

## СРАВНЕНИЕ ФОРМЫ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КРОЛИКА В ТЕЧЕНИЕ ПЯТИ ПАССАЖЕЙ ПОСЛЕ ПОЛУЧЕНИЯ ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЫ

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

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194054;

<sup>1</sup> электронный адрес: yure3ov@mail.ru

Одна из необходимых процедур при работе со стволовыми клетками — культивирование их в искусственных условиях. На этом этапе клетки теряют контроль со стороны макроорганизма и становятся автономными системами. Поэтому возрастает вероятность нежелательных изменений в клетках по мере их пассирования. Данных о том, когда именно могут возникнуть первые признаки изменения клеток и какие именно, в настоящее время недостаточно. В настоящей работе исследованы костномозговые мезенхимные стромальные клетки (МСК) кролика в течение 5 пассажей после получения первичной культуры. Для оценки состояния клеток использовали два параметра — площадь проекции клетки на подложку и коэффициент расплывания. Измерения проводили через 1 и 24 ч после каждого пересева, анализируя цифровые изображения живых интактных клеток. В этот период доля прироста площади клеток не зависит от пассажа, но в абсолютных значениях с ростом номера пассажа площадь клеток увеличивается. При этом можно выявить до трех групп клеток. Более мелкие клетки (1-я группа) преобладают в популяции клеток 1-го пассажа, в дальнейшем их доля падает, а доля более крупных — возрастает. Пассирование клеток не влияет на их коэффициент расплывания.

Ключевые слова: площадь клетки, коэффициент расплывания, живые интактные клетки.

В настоящее время мезенхимные стромальные клетки (МСК) широко используются для решения проблем регенеративной медицины (Watt, Driskell, 2010; Salibian et al., 2013). Одна из необходимых процедур при работе с этими клетками — культивирование их в искусственных условиях. Этот промежуточный этап на пути организм—культура—организм является очень важным для понимания и прогнозирования конечных результатов терапии стволовыми клетками (Hwang et al., 2008; Viswanathan et al., 2014).

Нет сомнения, что условия пребывания клеток в культуре и в организме принципиально различны (Gilbert, Blau, 2011). По-видимому, наиболее важным из них является отсутствие в условиях культуры внешнего контроля и регулирования жизнедеятельности клеток, которые в многоклеточном организме осуществляются согласованно эндокринной, иммунной и нервной системами. Вследствие этого культивируемые клетки становятся автономными биологическими системами, что в свою очередь повышает вероятность появления клеток с генотипом, отличным от генотипа нормальных диплоидных клеток (Полянская, Вахтин, 2003; Stojkovic et al., 2004; Полянская, 2014; Gaztelumendi, Nogués, 2014). Можно предположить, что серьезным нарушением генетического аппарата должны предшествовать изменения фенотипа клетки в ответ на новое окружение (питательная среда, тип подложки, соседние клетки). Однако в настоящее время практически нет данных о том, в какой момент у клеток первичной культуры начинают изменяться морфофункциональные характеристики, тем более о том, какие из них могли бы быть признаками необратимых изменений.

Одним из чувствительных индикаторов состояния и поведения клеток в культуре можно считать изменение их морфологии, в частности формы (Bettinger et al., 2009). Форма клетки как параметр интегральный зависит от многих внутриклеточных процессов, следствием чего является его высокая лабильность. Это требует использования больших выборок клеток. Количественно форму клетки можно оценить, измеряя ее площадь проекции на подложку и степень расплывания по субстрату.

Задача настоящей работы — исследовать, будут ли у клеток МСК на первых этапах пассирования после получения первичной культуры наблюдаться изменения их площади и степени расплывания.

### Материал и методика

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) получали из костного мозга подвздошных костей кролика по методике, описанной ранее (Дулаев и др., 2003). После ферментативной обработки клетки высевали в пластиковые чашки Петри (35 мм, Nunk, Дания) в среду ДМЕМ (Gibco, США), содержащую 20 % эмбриональной сыворотки коров (Gibco, США) и 40 мкг/мл гентамицина. Клетки растили в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>. Смену среды производили через каждые 3 сут. После формирования субконфлюэнтного монослоя на 10—12-е сут клетки снимали с помощью 0.25%-ного раствора трипсин-ЭДТА (Gibco, США) и рассевали в пластиковые культуральные флаконы (25 см<sup>2</sup>, Nunk, Дания) из

расчета  $(5-7) \cdot 10^5$  кл./см<sup>2</sup>. При дальнейшем культивировании начиная с 1-го пассажа их пересевали в соотношении 1 : 2.

