

СРАВНЕНИЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА МОНОСЛОЙНОЙ ЛИНИИ ГЕПАТОМЫ ЗАЙДЕЛА И ЕЕ СУБЛИНИЙ 3Н И 9С В КУЛЬТУРЕ

© Ю. П. Петров,¹ Н. П. Терюкова,¹ Е. И. Сахенберг,
В. А. Иванов, С. А. Снопов¹

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;

¹ электронный адрес: yure3ov@mail.ru, npter@yandex.ru, snopov@hotmail.com

Изучали пролиферативные особенности клеток монослойной линии гепатомы Зайдела крысы (родительской, исходной) и клонированных из нее сублиний 3Н и 9С, различающихся по происхождению (из разных типов колоний родительской линии), по цитоморфометрическим характеристикам, по типам колоний, образующихся при реклонировании клеток *in vitro*, и по туморогенности клеток при их трансплантации крысам. Использовали цейтраферную видеосъемку живых клеток, культивируемых *in vitro*. Основное внимание уделили анализу продолжительности клеточного цикла (ПКЦ) и ее возможной связи с формой клетки. Прямое измерение ПКЦ (от митоза до митоза) выполнено на клетках несинхронизированных культур. Средние значения ПКЦ у клеток родительской линии гепатомы Зайдела (14.6 ± 0.2 ч) оказались выше ($P < 0.05$), чем у клеток сублиний 3Н и 9С (13.9 ± 0.2 и 13.5 ± 0.3 ч соответственно). Анализ гистограмм распределения ПКЦ показал, что все три популяции имеют общую группу клеток с ПКЦ, близкой к 14 ч. При этом в родительской линии около 1/3 клеток имели более высокую ПКЦ (16.7 ± 0.2 ч), а в сублинии 9С, напротив, у 1/3 клеток ПКЦ была ниже (12.6 ± 0.1 ч). Кроме этого, показано, что такие параметры, как площадь клетки, коэффициенты ее расплывания и поляризации, имеют тесную связь с ПКЦ у клеток сублинии 3Н, имеющих преимущественно фибробластоподобную форму, ($P < 0.01$): чем больше площадь клетки, тем длиннее ее ПКЦ; чем сильнее клетка распластана или поляризована, тем короче ее ПКЦ. Для клеток родительской линии и сублинии 9С — преимущественно эпителиоподобных — эти закономерности менее выражены и в целом имеют обратную направленность, что может объясняться различиями в происхождении клеточных линий. При рассмотрении различий ПКЦ в парах дочерних клеток мы вводим понятие «коэффициент симметричности деления». Чем его величина ниже, тем больше сходство пары дочерних клеток по ПКЦ. Обсуждается возможная связь изученных *in vitro* параметров клеток с их туморогенностью.

Ключевые слова: клеточный цикл, форма клетки, симметричность деления, голоклон, мероклон, туморогенность.

Принятые сокращения: КСД — коэффициент симметричности деления, ОСК — опухолевые стволовые клетки, ПКЦ — продолжительность клеточного цикла, СК — стволовые клетки.

В последнее десятилетие основным трендом клеточной биологии можно считать изучение стволовых клеток (СК) для использования их в регенеративной медицине. Перед трансплантацией реципиенту собственных или донорских СК необходим промежуточный этап — культивирование этих клеток в культуре. Этот этап может быть как кратковременным, так и длительным, если ставится цель получить линию СК. В любом случае нахождение клеток вне организма не исключает изменений как самих клеток, так и состава их популяций, что может оказаться нежелательным после трансплантации их в организм реципиента. В связи с этим возрастает актуальность изучения биологии клеток в культуре. Знание общих закономерностей изменения морфофункциональных характеристик клеток (любых) при переводе их из условий *in vivo* в условия *in vitro* должно помочь предсказанию их поведения при обратном переводе в условия *in vivo*.

Другое важнейшее направление клеточной биологии сформировалось в последние годы на основании углубляющихся представлений о наличии в злокачественных опухолях особых клеток (или клеточных популяций), ответственных за инициирование опухоли и ее метастазирование, которые получили название опухолевых стволовых клеток — ОСК (Visvader, Lindeman, 2008; Maenhaut et al., 2010). Для исследования таких клеток одним из ведущих методов является их культивирование *in vitro*.

Ранее нами из асцитной гепатомы Зайдела крыс *in vitro* были выделены две линии клеток — монослойная и суспензионная (Терюкова и др., 2013). Затем в результате клонирования клеток монослойной (родительской) линии методом предельных разведений были впервые получены клональные сублинии 3Н и 9С, которые произошли из колоний разного типа и различаются не только по своим цитоморфометрическим характеристикам, но и по туморо-

генности (Терюкова и др., 2016). Особенности роста этих клеток в культуре определяются природой клеток-прародительниц клонов: клоногенные клетки разного уровня цитодифференцировки образуют разные по морфологии колонии, получившие название голо-, меро- и параклонов (Barrandon, Green, 1987). Есть данные, указывающие на то, что клеточные линии опухолей эпителиального происхождения при клонировании тоже дают сходные по морфологии и пролиферативному потенциалу структуры (Locke et al., 2005). При этом для клеточных линий простаты и поджелудочной железы человека показано, что клетки голоклонов обладают опухолеиницирующими способностями и могут быть использованы в качестве новой модели для изучения ОСК (Li et al., 2008; Tan et al., 2011).

Задача настоящей работы: сравнить клетки родительской монослойной линии гепатомы Зайдела и ее голоклональной 3Н и мероклональной 9С сублиний и по ПКЦ, и по морфометрическим показателям (площади проекции клетки на подложку, коэффициенту ее расплывания и поляризации) с помощью цейтраферной видеосъемки в условиях культивирования *in vitro*.

Материал и методика

Работа выполнена на клетках монослойной культуры гепатомы Зайдела крыс и ее клональных сублиниях 3Н и 9С, полученных ранее (Терюкова и др., 2015, 2016). Клетки культивировали в полной ростовой среде DMEM (Биолот, Россия), содержащей 10 % сыворотки плодов коровы Sus-Biol (Биолот, Россия) и 80 мг/мл гентамицина (Биолот, Россия), в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °С.

Продолжительность клеточного цикла оценивали на несинхронных культурах, не используя митостатики. Клетки выращивали в пластиковых чашках Петри (Orange Scientific, Бельгия) диаметром 35 мм до достижения монослоем 80–90%-ной конfluence. С помощью пластикового носика дозатора создавали «экспериментальную рану» в монослое — пространство, в котором удобно наблюдать за поведением, перемещением и делением клеток растущей культуры. Затем чашку с клетками помещали на столик микроскопа AxioObserver.Z1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Германия), оборудованного устройствами для долговременного прижизненного наблюдения за клетками (поддержание оптимальной температуры, влажности и концентрации CO₂). Регистрацию изображений проводили в течение 24 ч в режиме цейтраферной видеосъемки с интервалами времени между кадрами 2 мин. Использовали объектив Plan-Neofluar 10×/0.25 и цифровую камеру AxioCam HRm с разрешением 1388×1040 пикселей. Метод наблюдения — дифференциальный интерференционный контраст, адаптированный для работы с пластиком (PLASDIC). Заданные условия эксперимента поддерживали автоматически программой AxioVision 4.8.2 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Германия).

