60 : 199—214.
- Kutys M. L., Doyle A. D., Yamada K. M. 2013. Regulation of cell adhesion and migration by cell-derived matrices. Exp. Cell Res. 319 : 2434—2439.
- 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.
- Miron-Mendoza M., Koppaka V., Zhou C., Petroll W. M. 2013. Techniques for assessing 3-D cell-matrix mechanical interactions *in vitro* and *in vivo*. Exp. Cell Res. 319 : 2470—2480.
- Salibian A. A., Widgerow A. D., Abrouk M., Evans G. R. 2013. Stem cells in plastic surgery: a review of current clinical and translational applications. Arch. Plast. Surg. 40 : 666—675.
- Watt F. W., Driskell R. R. 2010. The therapeutic potential of stem cells. Phil. Trans. R. Soc. 365 : 155—163.
- Yamada K. M., Cukierman E. 2007. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. Cell. 130 : 601—610.

Поступила 9 X 2015



## MORPHOLOGY OF NCTC CELLS ONE DAY AFTER RESEEDING

Yu. P. Petrov,<sup>1</sup> N. V. Tsupkina

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194054;

<sup>1</sup> e-mail: yupe3ov@mail.ru

Development of regenerative medicine based on the use of stem cells is substantially dependent on the prediction of the changes that the cells undergo after culturing them *in vitro*. Therefore, the accumulation of knowledge in the field, which can be denoted as biology of cells in culture, is of special importance. Features of functioning cells *in vitro* is better to study in the permanent cells lines as their morphological and functional characteristics in numerous passages can be regarded as the result of adaptation of cells to grow outside the body. The aim of the present study was to test whether there is a relationship between the density of the cell culture prior to the formation of a monolayer of cells and morphometric parameters of the cells. The NCTC fibroblast-like cells (clone 929) were examined one day after reseeding. By this time, the culture density was such that there was virtually no direct contact between the cells. The cell area, spreading and polarization coefficients were used to characterize the cells. It has been shown that, in the same culture flask, the cells in the areas with a higher density of cells are smaller than in areas of lower density. At the same time, polarization of cells increases by increasing the cell density. Such cell reaction may be the result of the remote transfer of information between the cells. Analysis of the data obtained allows us to assume that the change in shape of the cells is related to early steps of monolayer formation.

Key words: cell area, spreading, cell polarization, cell morphometry.

---