Клетки исследовали в течение 5 пассажей с помощью инвертированного светового микроскопа Nikon ECL IPSE TS100 (с увеличением объектива 20×), оборудованного цифровой камерой Canon EOS 600D, разрешение 5184×3456 пикселей. Живые интактные клетки фотографировали через 1 и 24 ч после посева. Полученные цифровые изображения клеток сначала обрабатывали с помощью программы ImageJ 1.48v (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, США, <http://imagej.nih.gov/ij/>). Дальнейшие расчеты выполнены в Excel 2010 (MS Corporation, США) и Origin 6.1 (OriginLab Corporation, США). Определяли следующие параметры для анализа изменений клеток: площадь проекции клетки на подложку (далее — площадь клетки) и коэффициент расплывания  $R_p/R_a$ , характеризующий степень расплывания клеток по субстрату. Коэффициент расплывания — это соотношение радиуса ( $R_p$ ), рассчитанного из величины периметра клетки, взятой как длина окружности, и радиуса ( $R_a$ ), рассчитанного из величины площади клетки, принятой за площадь круга (Kuz'minykh, Petrov, 2004). На «точку» в среднем использовали не менее 300—400 клеток, чтобы кроме расчета средних величин получить удовлетворительные гистограммы распределения. Поскольку для решения поставленной задачи не было необходимости анализировать абсолютные размеры клеток, а лишь относительные, результаты измерения приведены в пикселях.

## Результаты

МСК начинают активно расплываться уже через 1 ч после посева. Поэтому указанное время было выбрано как точка отсчета. На рис. 1 показана средняя площадь клеток к этому времени после 5 пассажей. Видно, что она увеличивается по мере пассирования клеток, т. е. скорость их расплывания зависит от номера пассажа. Если, например, средняя площадь клеток 1-го пассажа равна  $9009 \pm 315$  пикселей, то к 5-му пассажиру она увеличивается втрое —  $21\,102 \pm 755$  пикселей ( $P < 0.01$ ). Этот результат можно рассматривать как предварительный, поскольку за ним следует как минимум два вопроса. Сохраняется ли та же тенденция при увеличении времени регистрации формы клеток после их посева? У всех ли клеток данного пассажа в одинаковой степени увеличивается площадь? В связи с этим те же самые клетки соответствующего пассажа анализировали еще и через 24 ч после посева.

В целом изменение размера клеток к этому времени имело ту же тенденцию, т. е. увеличение площади клеток прямо коррелировало с номером пассажа. Общий вид морфологии клеток дает рис. 2. На рисунке представлены фрагменты полей зрения (в одном и том же масштабе) клеток 1-го ( $a, \bar{b}$ ) и 5-го ( $b, \bar{z}$ ) пассажей соответственно через 1 ( $a, \bar{b}$ ) и 24 ( $b, \bar{z}$ ) ч после посева. На этих фотографиях, несмотря на субъективизм, можно отметить увеличение размера клеток не только со временем (от 1 до 24 ч), но и с увеличением номера пассажа. Понятно, что этот рост не бесконечен, и рано или поздно будет достигнуто плато. Однако в настоящей работе не было задачи определить сроки его появления. Важнее было ответить на второй вопрос: у всех ли клеток популяции увеличение

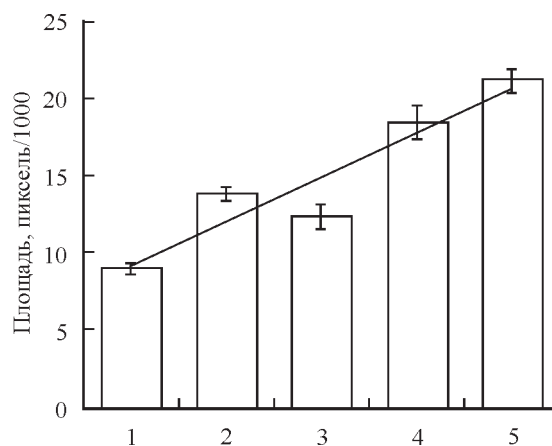


Рис. 1. Динамика изменения площади клеток МСК через 1 ч после посева.

По горизонтали — номера пассажей. Представлены средние значения и их ошибки (вертикальные отрезки). Сплошная линия — линия тренда, указывающая на рост площади клеток по мере пассирования.

площади во временном интервале 1—24 ч после посева происходит в одном и том же темпе? Прежде чем анализировать полученные данные, несколько замечаний по их представлению.

Очевидно, что независимо от пассажа расплывание клеток через 24 ч после посева всегда будет более выражено, чем через 1 ч. Если допустить пропорциональное увеличение размера площади для любых клеток популяции, то должен быть постоянный коэффициент пропорциональности такого увеличения. Его можно рассчитать, если среднее значение площади клетки одной выборки (24 ч) разделить на соответствующее среднее значение другой выборки (1 ч) клеток одного и того же пассажа. Получив значения этих коэффициентов, умножаем на них значения площадей каждой клетки в соответствующих выборках 1-го ч. Используя эти «подкорректированные» выборки, сравниваем их с оригинальными 24-часовыми выборками после расчета соответствующих гистограмм (рис. 3; данные по 2-му и 4-му пассажирам не представлены).