Для количественного анализа использовали отдельные изображения клеток в области края экспериментальной раны, записанные в формате «JPEG». Анализировали клетки, за которыми можно было проследить от одного митоза до другого. Зная время между отдельными изображениями (2 мин), рассчитывали ПКЦ отдельных клеток. Общее число клеток в выборках составило: у моно-

слойной культуры Зайдела — 70, у сублинии 3Н — 76 и у сублинии 9С — 40.

Измерения площади проекции клеток на подложку (площадь клетки), коэффициента их расплывания Rp/Ra и коэффициента поляризации M/m выполняли с помощью программы ImageJ 1.48v (Rasband W. S., Image J U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, США; <http://imagej.nih.gov/ij>). Поскольку для анализа площади клеток использовали относительные величины, значения этого параметра оставляли в пикселях.

Коэффициент расплывания Rp/Ra предложен нами ранее для морфометрии культивируемых клеток (Kuz'minykh, Petrov, 2004). Он равен отношению радиуса Rp, рассчитанного из величины периметра клетки, взятой как длина окружности, к радиусу Ra круга, площадь которого равна измеренной площади проекции клетки на подложку. При минимальном значении этого коэффициента, равного 1, форма клетки совпадает с формой правильного круга. Чем выше величина этого коэффициента, тем сильнее клетка распластана на подложке (в значительной степени увеличение Rp/Ra связано с длиной и количеством филоподий). Для сравнительного анализа удобнее использовать величину натурального логарифма этого коэффициента — ln(Rp/Ra), поскольку отсчет идет от нуля и шкала становится более равномерной.

Для характеристики вытянутости (поляризации) клеток использовали коэффициент поляризации M/m (Петров, Цупкина, 2016). Он численно равен соотношению длинной (M) и короткой (m) осей эллипса, рассчитываемых автоматически программой ImageJ при оконтуривании клеток. Так же как и в случае с Rp/Ra, минимальное значение коэффициента M/m равно 1, и это указывает на то, что форма клетки близка к форме правильного круга. Чем выше значение M/m, тем больше клетка вытянута. При анализе формы клеток этот коэффициент тоже удобнее представлять в виде натурального логарифма — ln(M/m).

Анализ морфометрических параметров сделан на тех же клетках, что и анализ ПКЦ. Для этого использовали каждое 10-е изображение данной клетки (всего по 10 изображений на клетку) начиная с 50-го, т. е. через 1.7 ч после завершения деления ее материнской клетки (см. рис. 1). К этому времени увеличение объема клетки в начальный период ее роста после митоза уже заканчивалось, и, таким образом, мы определяли усредненные параметры формы клеток в процессе их расплывания на субстрате в течение последующих 3 ч.

Расчеты среднего значения, стандартного отклонения, построение диаграмм и гистограмм выполнены с помощью программы Excel 2010 (MS Corporation, США), в частности ее пакета плагинов «Анализ данных». Построение расчетных кривых по экспериментальным значениям сделано с использованием опции «Fitting» программы Origin 6.1 (OriginLab Corporation, США). О степени вероятности аппроксимации расчетных значений к экспериментальным судили по коэффициенту детерминации R², рассчитываемому автоматически при получении линий тренда программами Excel 2010 и Origin 6.1. Этот коэффициент изменяется от 0 до 1. Чем ближе к экспериментальным точкам проходит расчетная кривая, т. е. чем ближе к 1 коэффициент детерминации, тем выше вероятность того, что такая последовательность экспериментальных значений описывается уравнением данной расчетной кривой.

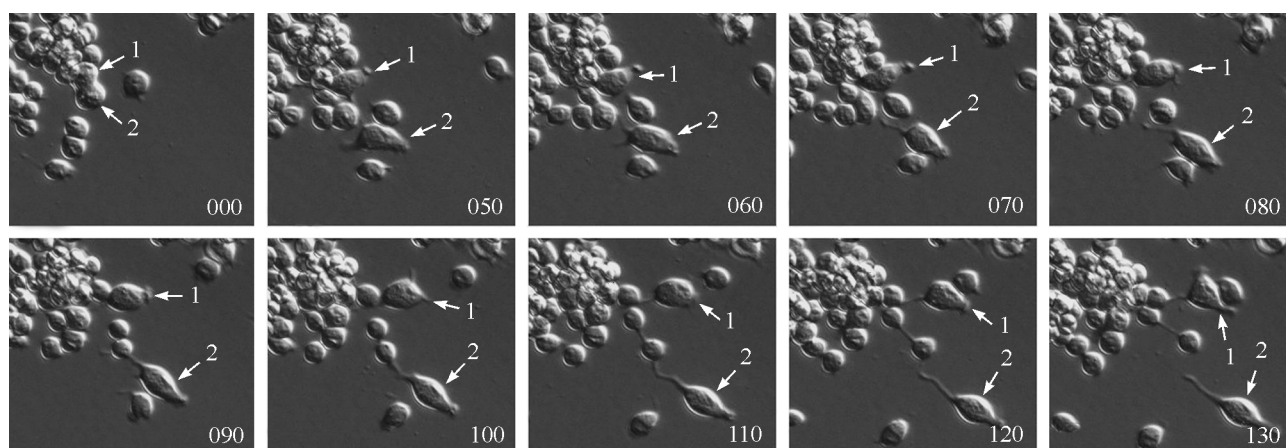


Рис. 1. Фрагменты одного и того же поля зрения с делящейся клеткой и ее дочерними клетками 1 и 2 (указаны стрелками). Световая микроскопия.

Первое изображение (кадр 000) — деление материнской клетки, время взято за 0 мин. Последующие изображения для морфометрического анализа клеток отбирали начиная с 50-го кадра (изображение 050 через 100 мин после кадра 000) и далее через каждый 10-й (060, 070 и т. д.), т. е. через каждые 20 мин. Видно, что дочерняя клетка 1 существенно вытянулась и сместилась за 200—240 мин (кадры 100—130), а дочерняя клетка 2 — уже в первые 100 мин (кадры до 50-го не показаны). Об. 10 \times .

Результаты

Использование цейтраферной видеосъемки для изучения биологии клеток в культуре позволяет наблюдать и фиксировать поведение живых клеток без какого бы то ни было повреждения. Для примера на рис. 1 приведены фрагменты, иллюстрирующие поведение двух дочерних клеток сублинии 3Н после начала их распластывания по субстрату. Фиксация времени при наблюдении за делением материнской клетки и отслеживании поведения ее дочерних клеток вплоть до следующего митоза дает, в частности, возможность напрямую измерять ПКЦ и параллельно анализировать динамику изменения формы данной клетки. Таким образом, сравнение разных количественных характеристик у одной и той же клетки позволяет проверить, существует ли между ними связь, и если она есть, оценить ее степень.

