

ПОВЕДЕНИЕ КЛЕТОК МОНОСЛОЙНОЙ ЛИНИИ ГЕПАТОМЫ ЗАЙДЕЛА В ОБЛАСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ РАНЫ

© Ю. П. Петров, Н. П. Терюкова, С. А. Снопов*

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;

** электронный адрес: snopov@hotmail.com*

Многие длительно культивируемые линии клеток млекопитающих, как правило, имеют либо эпителиоподобную форму, либо фибробластоподобную. Полученная нами ранее из асцитной культуры монослойная линия гепатомы Зайдела в своем составе содержит клетки обоих типов, генетически родственных, но фенотипически различных. Это позволило в настоящей работе сравнить поведение клеток обоих типов при их миграции в свободное пространство экспериментальной «раны» в одних и тех же условиях культивирования. Были исследованы следующие параметры: динамика численности клеток в этом пространстве, площадь проекции клеток на подложку, коэффициент их расплывания, скорость миграции и предложенный нами параметр W — степень эффективности миграции. Он характеризует активность заполнения раны клетками. Обнаружили, что заполнение свободного пространства (раны) сначала идет преимущественно за счет миграции клеток (1-й этап) и увеличения их площади проекции на подложку, затем (приблизительно через 9—10 ч) к этим процессам активно подключается клеточное деление (2-й этап). По параметру W эпителиоподобные клетки приблизительно в 1.5 раза эффективнее закрывают рану, чем фибробластоподобные клетки, движение которых в большей степени сходно с броуновским; в то же время средняя скорость передвижения эпителиоподобных клеток примерно в 2 раза ниже, чем у фибробластоподобных. Сразу после закрытия рана заполнена клетками большего размера, чем вне ее. Мы полагаем, что такое увеличение площади клеток преходяще, т. е. связано с изменением их функционального состояния во время миграции в свободное пространство раны.

Ключевые слова: гепатома, фибробласто- и эпителиоподобные клетки, клетки в культуре, миграция клеток, пролиферация, форма клетки.

Несмотря на то что метод изучения клеток в условиях *in vitro* имеет вековую историю, лишь в последние десятилетия он получил широкое распространение в связи с развитием клеточных технологий (Kohn, 2017; Lin et al., 2017; Yang, Chian, 2017). Перевод клеток из организма в культуру, как можно полагать даже *a priori*, в процессе адаптации к новым условиям существования должен инициировать у них изменение морфофункциональных параметров. Таким образом, возрастает необходимость более глубокого изучения биологии клеток в культуре.

Как известно, при длительном культивировании, в процессе которого соматические клетки становятся постоянными линиями, приобретая устойчивые морфофункциональные параметры, их форма, как правило, имеет либо эпителиоподобный тип (например, клетки линии HeLa), либо фибробластоподобный (например, клетки линии L-929). Надо полагать, что в условиях культуры такая тенденция соматических клеток млекопитающих к становлению той или иной формы не случайна. Однако ее причины в настоящее время неизвестны. В связи с этим изучение особенностей поведения *in vitro* популяций, в которых сосуществуют клетки обеих форм, имеет важное значение. Ранее нами из асцитной гепатомы Зайдела была получена культура монослойных клеток (Терюкова и др., 2013). Особенностью этой клеточной культуры оказалось

наличие в одной и той же популяции как эпителио-, так и фибробластоподобных клеток.

Таким образом, в настоящей работе была поставлена следующая задача: изучить поведение в культуре клеток гепатомы Зайдела двух различных морфологических типов, принадлежащих к одной и той же популяции, в частности сравнить динамику изменения некоторых морфофункциональных параметров этих типов клеток при заполнении ими свободного пространства экспериментальной раны монослоя.

Материал и методика

Работа выполнена на клетках монослойной культуры гепатомы Зайдела крыс, полученных нами ранее (Терюкова и др., 2013). Клетки культивировали в полной ростовой среде DMEM (Биолот, Россия), содержащей 10 % сыворотки плодов коровы Sus-Biol (Биолот, Россия) и 20 мкг/мл гентамицина (Биолот, Россия), в атмосфере 5 % CO_2 при 37 °С.