Смысл корректировки данных с помощью поправочного коэффициента заключается в следующем. Если при прочих равных условиях (состав среды, температура и т. п.) все клетки популяции принадлежат к одной и той же выборке (отсутствие субпопуляций по темпу роста площади, но не по величине самой площади клеток), то в идеальном случае гистограммы частот распределения площади клеток точек «1 ч» и «24 ч» должны совпасть. Как следует из данных рис. 3, полного совпадения соответствующих пар кривых регрессии не наблюдается ни в одном случае. Однако их подобие (сходство) для каждого пассажа можно считать вполне удовлетворительным, поскольку это не идеальный вариант, а полученный на основе экспериментальных значений, высокая дисперсия для которых, по нашим наблюдениям, обычное явление. Таким образом, есть основание обе выборки объединить в одну и представить усредненные значения в виде отдельных гистограмм с соответствующими кривыми регрессии (рис. 4).

При объединении выборок «1 ч» (с учетом поправочного коэффициента) и «24 ч» сохраняется иллюстрация увеличения площади клеток по мере пассирования в целом. Но что важнее — более отчетливо от пассажа к пас-

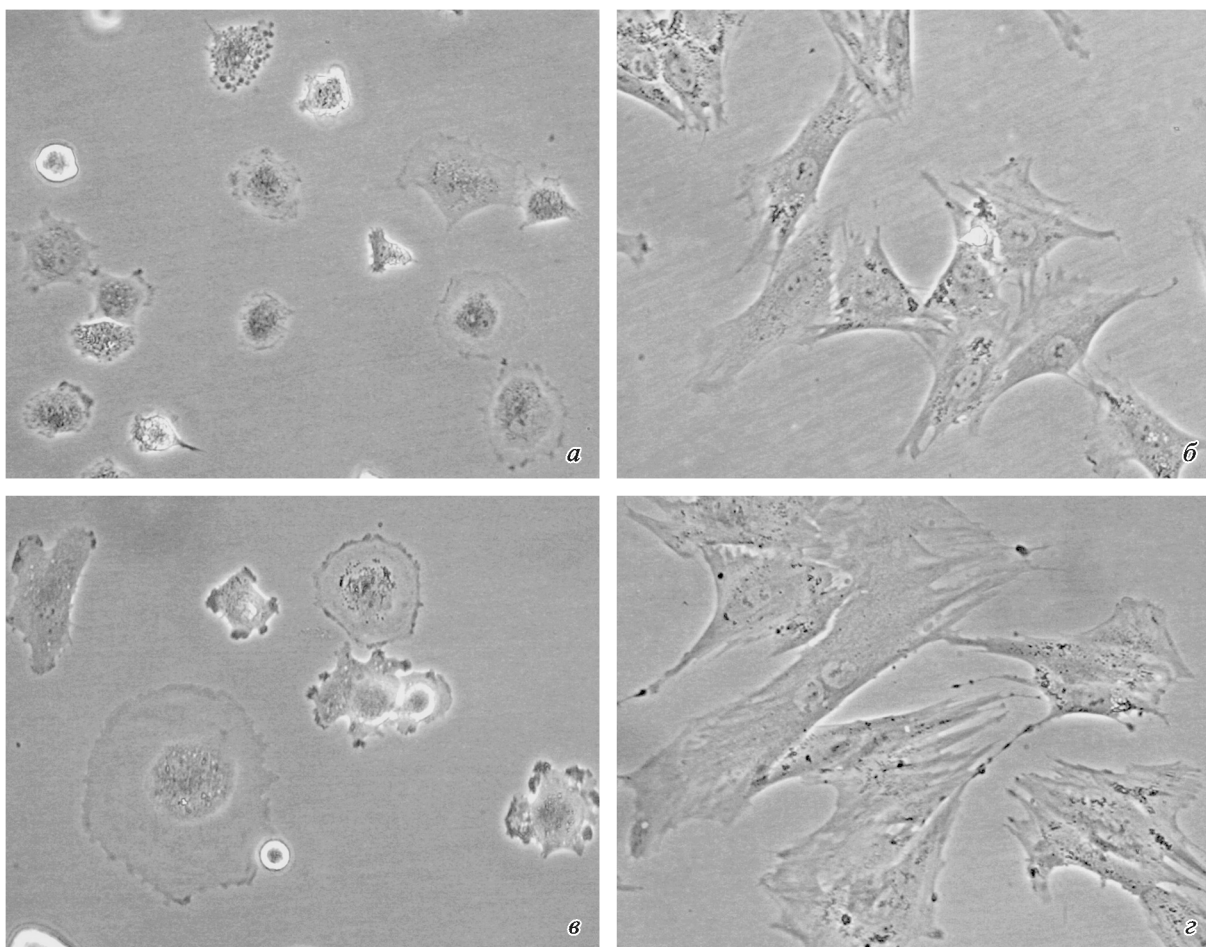


Рис. 2. Общий вид клеток МСК через 1 (а, в) и 24 (б, г) ч после посева.  
а, б — 1-й пассаж; в, г — 5-й пассаж. Представленные фрагменты полей зрения выполнены в одном и том же масштабе.