На рис. 2, а представлены диаграммы, демонстрирующие средние значения ПКЦ исследуемых линий. Несмотря на отсутствие различий по этому показателю между сублиниями 3Н (преимущественно фибробластоподобные клетки) и 9С (преимущественно эпителиоподобные клетки) — 13.9 ± 0.2 и 13.5 ± 0.3 ч соответственно, ПКЦ у обеих сублиний была достоверно ниже, чем у клеток исходной линии Зайдела (14.6 ± 0.2 ч; $P < 0.05$). Однако стандартные отклонения данного параметра у всех клеток не имели достоверных различий (рис. 2, б). Формально это свидетельствует о приблизительно одной и той же дисперсии значений ПКЦ у этих культур.

Более глубокий анализ вариабельности значений ПКЦ исследуемых линий можно провести с помощью гистограмм распределения. Такие гистограммы представлены на рис. 3, на котором экспериментальные значения отмечены черными кружками. Полагая, что исследуемый параметр, как и большинство биологических характеристик, может быть описан нормальным распределением, используем это распределение для построения расчетных кривых. Подбор наиболее близкого расчетного распределения к экспериментальным значениям выполнен в программе Origin 6.1. Степень аппроксимации контролировали с помощью коэффициента детерминации R^2 . Чем он

ближе к 1, тем точнее подбор теоретического распределения. Во всех случаях, представленных на рис. 2, этот коэффициент не ниже 0.97.

Не всегда подбор оптимального теоретического распределения может быть выполнен только при использовании одной кривой нормального распределения, как это сделано для ПКЦ клеток сублинии 3Н (рис. 3, б). Это возможно лишь в тех случаях, когда выборка экспериментальных значений более или менее однородна, т. е. не имеет выраженных подгрупп (субпопуляций). В случае клеток родительской линии Зайдела и сублинии 9С можно отметить наличие как минимум двух подгрупп (рис. 3, а, в). По этой причине для этих клеток сначала был выполнен подбор кривых для подгрупп (*штриховые линии*), затем эти кривые (пики) были усреднены для получения

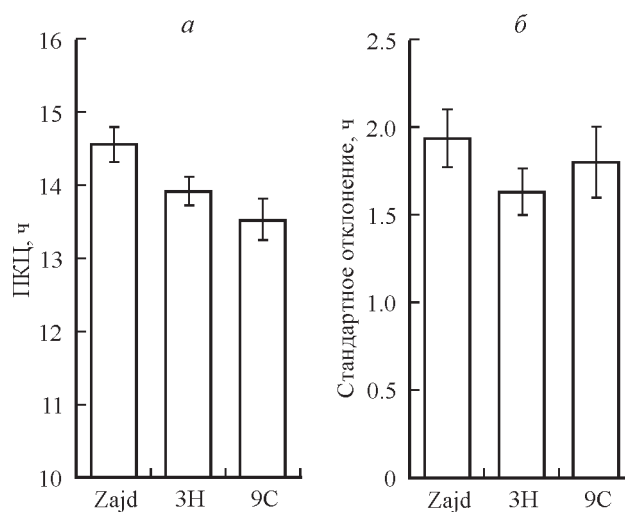


Рис. 2. Средние значения (а) и стандартные отклонения (б) продолжительности клеточного цикла у делящихся клеток монослойной культуры гепатомы Зайдела (Zajd) и ее сублиний 3Н и 9С.

Представлены средние значения (столбики) и их ошибки (вертикальные отрезки).

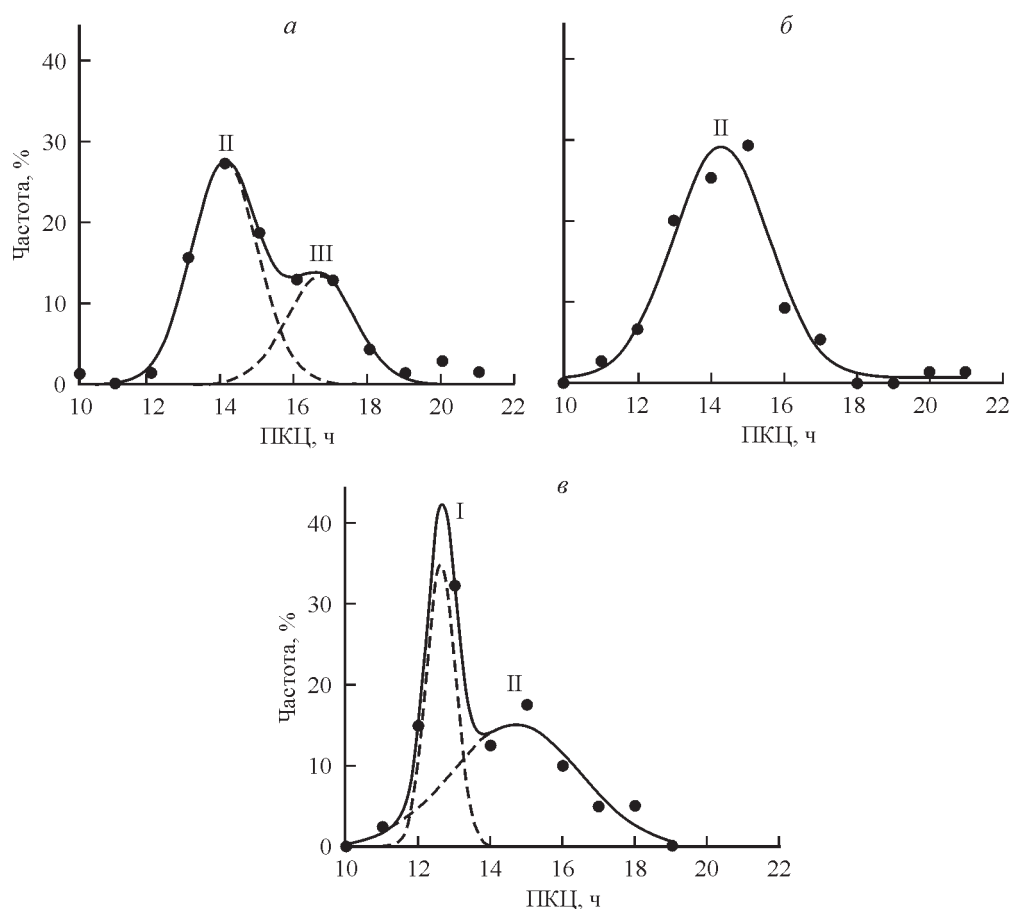


Рис. 3. Гистограммы распределения продолжительности клеточного цикла у делящихся клеток монослойной линии гепатомы Зайдела (*a*) и ее субклиний 3Н (*б*) и 9С (*в*).

Черные кружки — экспериментальные значения, сплошные линии — усредненные кривые распределения, штриховые линии — расчетные кривые (пики) нормального распределения. Римскими цифрами обозначены пики распределения. Объяснения см. в тексте.

суммарных кривых распределения ПКЦ (сплошные линии). В программе Origin имеется плагин, с помощью которого подбор кривых и их усреднение выполняются автоматически.