Выращивали клетки в пластиковых чашках Петри (Orange Scientific, Бельгия) диаметром 35 мм до достижения монослоем 80—90%-ной конфлюэнтности. Затем с помощью пластикового носика автоматического дозатора наносили экспериментальную рану. После этого чашку

помещали на столик микроскопа AxioObserver.Z1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Германия), оборудованного устройствами для долговременного прижизненного наблюдения за клетками (поддержание оптимальных температуры, влажности и концентрации CO_2). Регистрацию изображений проводили в течение 20—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 поддерживались автоматически программой AxioVision 4.8.2 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Германия). Были получены видеоролики 4 полей зрения. Изображения клеток записывали в формате JPEG. Для анализа динамики закрытия раны и измерения морфометрических параметров клеток в одних случаях использовали каждое 10-е, в других — каждое 50-е изображение одного и того же поля зрения, начиная с 1-го изображения вплоть до конца видеоролика, т. е. в течение примерно 22 ч.

Измерения площади проекции клеток на подложку (площадь клетки), их коэффициента расплывания R_p/R_a , а также фиксирование координат (x и y) локализации клеток в поле зрения выполняли с помощью программы ImageJ 1.48v (Rasband, W.S., ImageJ, 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 R_p/R_a был предложен нами ранее для морфометрии культивируемых клеток (Kuz'minykh, Petrov, 2004). Он равен отношению 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. 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 R_p/R_a связано с длиной и количеством филоподий). Для сравнительного анализа удобнее использовать величину натурального логарифма этого коэффициента — $\ln(R_p/R_a)$, поскольку отсчет идет от нуля и шкала становится более равномерной.

В настоящей работе мы вводим новый параметр для характеристик миграционных потенциалов клетки при закрытии экспериментальной раны — степень эффективности миграции клетки W . Он численно равен отношению отрезка l (по прямой от начальной точки локализации клетки в момент времени t_0 до ее конечной точки в момент времени t_n) ко всему пути L движения данной клетки за период от t_0 до t_n . Иными словами, $W = l/L$. Более детально об этом параметре будет сказано в разделе «Результаты».

Расчеты среднего значения, стандартного отклонения и построение 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 8 (OriginLab Corporation, США). О степени вероятности аппроксимации расчетных значений к экспериментальным судили по коэффициенту детерминации R^2 , рассчитывае-

мому автоматически при получении линий тренда программами Excel 2010 и Origin 8. 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 данная последовательность экспериментальных значений описывается уравнением данной расчетной кривой.

Результаты

Общее представление о заполнении клетками монослойной линии Зайдела пространства экспериментальной раны дает рис. 1, на котором в одном и том же поле зрения можно видеть расположение клеток во время наблюдения на сроках 0, 5.5, 11, 16.5 и 22 ч после нанесения раны. На рис. 1 контуром выделены отобранные нами (произвольно) две группы клеток — эпителиоподобного (a, b) и фибробластоподобного ($в, z$) типов. Отбор клеток в группы был субъективен и основан на визуальном различии их формы и степени подвижности (фибробластоподобные клетки в отличие от эпителиоподобных активно образуют филоподии и более подвижны). Заметим сразу, что увеличение числа отмеченных клеток на поздних сроках связано с появлением их дочерних (и даже внучатых) потомков.

Как показывает визуальный анализ, в начале наблюдения отобранная группа эпителиоподобных клеток находится у самого края раны, при этом клетки плотно расположены относительно друг друга, образуя часть единого пласта. По мере закрытия раны вся группа этих клеток перемещается к центру вместе с другими соседними клетками. Следует обратить внимание, что исследуемая группа клеток постепенно перестает быть единым пластом, поэтому в конце наблюдения они (и их потомки) достаточно разобщены.