сажу проявляется гетерогенность популяции по признаку «площадь клетки», о чем свидетельствуют *штриховые линии* на рис. 4 автономных групп клеток соответственно пассажу. Видно, что постепенно доля клеток с меньшей площадью снижается, а с большей — возрастает. Более точное представление об этих сдвигах дают диаграммы, представленные на рис. 5.

Особенность популяции клеток 1-го пассажа — почти 100%-ная доля мелких клеток (*пик I*). Тем не менее небольшая доля (3 %) клеток имеет величину *пика II*, точно такую же как и клетки 3-го и 5-го пассажей. Кстати, у клеток этих пассажей равны и величины *пика I*. *Пик III* выше у клеток 5-го пассажа. В целом суммарная доля клеток *II* и *III пиков* с увеличением номера пассажа растет, а доля *I пика* падает (рис 5, б).

Представление об изменении распластывания клеток по мере пассирования дает рис. 6. На нем в виде графиков изображены гистограммы распределения клеток с различными коэффициентами распластывания, рассчитанные как  $\ln(Rp/Ra)$ . Здесь не использованы расчеты с учетом поправочных коэффициентов, а даны оригинальные значения для обеих временных точек. Обращает на себя внимание не только увеличение распластывания клеток в период 1—24 ч, что естественно, но и подобие формы соответствующих гистограмм во всех трех пассажах. Особенно отчетливо, несмотря на выраженную дисперсию, сходство кривых, соответствующих 24 ч. Они имеют ти-

пичную куполообразную форму нормального распределения, причем практически «взаимозаменяемую» для любого пассажа.

## Обсуждение

Как показывают представленные результаты, форма клетки — это высокочувствительный параметр, отражающий состояние интактных МСК во время их культивирования в искусственных условиях. Площадь клеток после пересева в течение 24 ч увеличивается независимо от номера пассажа. Это естественный процесс клеточного распластывания. Несмотря на разнообразие формы клеток (см. рис. 2), по параметру «площадь клетки» их популяции в процессе культивирования могут состоять из нескольких (до трех) подгрупп, выявляемых с помощью расчета кривых регрессии. Наличие таких подгрупп может быть следствием двух причин — либо данная популяция имеет разные типы клеток (субпопуляции), либо в процессе распластывания и движения клеток по субстрату существуют переходящие относительно устойчивые физиологические состояния клеток, детерминирующие их площадь. И в том и в другом случае расчеты кривых регрессии отражают оба явления в виде пиков распределения (*пунктирные линии*). В настоящей работе мы не ставили задачу дифференцировать эти варианты.