Рассчитанные пики нормального распределения имеют максимальные значения частот (фактически средние значения), которые можно использовать для количественной характеристики соответствующего распределения экспериментальных значений ПКЦ. В тех случаях, когда таких пиков оказывалось несколько (рис. 3, *a*, *в*), дополнительной характеристикой служила и доля клеток, относящихся к данному пику. Обе характеристики приведены на рис. 3. Полученные пики ранжировали по их величине от меньшей до большей, обозначив их I—III соответственно.

Таким образом, анализируя данные рис. 3, можно заметить, что у всех трех линий есть общая подгруппа клеток с пиком II (рис. 4, *a*), у которой средние значения ПКЦ равны приблизительно 14 ч (у клеток монослойной культуры Зайдела — 14.0 ± 0.1 , у клеток субклинции 3Н — 14.3 ± 0.2 и у клеток субклинции 9С — 14.7 ± 0.4 ч). Доля клеток, соответствующих пику II, составляла около 2/3 от общего числа клеток в монослойной культуре Зайдела и в субклинции 9С и все 100% — у субклинции 3Н (рис. 4, *б*). Около 1/3 клеток субклинции 9С, относящихся к пику I, имели относительно короткую ПКЦ — 12.6 ± 0.1 ч. Такая же доля (1/3) клеток линии Зайдела,

но с более длинной ПКЦ — 16.7 ± 0.2 ч — была отнесена к пику III.

Наличие значительной доли клеток с ПКЦ, близкой к 14 ч, — пика II в каждой из трех исследованных популяций — можно рассматривать как признак, указывающий на высокую степень их «родства». В то же время присутствие или отсутствие других пиков (I и III), напротив, указывает на индивидуальность этих линий, на наличие в них клеток с генетически (или эпигенетически) детерминированным различием по признаку ПКЦ. Это предположение может быть верным только при условии, что ПКЦ в гораздо большей степени детерминирована генетическими или эпигеномными факторами, чем условиями внешней среды. Косвенно подтвердить или опровергнуть это предположение можно следующим образом.

Если принять за основу, что дочерние клетки в случае симметричного деления, как пара «близнецов», должны быть идентичны по всем наследуемым признакам, в том числе и по ПКЦ, то степень генетической детерминации по этому признаку будет тем сильнее, чем меньше будет разность ПКЦ у пары клеток-близнецов. По сути такой подход аналогичен оценке степени конкордантности (совпадения признаков), известному в генетике как близнецовый метод. Зная величины ПКЦ данной пары дочерних клеток, можно оценить степень симметричности их деления по данному признаку. Поскольку абсолютные значения как самой ПКЦ, так и разности между ними мо-

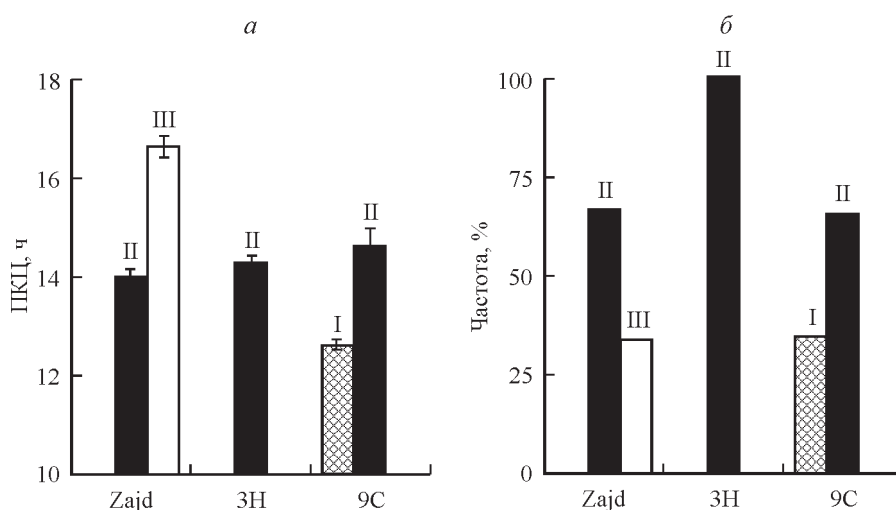


Рис. 4. Величины пиков, рассчитанные на основании экспериментальных значений (см. рис. 2) длительности клеточного цикла (а), и доля клеток, относящихся к соответствующему пику (б).

Заштрихованным столбиком показан пик I, соответствующий меньшей длительности клеточного цикла (у части клеток 9C), темными столбиками — пики II среднего по длительности цикла клеток каждой из трех популяций и светлым столбиком — пик III с наибольшей длительностью цикла у части клеток монослойной культуры Зайдела.

гут сильно варьировать в ряду таких пар клеток, надежнее воспользоваться относительной величиной. Для этого можно использовать различные подходы, но самым простым из них будет вычисление соотношения ПКЦ данной пары клеток. Удобнее разделить значение большей ПКЦ одной дочерней клетки на меньшее значение ПКЦ ее пары. В случае 100%-ного совпадения ПКЦ обеих клеток это соотношение будет равно 1. Чем сильнее (разумеется, в сторону повышения) оно будет отличаться от 1, тем в меньшей степени будет проявляться генетическая детерминация ПКЦ у данной пары дочерних клеток.

Обобщая, можно полагать, что данный подход для оценки степени симметричности клеточного деления, по-видимому, применим к любому количественному клеточному параметру пары дочерних клеток. По этой причине соотношения такого типа можно называть «коэффициент симметричности деления» (КСД), добавляя к нему, по какому именно клеточному параметру. В данном случае это будет «коэффициент симметричности деления по

параметру ПКЦ» (КСД по ПКЦ). Поскольку при высокой степени симметрии этот коэффициент не будет сильно отличаться от 1, лучше использовать его логарифм (к тому же и отсчет будет идти от 0).

Итак, во всех выборках исследуемых клеток отбираем только пары дочерних и вычисляем для каждой из них значения натурального логарифма КСД по ПКЦ. Рассчитываем его средние значения для каждой выборки клеток исследуемых линий: Зайдела — 0.103 ± 0.017 , 9C — 0.084 ± 0.022 , 3H — 0.072 ± 0.016 . Поскольку достоверных различий между этими значениями не выявляется, все выборки объединяем в одну и строим гистограмму распределения данного параметра в зависимости от числа пар дочерних клеток с тем или иным КСД по ПКЦ (рис. 5, а). По экспериментальным точкам (черные кружки) подбираем наиболее подходящее теоретическое распределение. Наилучшее соответствие дает экспонента $R^2 = 0.98$. Это как раз подтверждает выдвинутый выше тезис: чем ближе значения ПКЦ у дочерних клеток, тем