Отобранные нами для анализа фибробластоподобные клетки в начале наблюдения находятся в свободном пространстве раны, не образуя единого пласта. Эти клетки подвижны, постоянно меняют свою локализацию. Тем не менее в конце наблюдения, оставаясь относительно разобщенными, они оказываются в центре экспериментальной раны. Мы анализировали поведение клеток — как отобранных нами изначально, так и их потомков.

Миграция и пролиферация — основные составляющие двухэтапного процесса заполнения «раны» клетками (1). Чтобы проследить динамику закрытия раны вследствие роста в ней числа клеток, мы условно разделили пространство раны на несколько секторов. Это важно, поскольку направленная миграция клеток создает численный градиент от краев раны до ее центральной части. Чтобы рассчитать зависимость степени закрытия раны от этого градиента, изображения были разделены (условно) на секторы (полосы) шириной по 70 пикселей параллельно центральной оси раны (рис. 2). Для удобства подсчета клеток в автоматическом режиме каждую из них по центру помечали точкой. Затем подсчитывали число точек в каждом секторе (полоске).

Таким способом анализировали изображения одного поля зрения через каждые 20 мин, т. е. всего было использовано больше 60 изображений. Однако усреднять число клеток в соответствующих секторах, используя все изображения, не совсем корректно, поскольку в пер-