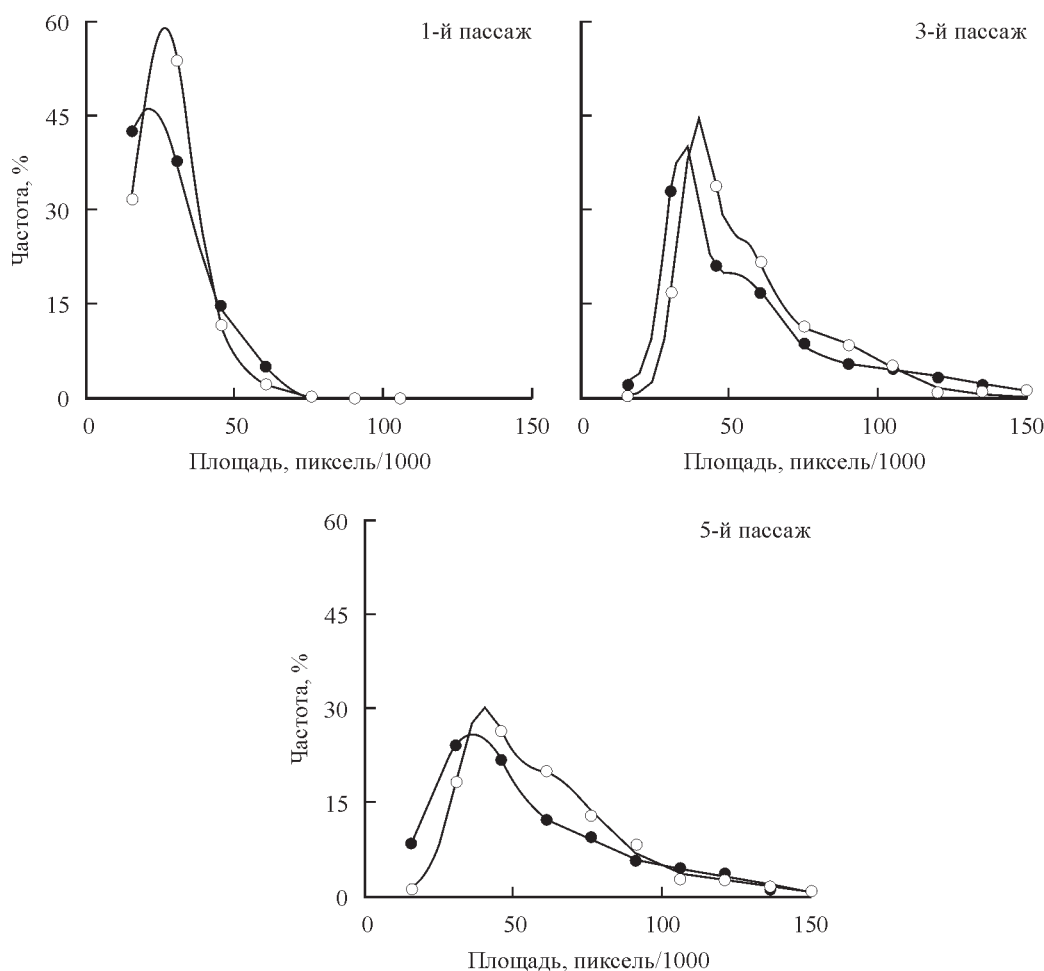


Рис. 3. Гистограммы распределения клеток МСК по величине их площади после 1, 3 и 5-го пассажей.

Черные кружки — 1 ч после посева; светлые кружки — 24 ч после посева. Объяснения см. в тексте.

Использование поправочных коэффициентов для сравнения площади клеток через 1 и 24 ч после посева показало, что темпы увеличения площади клеток в целом не зависят от номера пассажа, в то время как сама площадь клеток растет по мере их пассирования. Такой феномен, по-видимому, можно считать начальным признаком внешнего проявления внутриклеточных процессов, направленных на адаптацию клеток МСК к условиям культуры.

Ранее мы наблюдали незначительное увеличение роста площади фибробластоподобных клеток мыши линии NCTC клон 929 по мере их пассирования после криоконсервации (Петров, Цупкина, 2016). Поскольку и в том и в другом случае наблюдаемый эффект связан с переходом клеток из одного состояния в другое и при этом проявляется у разных клеточных типов (МСК кролика и фибробластоподобные клетки мыши, клетки нормальной диплоидной линии и постоянной линии), нельзя исключить, что феномен изменения площади может быть специфическим признаком адаптации клеток к культивированию в искусственных условиях. Увеличение объема клетки происходит при ее росте от митоза до митоза. Поэтому связь площади клетки с ее клеточным циклом исключить нельзя. Так, было показано, что в начальный период адаптации при редком посеве МСК человека может изменяться соотношение клеток с разной длиной клеточного цикла (Larson et al., 2008).

Площадь проекции клетки на подложку зависит как от ее объема (массы), так и от особенностей ее распластывания. Первое по сути отражает метаболизм клетки и как следствие — рост ее массы. Второе — физиологическое состояние клетки в данный момент времени в зависимости от ее реакции на окружающую среду. Оба процесса идут одновременно. Чтобы их отдифференцировать, мы использовали два параметра — «площадь клетки» и «коэффициент распластывания». Изменение площади клетки, связанное с ее ростом (формально от митоза до митоза), — процесс постепенный и направленный только на увеличение этого параметра, а изменение формы при распластывании и движении клетки происходит относительно быстро, при этом площадь проекции клетки на подложку может и увеличиваться, и уменьшаться.

Соотношение МСК с различными коэффициентами распластывания через 24 ч после посева (время максимально выраженного распластывания) остается практически одним и тем же независимо от номера пассажа. Кроме того, следует заметить, что распластывание и передвижение клеток по субстрату в значительной степени обусловлены формированием филоподий. Именно поэтому вариабельность коэффициента распластывания клеток значительно выше, чем их площади. Распластывание клеток вообще, а формирование филоподий в частности, детерминированы состоянием цитоскелета и его пе-