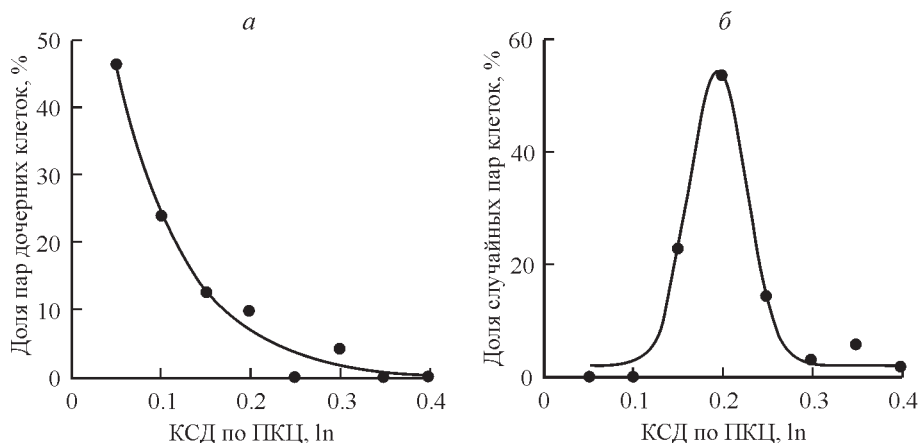


Рис. 5. Гистограммы распределения, иллюстрирующие взаимосвязь между количеством пар дочерних клеток (а) или количеством пар случайно отобранных клеток (б) и коэффициентом симметричности деления (КСД) по ПКЦ соответствующих клеточных пар.

В обоих случаях использована одна и та же выборка клеток. Черные кружки — экспериментальные значения, сплошные линии — расчетные экспонента (а) и нормальное распределение (б). В обоих случаях коэффициент детерминации R^2 равен 0.98. Объяснения см. в тексте.

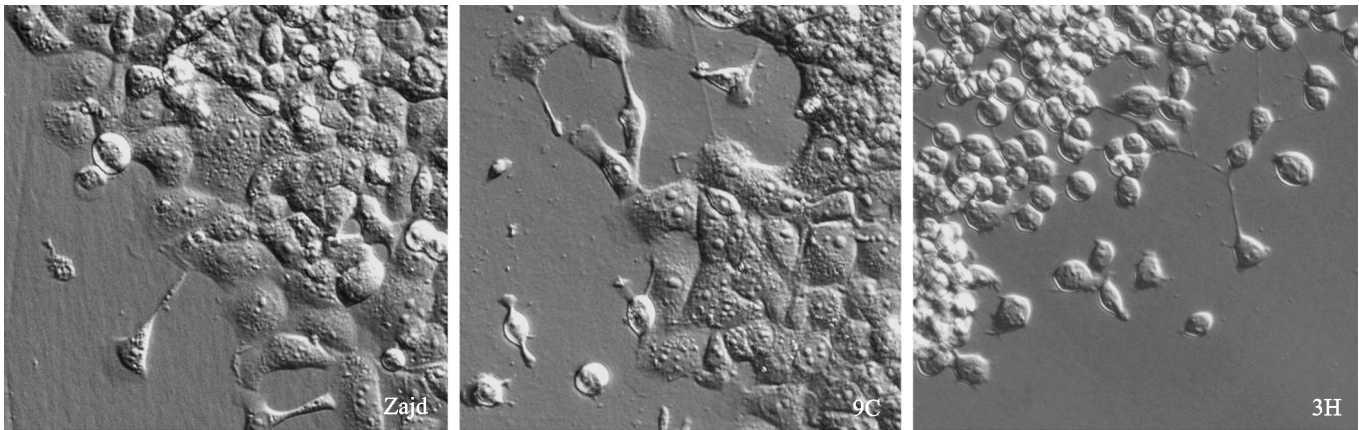


Рис. 6. Общий вид клеток монослойной линии гепатомы Зайдела (Zajd) и ее сублиний 9С и 3Н. Световая микроскопия. Представлены выполненные в одном масштабе фрагменты полей зрения по краям экспериментальной «раны» после ее нанесения. Об. 10×.

вероятнее отсутствие различий в их геномах; чем больше разница в значениях ПКЦ у дочерних клеток, тем вероятнее появление различий в их геномах или воздействий эпигеномных факторов.

Однако это утверждение будет надежнее при условии, что выборка из пар любых случайно отобранных клеток будет описываться не экспоненциальной зависимостью, а иметь вид, близкий к обычному нормальному распределению. Такой результат будет означать, что между случайно отобранными парами клеток нет близкого «родства» по ПКЦ. Для этого воспользуемся той же выборкой дочерних клеток, но случайным образом сгруппируем новые пары этих клеток по ПКЦ. Далее строим гистограмму и подбираем подходящее распределение. Результат представлен на рис. 5, б. Коэффициент детерминации в данном случае тот же (0.98), но наибольшая аппроксимация по экспериментальным точкам — нормальное распределение.

Возможность мониторинга отдельно взятой клетки при использовании цейтраферной видеосъемки позволяет не только напрямую измерить ПКЦ, но и проследить за динамикой изменения формы этой клетки в период от одного деления до другого. Это отличительная особенность такого подхода, поскольку, например обычными методами, площадь клетки оценивают, как правило, только в одной временной точке, измеряя ее среднее значение в пределах подходящей клеточной выборки. Более того, зная ПКЦ данной клетки и, например, ее размеры, можно проверить, существует ли связь между этими параметрами.

Форму клеток в исследуемых линиях визуально можно оценить по фрагментам полей зрения в области края «раны», представленным на рис. 6.

Прежде чем перейти к анализу формы клеток после их деления, необходимо сделать несколько пояснительных замечаний. Очевидно, что сразу после деления любые дочерние клетки имеют шаровидную форму, поэтому их площадь проекции на подложку всегда имеет форму круга. Клетке необходимо некоторое время, чтобы от этой неспецифической формы перейти к специфической, связанной с ее расплыванием на подложке. С другой стороны, когда клетка начинает готовиться к делению, ее распластанная форма опять стремится к форме круга. Время наступления этого процесса определяется индивидуальной ПКЦ данной клетки. Именно по этим причинам мы анализировали форму каждой данной клетки начиная

с 50-го изображения после деления ее материнской клетки на протяжении 3 ч.

Чтобы проверить, существует ли связь между формой клетки и ее ПКЦ, были использованы не все клетки, а только те, которые полярно различались по ПКЦ. Для этого были рассмотрены две клеточные группы (1 и 2) в каждой из популяций (исходной Зайдела, 3Н и 9С). В первую из них отобрали клетки с ПКЦ менее 13 ч, во вторую — с ПКЦ более 16 ч. Этот выбор проводили не случайно, а исходя из данных, представленных на рис. 3. Как можно заметить (см. ход *итриховых линий*), в 1-ю группу должны попасть только те клетки монослойной линии гепатомы Зайдела, которые относятся к пику II, а во вторую — только к пику III. Для клеток обеих сублиний такого четкого разделения, к сожалению, нет. Тем не менее в 1-ю группу попадают все клетки пика I сублинии 9С, но с «примесью» клеток пика II (судя по *итриховым кривым*, их количество должно быть не менее 1/3). Поскольку клетки сублинии 3Н не имеют выраженного разделения на субпопуляции и поэтому все отнесены к пику II, можно говорить о том, что в этом случае в 1-ю группу вошли клетки пика II предпочтительно с короткой ПКЦ, а во 2-ю — предпочтительно с длинной ПКЦ. Таким образом, исключив из выборок клетки с промежуточными значениями ПКЦ, можно сопоставить клетки 1-й и 2-й групп с более отчетливыми различиями в ПКЦ.