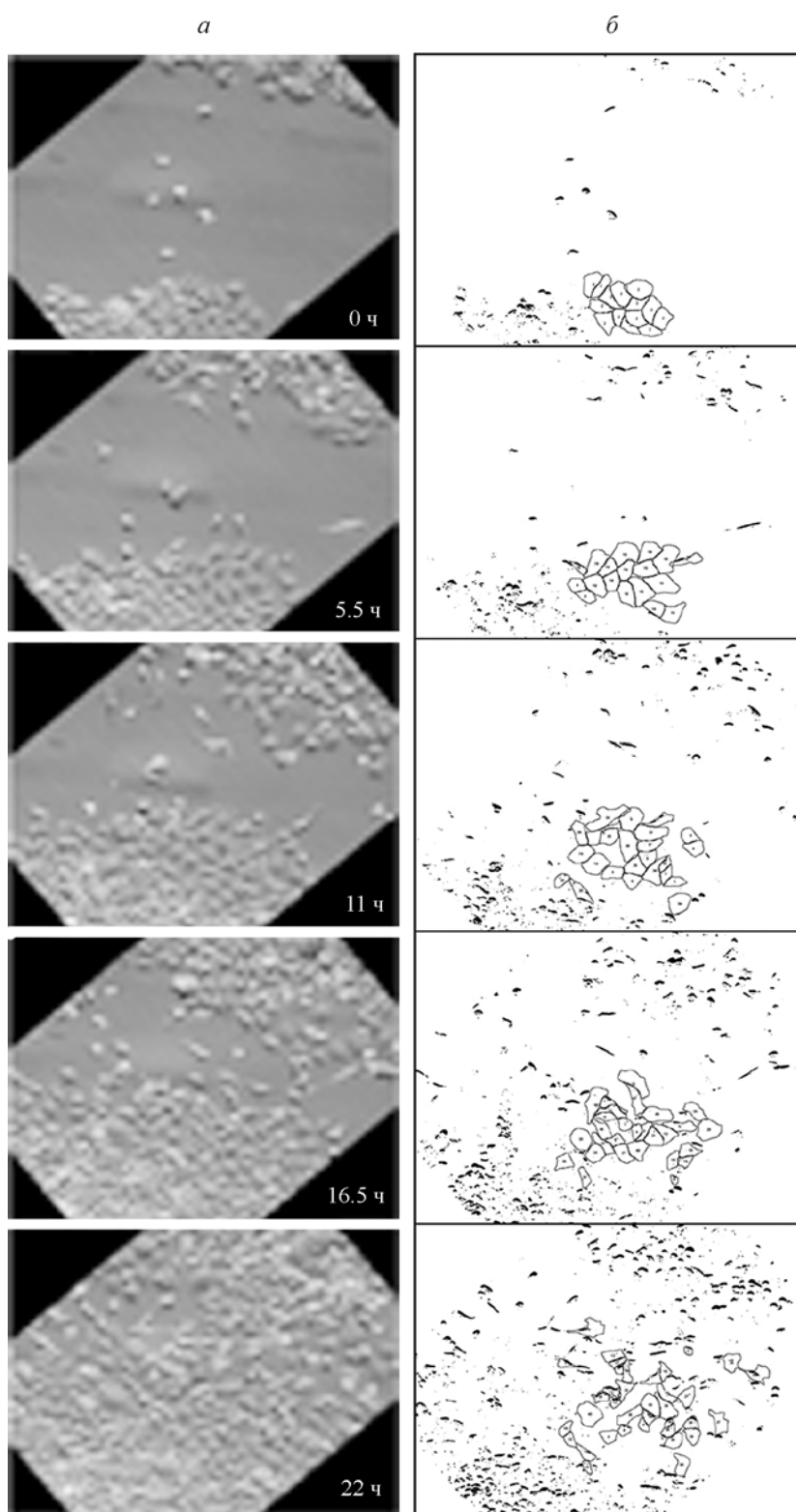


Рис. 1. Динамика заполнения экспериментальной раны монослоя клеток линии Зайдела в течение 22 ч.

Изображения получены через 0, 5.5, 11, 16.5 и 22 ч. На одних и тех же последовательно снятых оригинальных изображениях контуром обведены изученные эпителиоподобные (а, б) и фибробластоподобные (в, г) клетки. Рядом *справа* соответственно представлены штриховые изображения тех же полей зрения с оконтуренными клетками. Поля изображения повернуты так, чтобы ось раны была горизонтальной.