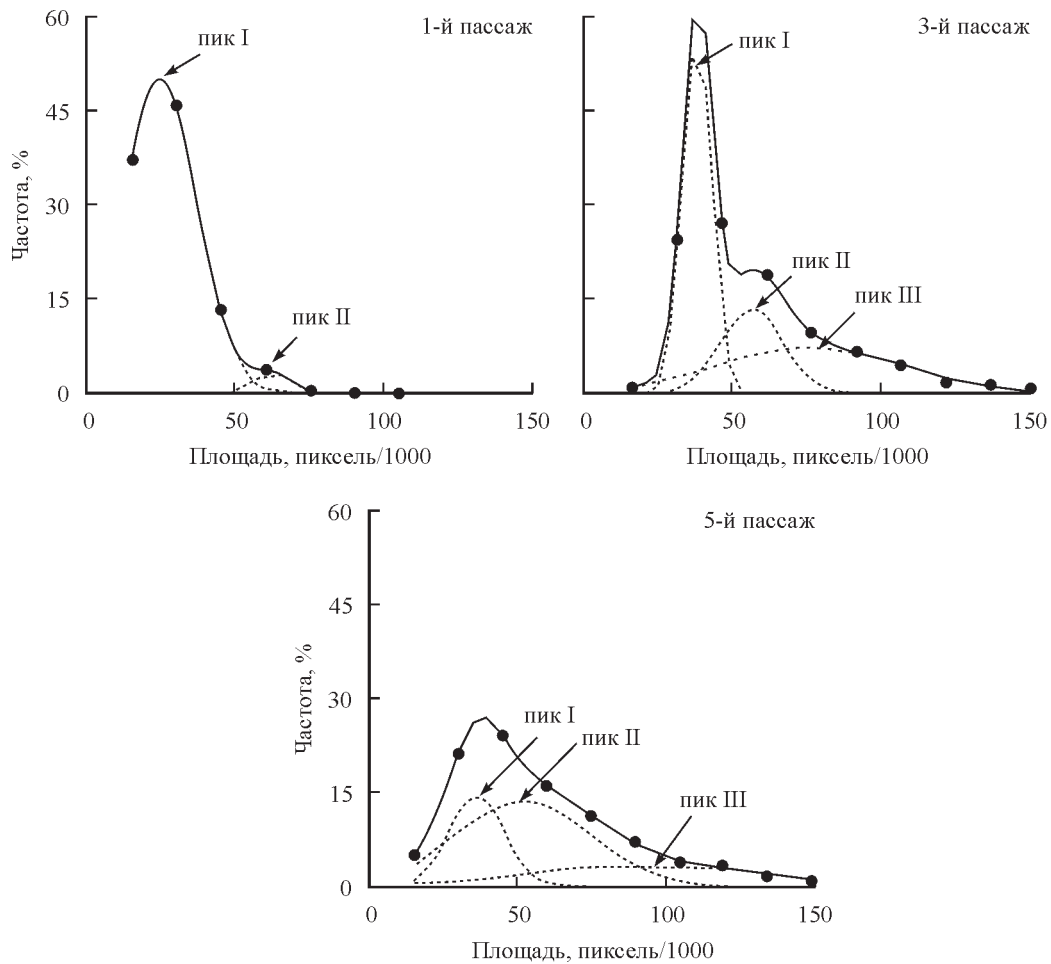


Рис. 4. Усреднение экспериментальных значений, представленных на рис. 3 (пассажи 1, 3 и 5), для точек «1 ч» и «24 ч». Кружки — экспериментальные значения; сплошные линии — суммарные теоретические кривые, пунктирные линии — расчетные кривые, соответствующие подгруппам клеток с различными площадями.

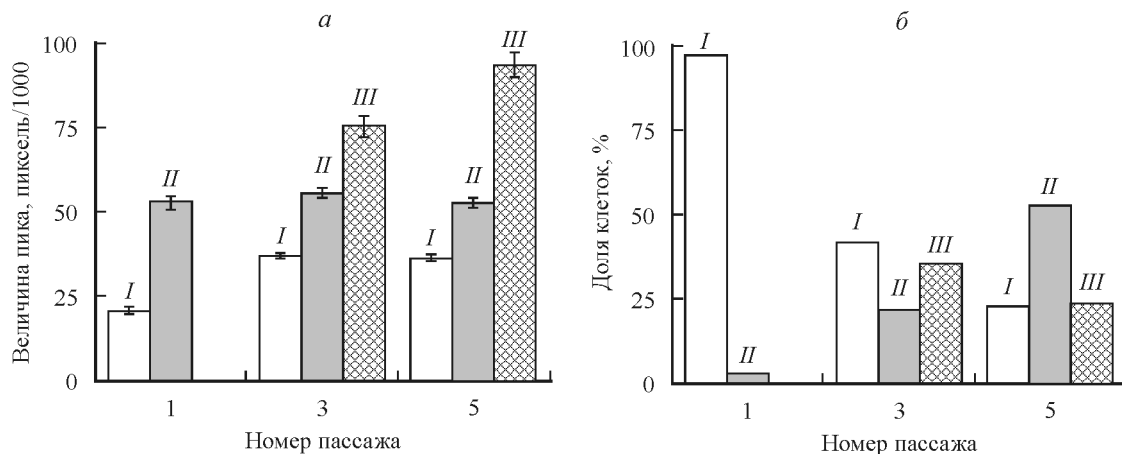


Рис. 5. Соотношение величин пиков (а), т. е. средних значений нормальных распределений, представленных на рис. 4 пунктирными линиями для клеток 1, 3 и 5-го пассажей.