На рис. 7, а представлены средние значения площади клеток после митоза в зависимости как от принадлежности к линиям (Z, 9С, 3Н), так и к группам по ПКЦ (с короткой и длинной ПКЦ). Первое, что можно отметить, отчетливое достоверное различие по величине площади клеток в зависимости от принадлежности их к той или иной популяции. В среднем площадь клеток сублинии 9С приблизительно на 20—25 % больше, чем клеток исходной линии Зайдела, и раза в 3 больше, чем клеток сублинии 3Н.

Связь между площадью клетки и ее ПКЦ оказывалась не столь очевидной и однозначной. Различия по площади у 1-й и 2-й подгрупп клеток Зайдела (Z_1 и Z_2) были велики (1974 ± 35 и 1791 ± 79 пикселей соответственно), но достоверны ($P < 0.05$). Можно сказать, что клетки этой линии с более длительной ПКЦ в начальный период расплывания по субстрату (от 1.7 до 4.7 ч после завершения митоза) имели меньшую площадь, чем клетки с более короткой ПКЦ. В то же время связи между площа-

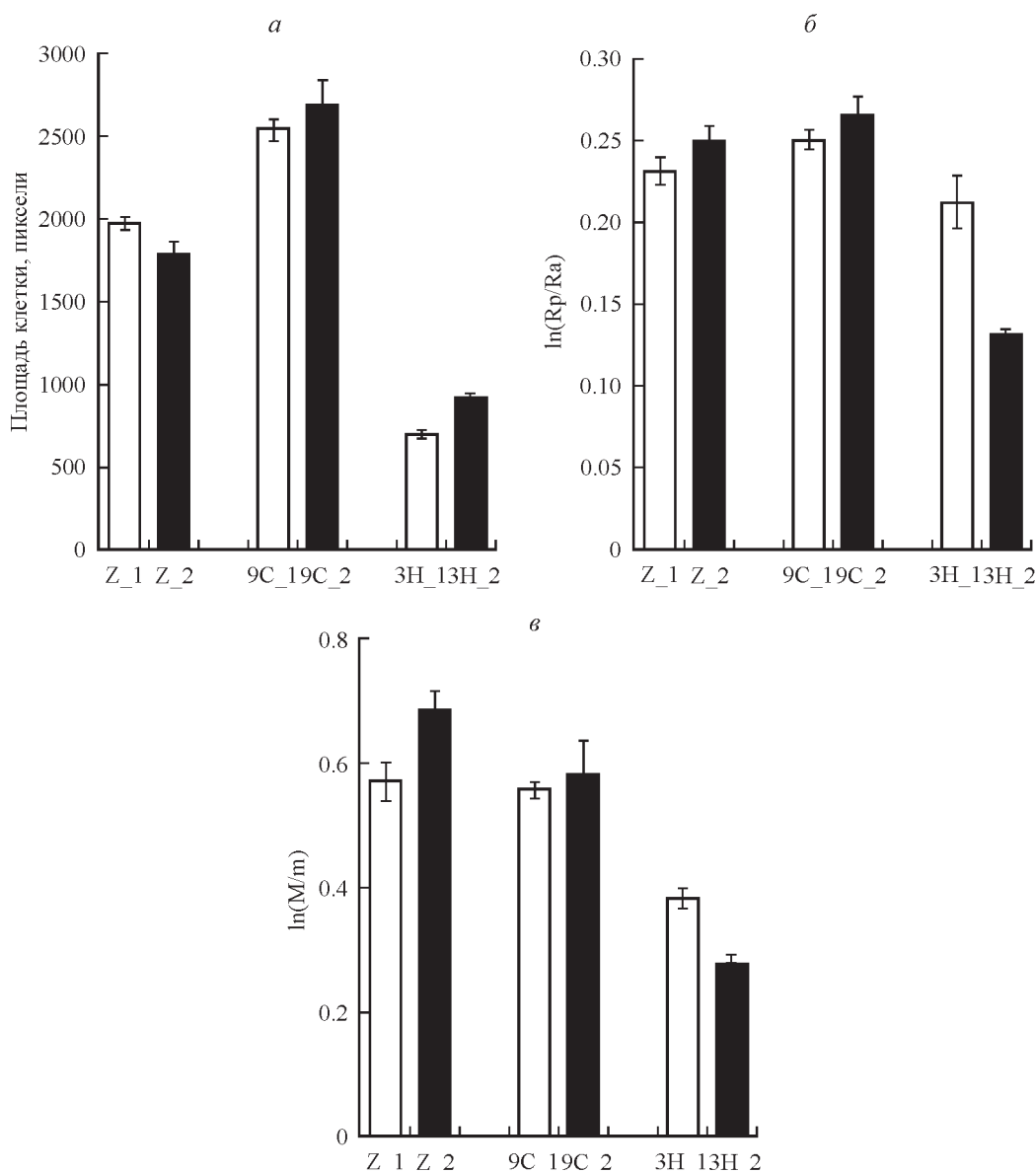


Рис. 7. Зависимость площади (а), коэффициентов распластывания (б) и поляризации (в) клеток от принадлежности к линии Зайдела и к ее сублиниям 9С и 3Н с короткой и с длинной продолжительностью клеточного цикла.

По горизонтали — подгруппы клеток с короткой (1, менее 13 ч) и длинной (2, более 16 ч) ПКЦ в линии Зайдела (Z_1 и Z_2 соответственно), сублинии 9С (9С_1, 9С_2) и 3Н (3Н_1, 3Н_2); по вертикали — значения нормального логарифма коэффициента распластывания. Представлены средние значения (столбики) и их ошибки (вертикальные отрезки). Объяснения см. в тексте.

дью клеток сублинии 9С и длиной их ПКЦ не отмечалось даже на уровне тенденции. Наиболее выраженные различия по площади между клетками 1-й и 2-й подгрупп имела сублиния 3Н — 703 ± 17 и 922 ± 10 пикселей ($P < 0.01$), что указывает на наличие отчетливой зависимости между площадью проекции на подложку и ПКЦ у клеток этой сублинии.

Данные по коэффициенту распластывания представлены на рис. 7, б. При относительно одинаковой степени распластывания клеток Зайдела и 9С одновременное увеличение их $\ln(Rp/Ra)$ и ПКЦ можно отметить в лучшем случае на уровне тенденции. В противоположность этим клеткам у клеток сублинии 3Н обнаруживалась не только меньшая степень распластывания клеток с ПКЦ более 16 ч, но и выраженная обратная зависимость между этими двумя параметрами ($P < 0.01$). У клеток с длинным

ПКЦ наблюдалось уменьшение коэффициента распластывания приблизительно в 1.5 раза.