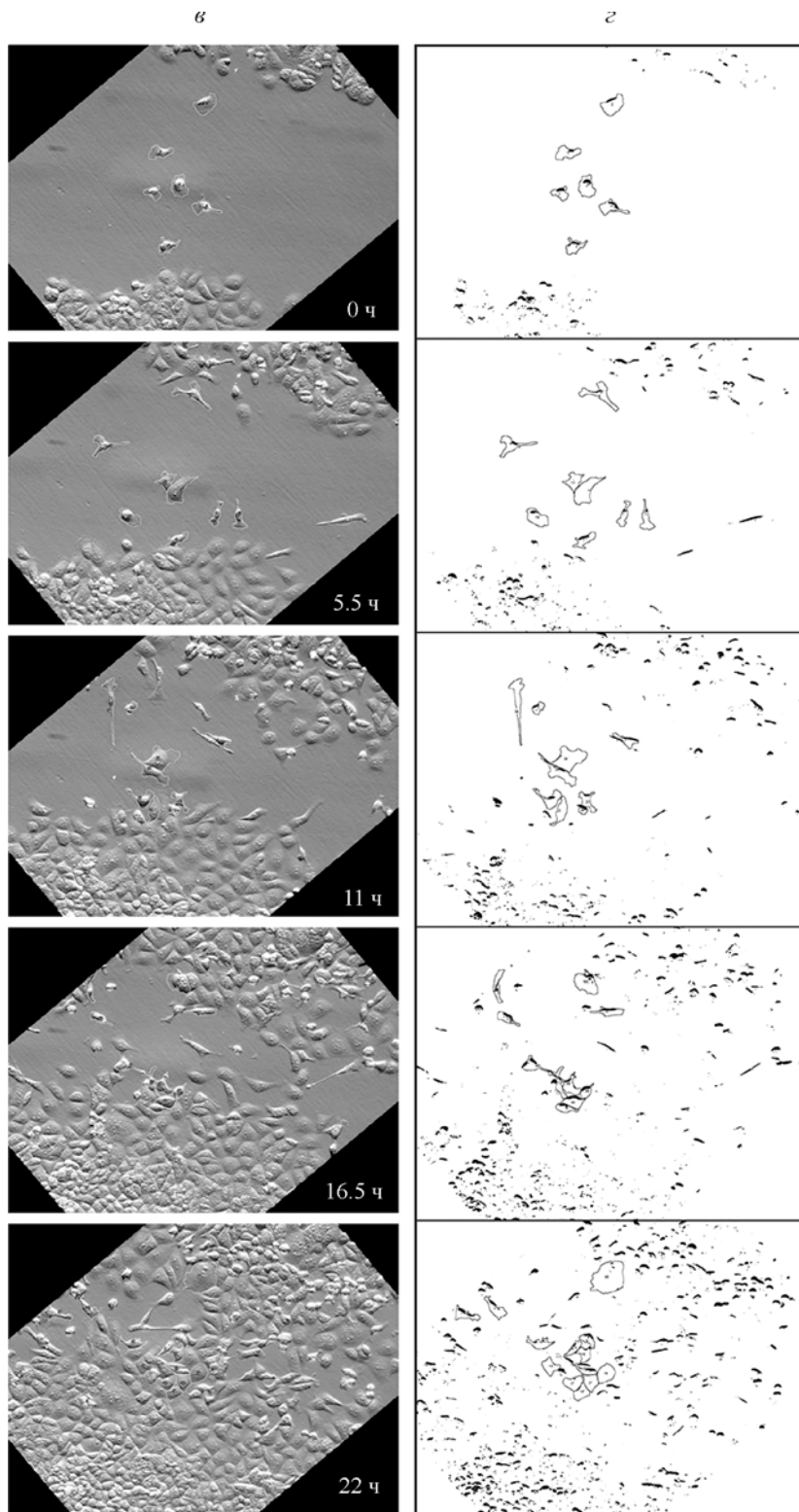


Рис. 1 (продолжение).

вые часы в секторах, близких к центру раны, клетки отсутствуют. Чтобы анализ динамики заполнения сектора клетками был адекватным, для расчетов использовали только те изображения, на которых были видны клетки, достигшие центральных секторов (номера 5—7). Для иллюстрации выявленной закономерности приводим дан-

ные средних посекторных значений числа клеток, используя лишь последние 5 изображений (время 20—22 ч) данного поля зрения (рис. 3). Как видно, экспериментальные точки можно удовлетворительно экстраполировать в виде как линейной зависимости (а), так и экспоненциальной (б). Прежде чем отдать предпочтение тому или ино-

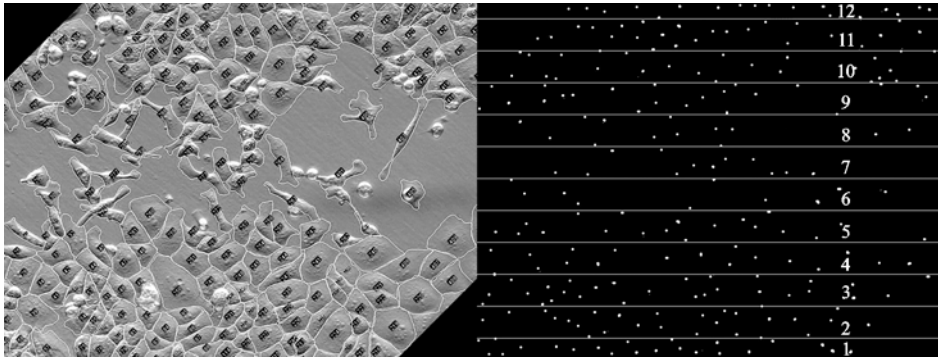


Рис. 2. Пример подготовки поля зрения для анализа миграции клеток Зайдела в рану.

Представлено поле зрения только последней временной точки наблюдения. Слева — оригинальное изображение, справа — то же изображение, подготовленное для подсчета клеток: каждая клетка помечена точкой, сектора пронумерованы.

му результату, представим процесс закрытия раны абстрактно.