а — три пика (I—III) соответствуют трем подгруппам клеток, имеющих три различных средних значения площади; вертикальные отрезки — ошибка среднего. б — доли клеток (%), входящих в подгруппы соответственно пикам для каждого пассажа: пик I (белые столбики) — подгруппы мелких клеток, пик II (серые столбики) — подгруппы клеток промежуточного размера, пик III (заштрихованные столбики) — подгруппы крупных клеток. Другие объяснения см. в тексте.

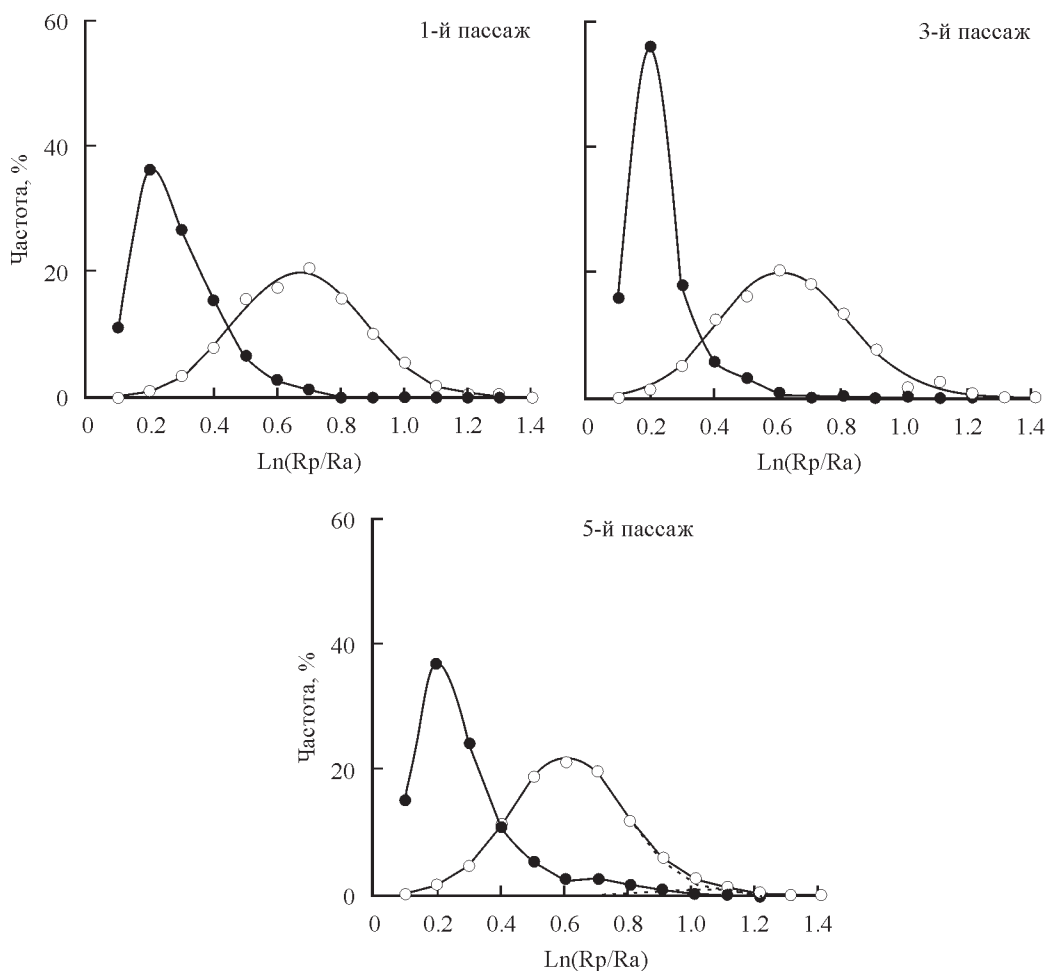


Рис. 6. Гистограммы распределения клеток с различными коэффициентами распластывания, рассчитанными как  $\text{Ln}(R_p/R_a)$ , для 1, 3 и 5-го пассажей.

Черные кружки — экспериментальные значения через 1 ч после пересева, светлые — через 24 ч. Сплошные линии — расчетные кривые.

рестройками (Levina et al., 2001). Следовательно, можно утверждать, что на ранних этапах адаптации клеток МСК к условиям искусственного культивирования (по крайней мере до 5-го пассажа) у них не происходит заметных изменений, связанных с функционированием цитоскелета.