Средние значения коэффициента поляризации для клеток исследуемых линий демонстрирует рис. 7, в. Как и в случае с коэффициентом распластывания, в среднем величина коэффициента поляризации была выше у клеток Зайдела и 9С (преимущественно эпителиоподобных), чем у клеток 3Н (преимущественно фибробластоподобных). Зависимости между этим коэффициентом и ПКЦ у клеток 9С не обнаруживалось, в то время как у клеток монослойной линии гепатомы и 3Н такая зависимость выявлялась, но была разнонаправленной. Более вытянутые клетки родительской линии Зайдела имели более продолжительный клеточный цикл ($P < 0.05$), а у фибробластоподобных клеток 3Н зависимость была противоположной ($P < 0.01$).

Обсуждение

Прежде чем приступить к обсуждению полученных данных, заметим, что их следует рассматривать с разных сторон. С одной стороны, полученные результаты — это вклад в изучение биологии клеток в культуре в целом, а с другой — это характеристика опухолевых клеток с использованием количественных параметров, отражающих особенности этих клеток при культивировании *in vitro*.

Ранее на клетках L-929 (постоянная линия NCTC клон 929, мышь) мы показали, используя цейтраферную видеосъемку, что ПКЦ этих клеток равна 15.8 ± 0.1 ч со стандартным отклонением 1.5 ± 0.1 ч, т. е. не превышающим 10 % от среднего значения (Петров и др., 2012). Доля таких клеток в популяции составляла не менее 97 %. Все это указывало на очень высокую степень однородности линии по данному параметру. В настоящей работе относительная однородность (т. е. отсутствие отчетливых пиков на гистограмме) по ПКЦ была обнаружена только у клеток 3Н (13.9 ± 0.2 ч). В то же время клетки Зайдела и 9С состояли из двух субпопуляций, одна из которых (пик II) по ПКЦ формально была общей для всех трех линий (ПКЦ около 14 ч), а количество принадлежащих к ней клеток составляло не менее 2/3 от общего числа клеток данной популяции.

Несмотря на эти различия, клетки L-929 и Зайдела имеют, как нам представляется, и общее. ПКЦ у них короче, чем у клеток в составе многоклеточного организма (обычно она лежит в пределах 20—24 ч), в частности у нормальных гепатоцитов в период роста крысы ПКЦ равна 21.5 ч (Post, Huang, 1963). Одно из отличий роста клеток *in vitro* от их пролиферации *in vivo* — пассирование, т. е. искусственный процесс, при котором в новый культуральный сосуд из старого пересевается небольшая часть клеток. После каждого посева численность клеток должна восстановиться согласно S-образной зависимости. Это общее правило роста клеток в культуре. Нетрудно представить, что при прочих равных условиях в процессе пассирования преимущества будут получать клетки с более короткой ПКЦ. Клетки с длинной ПКЦ или неделящиеся будут элиминироваться при посевах. Следовательно, можно полагать, что в какой-то равновесной точке вся клеточная популяция с большой долей вероятности в конечном счете будет состоять из клеток с относительно короткой ПКЦ. По-видимому, именно так можно объяснить выраженную однородность постоянной линии L-клеток по ПКЦ.

Если это предположение верно, то наличие двух пиков ПКЦ у клеток Зайдела можно рассматривать как признак не полностью установившейся линии. Однако, как было сказано, такой исход возможен лишь при прочих равных условиях. Если же наличие двух пиков — постоянный признак данной популяции, то клетки с более длинной ПКЦ в процессе роста культуры должны иметь какие-то иные преимущества по сравнению с клетками, имеющими короткую ПКЦ. Насколько верно это предположение, покажут дальнейшие наблюдения за клетками линии Зайдела и ее сублиний; пока количество пассажей этих сублиний невелико (порядка 30).

По существующим представлениям, прохождение клетки по стадиям клеточного цикла достаточно жестко контролируется геномом (Hartwell, Kastan, 1994). В исследуемых нами линиях клеток, полученных из гепатомы Зайдела, наличие такого контроля по крайней мере в отношении ПКЦ подтверждается как закономерностями,

представленными на рис. 5, а, б, так и полученными нами ранее (Петров и др., 2012). Независимо от принадлежности клеток к той или иной линии (монослойной линии Зайдела, 9С, 3Н или L-929) у пары дочерних клеток различие по ПКЦ всегда меньше, чем у любой иной пары случайно отобранных клеток. О степени различия ПКЦ у пары дочерних клеток можно судить по предложенному нами в настоящей работе коэффициенту симметричности деления (КСД). Чем ниже его величина, тем более симметрично деление материнской клетки, т. е. больше сходства ее дочерних клеток по исследуемому признаку, в данном случае по ПКЦ. Эта связь описывается экспоненциальной зависимостью. По-видимому, можно утверждать, что такая закономерность характерна для культивируемых *in vitro* клеток.

В настоящей работе на примере клеток гепатомы Зайдела впервые показана связь ПКЦ с параметрами, характеризующими форму культивируемых клеток (площадь клетки, коэффициенты ее расплывания и поляризации). Не исключено, что наличие такой связи — тоже одна из общих закономерностей, специфичных для клеток в культуре. Так это или нет, покажут дальнейшие исследования.

Начиная с работы, в которой исследовали клонирование кератиноцитов (Barrandon, Green, 1987), образующиеся при этом три типа колоний стали обозначать терминами голо-, меро- и параклоны. Они различались как по морфологии, так и по пролиферативному потенциалу входящих в них клеток. Термины оказались востребованными еще и потому, что подобные колонии формировались и при клонировании опухолевых клеток, причем способность образовывать голоклоны, содержащие самообновляющиеся опухолеиницирующие клетки с высоким пролиферативным потенциалом, стали использовать в качестве теста для выявления опухолевых стволовых клеток (Tan et al., 2011). Согласно этой классификации, по особенностям роста полученные нами из монослойной линии гепатомы Зайдела клетки сублиний 3Н и 9С можно отнести к голо- и мероклонам соответственно. Это означает, что туморогенный эффект должен быть выше у клеток 3Н по сравнению с клетками 9С, что и было подтверждено нами на крысах при введении этих клеток в брюшную полость (Терюкова и др., 2016).

Не исключено, что более высокая туморогенность клеток 3Н связана с тем, что все ее клетки по параметру ПКЦ входят в группу, обозначенную нами как пик II, а сублиния 9С лишь на 2/3 состоит из клеток, относящихся к пику II. Однако такой вариант если и возможен, то, по-видимому, маловероятен. Несмотря на то что по параметру ПКЦ эти сублинии в определенной степени различаются (на 1/3), наибольшие и принципиальные их различия связаны, скорее всего, с формой клеток. Даже визуально (см. рис. 6) различие в морфологии клеток очевидно. Это субъективное восприятие подкрепляется расчетными данными. Несмотря на то что клетки сублинии 3Н соответственно в 2 и в 3 раза меньше клеток 9С и исходной линии Зайдела, именно у клеток 3Н отчетливо выявляется связь между ПКЦ и параметрами, характеризующими форму клеток (см. рис. 7). Не исключено, что к таким различиям внутри популяции клеток 3Н, проявляющимся при культивировании, может прибавиться различие в их туморогенности при имплантации животным. Такие данные могут быть получены в будущем, если удастся популяцию этих клеток разделить, например при повторном клонировании, на субпопуляции клеток, максимально различающиеся по площади и коэффициентам расплывания и поляризации.