Допустим, что средняя скорость движения всех клеток в рану одна и та же. Это означает, что в каждый данный момент времени любой сектор будет заполняться одним и тем же количеством клеток, однако при насыщении сектора клетками их число в нем должно оставаться постоянным. Тем не менее в каждом последующем (ближе к середине раны) секторе увеличение числа клеток (при движении без ускорения) будет расти линейно ($y = ax + b$). Очевидно, что сложение посекторных значений во времени тоже даст линейную зависимость. Исходя из этого предположения построены расчетные линии относительно экспериментальных точек на рис. 3, а. Несмотря на то что получено неплохое соответствие расчетных значений (сплошные линии) экспериментальным значениям (коэффициент детерминации R^2 равен 0.91 для левых и 0.90 для правых точек), следует принять во внимание еще один факт.

Клетки не только мигрируют в рану, но и вступают в митоз. Если в первом случае рост числа клеток идет линейно, то во втором — по экспоненте, при этом в данном секторе клетки увеличивают свою численность без миграции. Чем больше клеток в данный момент было в секторе, тем сильнее возрастает их число за счет митоза. Чтобы принять во внимание этот аргумент, необходимо

было проверить соответствие экспериментальных значений и экспоненциальной зависимости (рис. 3, б). Коэффициенты детерминации в данном случае соответственно равны 0.92 и 0.97. Несмотря на то что они выросли незначительно, формально это является основанием отдать предпочтение в пользу экспоненциальной зависимости.

Представленный на рис. 3 результат ничего не говорит об относительном вкладе каждого из двух процессов — миграции и деления клеток — в закрытие раны во времени. Оценить этот вклад можно на основании данных, представленных на рис. 4. На нем показана динамика изменения числа клеток не по всей ширине раны, а только суммарно в двух ее секторах (третьих от краев раны, т. е. 3-го и 7-го). Это сделано для того, чтобы не использовать крайности, поскольку понятно, что в начале наблюдения в центральных секторах клеток еще нет, а в конце должно быть насыщение ими в крайних секторах. Как можно заметить, рост числа клеток примерно до 9—10 ч происходит медленно, а затем резко ускоряется, указывая на двухэтапный процесс закрытия раны. И для первого, и для второго этапов рост значений числа клеток в первом приближении хорошо аппроксимируется линейной зависимостью ($y = ax + b$).

Откровенно говоря, данные на рис. 4 с меньшим соответствием можно представить (описать) и в виде S-образной кривой. Однако приоритетом должна быть не

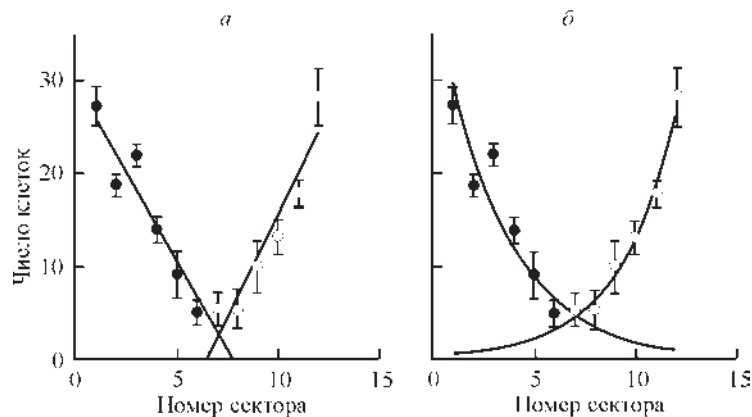


Рис. 3. Гистограммы посекторного подсчета числа клеток Зайдела по пяти последним временным точкам относительно времени появления первых клеток в центре раны.

Объяснение см. в тексте. Темные и светлые кружки — средние значения числа клеток в секторах соответственно по обе стороны от оси раны, вертикальные отрезки — ошибка среднего. Сплошные линии — расчетные кривые с использованием линейной (а) и экспоненциальной (б) зависимостей.