Полученные нами данные показывают, что процессы роста и движения МСК *in vitro* являются относительно автономными, поскольку на начальных этапах пассирования их площадь зависит, а коэффициент распластывания не зависит от числа пересевов после получения первичной клеточной культуры. Таким образом, можно предположить, что на раннем этапе культивирования МСК кролика в искусственных условиях процессы, детерминирующие рост массы клетки, с большей вероятностью могут быть подвержены необратимым изменениям, чем процессы, связанные с ее распластыванием и миграцией.

Авторы благодарят А. В. Комарова и С. Е. Жумагазиева (Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург) за предоставление материала, из которого были выделены мезенхимные стромальные клетки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00068; изучение

динамики морфологических показателей с помощью инвертированного светового микроскопа) и ФАНО России (расчет и построение теоретических кривых).

#### Список литературы

Дулаев А. К., Гололобов В. Г., Деев Р. В., Иванов Д. И., Николаенко Н. С., Цупкина Н. В., Пинаев Г. П. 2003. Остеогенные клетки и их использование в клинической практике. Мед. академ. журн. 3 (3): 55—61. (Dulaev A. K., Gololobov V. G., Deev R. V., Ivanov D. I., Nikolaenko N. S., Tsupkina N. V., Pinaev G. P. 2003. Osteogenic cells and their use in clinical practice. Med. Acad. J. 3 (3): 55—61.)

Петров Ю. П., Цупкина Н. В. 2016. Морфологические особенности клеток линии NCTC клон 929 через 1 сут после пересева. Цитология. 58 (1): 35—43. (Petrov Yu. P., Tsupkina N. V. 2016. Morphology of NCTC cells one days after reseeding. Tsitologiya. 58 (1): 35—43.)

Полянская Г. Г. 2014. Проблема нестабильности генома культивируемых стволовых клеток человека. Цитология. 56 (10): 697—707. (Poljanskaya G. G. 2014. The problem of genomic instability of cultivated human stem cells. Tsitologiya. 56 (10): 697—707.)

Полянская Г. Г., Вахтин Ю. Б. 2003. Кариотипическая структура клеточных популяций *in vitro* как целостная система. Цитология. 45 (2): 115—131. (Poljanskaya G. G., Vakh-

tin Yu. B. 2003. The karyotypic structure of cell populations *in vitro* as integral system. *Tsitologiya*. 45 (2) : 115—131.)

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.

Gaztelumendi N., Nogués C. 2014. Chromosome instability in mouse embryonic stem cells. *Sci. Rep.* 4 : 1—8.

Gilbert P. M., Blau M. B. 2011. Engineering a stem cell house into a home. *Stem Cell Res. Ther.* 2 : 2—9.

Hwang N. S., Shyni Varghese S., Elisseeff 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.

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.

Levina E. M., Kharitonova M. A., Rovensky Yu. A., Vasilev Ju. M. 2001. Cytoskeletal control of fibroblast length: experiments with linear strips of substrate. *J. Cell Sci.* 114 : 4335—4341.

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.

Stojkovic M., Lako M., Strachan T., Murdoch A. 2004. Derivation, growth and applications of human embryonic stem cells. *Reproduction*. 128 : 259—267.

Viswanathan P., Gaskell T., Moens N., Culley O. J., Hansen D., Gervasio M. K. R., Yeap Y. J., Danovi D. 2014. Human pluripotent stem cells on artificial microenvironments: a high content perspective. *Front. Pharmacol.* 5 : 1—14.

Watt F. W., Driskell R. R. 2010. The therapeutic potential of stem cells. *Phil. Trans. R. Soc.* 365 : 155—163.

Поступила 27 IV 2016

#### COMPARISON OF THE SHAPE OF RABBIT MESENCHYMAL STROMAL CELLS DURING FIVE PASSAGES AFTER PRODUCTION OF PRIMARY CULTURE

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

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194054;

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

Cultivation of cells under artificial conditions is one of the necessary procedures when working with stem cells. At this stage, the cells lose control by the macroorganism, becoming independent systems. Therefore, during the passaging of the cells, the probability of undesirable modifications is increased. At present, there is not enough data on the first indications about modification of the cultured cells and when they can appear. In the work, the rabbit medullary mesenchymal stromal cells (MSCs) were studied during 5 passages after producing primary culture. The area and the spreading coefficient of a cell were used to evaluate the cell state. The measurements were made 1 h and 1 day after cell reseeding by analyzing digital images of intact living cells. During this time interval, the absolute values of the cell area increased with the passage number, whereas the increment of the cell growth area did not depend on the passage number. It is possible to distinguish three groups of cells. Smaller cells (the 1st group) prevail in cell population of the 1st passage. Next, their proportion is decreased and the proportion of larger cells is increased. Passaging of the cells does not influence their spreading coefficient.

**Key words:** cell area, spreading coefficient, intact living cells.