В целом полученные результаты расширяют наши представления о существующих различиях между фибробластоподобными клетками, происходящими из голоклонов (сублинии 3H), и преимущественно эпителиоподобными клетками двух монослойных линий — родительской монослойной линии гепатомы Зайдела и ее мероклональной сублинии 9C (Терюкова и др., 2016). Новые данные позволяют точнее характеризовать субпопуляцию ОСК данной опухоли и селективировать их от опухолевых прогениторных клеток.

Авторы выражают искреннюю признательность Ю. А. Негуляеву за неоценимую помощь при выполнении прижизненной микроскопии клеточных линий.

Список литературы

- Петров Ю. П., Негуляев Ю. А., Цупкина Н. В. 2012. Анализ продолжительности клеточного цикла клеток постоянной линии L-929. Цитология. 54 (3) : 214—217. (Petrov Yu. P., Negulyaev Yu. A., Tsupkina N. V. 2012. Analysis of the cell cycle duration of cells of permanent line L-929. Tsitologiya (Russian). 54 (3) : 214—217.)
- Петров Ю. П., Цупкина Н. В. 2016. Морфологические особенности клеток линии NCTC клон 929 через 1 сут после посева. Цитология. 58 (1) : 35—43. (Petrov Yu. P., Tsupkina N. V. 2016. Morphology of NCTC cells one days after reseeding. Tsitologiya (Russian). 58 (1) : 35—43.)
- Терюкова Н. П., Блинова Г. И., Иванов В. А. 2013. Клетки гепатомы Зайдела при культивировании *in vitro*. Цитология. 55 (1) : 36—44. (Teryukova N. P., Blinova G. I., Ivanov V. A. 2013. Zajdela hepatoma cells cultured *in vitro*. Tsitologiya (Russian). 55 (1) : 36—44.)
- Терюкова Н. П., Воронкина И. В., Смагина Л. В., Иванов В. А. 2015. Клетки гепатомы Зайдела в культуре: клонирование и характеристика клональных линий. Клеточные культуры. Информ. бюл. 31 : 25—37. (Teryukova N. P., Voronkina I. V., Smagina L. V., Ivanov V. A. 2015. Zajdela hepatoma cells in culture: cloning and characterization of clonal lines. Cell Culture. Inform. Bull. 31 : 25—37.)
- Терюкова Н. П., Сахенберг Е. И., Иванов В. А., Снопов С. А. 2016. Получение и характеристика клональных линий монослойной гепатомы Зайдела с признаками опухолевых стволовых и прогениторных клеток. Цитология. 58 (11) : 832—842. (Teryukova N. P., Sakhenberg E. I., Ivanov V. A., Snopov S. A. 2016. Establishment and characterisation of monolayer hepatoma Zajdela clonal lines with signs of cancer stem cells and progenitor cells. Tsitologiya (Russian). 58 (11) : 832—842.)
- Barrandon Y., Green H. 1987. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 84 : 2302—2306.
- Hartwell L. H., Kastan M. B. 1994. Cell cycle control and cancer. Science. 266 : 1821—1828.
- 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.
- Li H., Chen X., Calhoun-Davis T., Claypool K., Tang D. G. 2008. PC3 human prostate carcinoma cell holoclones contain self-renewing tumor-initiating cells. Cancer Res. 68 : 1820—1825.
- Locke M., Heywood M., Fawell S., Mackenzie I. C. 2005. Retention of intrinsic stem cell hierarchies in carcinoma-derived cell lines. Cancer Res. 65 : 8944—8950.
- Maenhaut C., Dumont J. E., Roger P. P., van Staveren W. C. 2010. Cancer stem cells: a reality, a myth, a fuzzy concept or a misnomer? An analysis. Carcinogenesis. 31 : 149—158.
- Post J., Huang C.-Y. 1963. The replication time and pattern of the liver cells in the growing rat. J. Cell Biol. 18 : 1—12.
- Tan L., Sui X., Deng H., Ding M. 2011. Holoclone forming cells from pancreatic cancer cells enrich tumor initiating cells and represent a novel model for study of cancer stem cells. PLoS ONE. 6(8) : e23383.
- Visvader J. E., Lindeman G. J. 2008. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. Nat. Rev. Cancer. 8 : 755—768.

Поступила 1 VI 2016

COMPARISON OF CELL CYCLE DURATION IN THE MONOLAYER CELL LINE OF HEPATOMA ZAJDELA AND ITS SUBLINES 3H AND 9C CULTIVATED *IN VITRO*

Yu. P. Petrov,¹ N. P. Teryukova,¹ E. I. Sahenberg, V. A. Ivanov, S. A. Snopov¹

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;

¹ e-mail: yupe3ov@mail.ru, npter@yandex.ru, snopov@hotmail.com

We studied proliferative features of cells in monolayer line of rat hepatoma Zajdela (the original, parent line) and in the sublines 3H and 9C cloned from different types of the colonies of the parental line. These sublines also differed by cytometric parameters, by the types of colonies formed at recloning of these cells *in vitro*, and by tumorigenicity at transplantation to a rat. Using a time-lapse video of native living cells, we analyzed the cell cycle duration (CCD) and its relationship to a cell shape. Direct measurement of the CCD (a time period from mitosis to mitosis) was performed in individual cells of non-synchronized cultures. Average value of CCD in the parent Zajdela line appeared to be 14.6 ± 0.2 hours, that was higher (at $P < 0.05$) than in 3H and 9C sublines (13.9 ± 0.2 and 13.5 ± 0.3 hours, respectively). The analysis of CCD distribution histogram showed that all three lines contained a common population of cells with CCD close to 14 hours. Besides, the parent cell line had about 1/3 of cells with a higher CCD (16.7 ± 0.2 hours) while the subline 9C had, on the contrary, 1/3 of cells with a lower CCD (12.6 ± 0.1 hours). In addition, the parameters of cell area, coefficient of cell spreading and coefficient of cell polarization showed the highest correlation to CCD in cells of subline 3H, which are primarily fibroblast-shaped cells ($P < 0.01$): the larger the cell area, the longer the CCD; the more flattened or polarized the cell is, the shorter its CCD. In the parental cell line and the subline 9C, both consisting of preferably epithelium-shaped cells, the correlation between CCD and cell shape was less pronounced and showed the opposite direction, that may be explained by a difference in the origin of the cell lines. When considering the differences of CCD in the pairs of daughter cells, we introduce the concept of «the coefficient of symmetry of a cell division». The lower its value, the greater the similarity of CCD in a pair of daughter cells. Possible connection of the cell parameters studied *in vitro* to the tumorigenicity of these cells is discussed.

Key words: cell cycle, cell shape, division, symmetry, holoclone, meroclone, tumorigenicity.