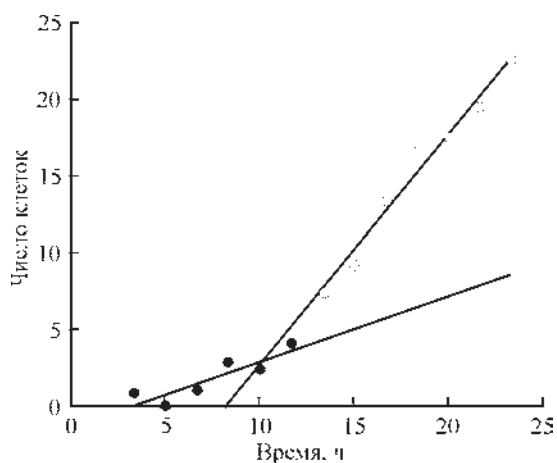


Рис. 4. Изменение суммарного числа клеток в области 3-го и 7-го секторов (см. рис. 2) экспериментальной раны в процессе ее закрытия клетками Зайдела, используя изображения данного поля зрения с интервалом в 1.5 ч.

Темные и светлые значки — соответственно численность клеток в течение 1-го и 2-го этапов закрытия раны. Сплошные линии — соответствующие кривые линейной регрессии численных значений ($y = ax + b$).

столько формализация данных, сколько их биологический смысл. Описание экспериментальных данных с помощью S-образной зависимости не исключает, а даже, напротив, указывает на сложный характер процесса, на его многофакторность. При этом выделить вклад отдельных факторов во времени невозможно. Опираясь же на результат рис. 4, можно увереннее полагать, что на 1-м этапе закрытие раны клетками обоих типов (эпителио- и фибробластоподобными) идет преимущественно за счет миграции клеток в рану, а на 2-м этапе начинает возрастать вклад в этот процесс числа клеток в результате их размножения.

На рис. 5 представлена динамика изменения числа клеток обоих типов в ране. Видно, что приблизительно через 9—10 ч после нанесения раны скорость роста их числа увеличивается более чем в 2 раза. Это следует из двукратного различия коэффициентов a (0.79 ± 0.07 и 1.76 ± 0.06 , $P < 0.01$) соответствующих расчетных линейных уравнений ($y_1 = 0.79x + 21.3$; $y_2 = 1.76x + 13.2$).

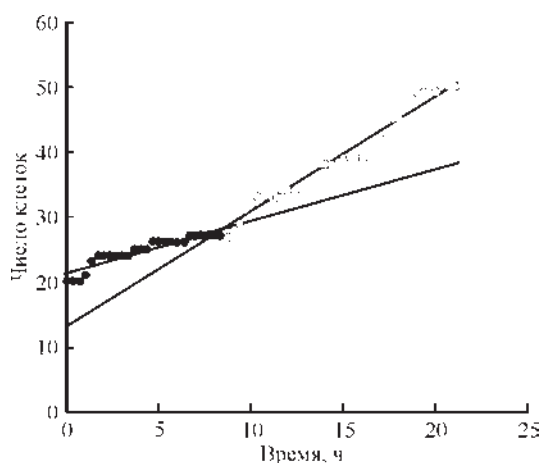


Рис. 5. Двухстадийное изменение числа клеток в результате деления части отобранных для исследования фибробласто- и эпителиоподобных клеток (обе выборки объединены).

Сплошные линии — расчетные кривые линейной регрессии ($y = ax + b$) численности клеток на 1-м этапе наблюдения (темные кружки) и на 2-м (светлые кружки). Коэффициенты детерминации соответственно равны 0.92 и 0.97.

Различия миграции эпителио- и фибробластоподобных клеток (2). О различиях миграции разных типов клеток Зайдела в свободное пространство раны мы судим по предложенному нами параметру W . Однако прежде чем перейти к данным этого клеточного параметра, следует сделать несколько вводных замечаний. Закрывание раны может происходить по двум сценариям: либо в результате движения всего клеточного монослоя как целостной структуры, либо посредством миграции клеток в рану по отдельности как индивидуальных независимых друг от друга объектов (Крахмаль и др., 2015). При этом движение отдельных клеток в область свободного пространства может быть либо пассивным (по типу броуновского движения), т. е. носить черты случайного процесса, либо происходить направленно (векторно), т. е. являться закономерным процессом, указывающим на тесную связь между раной (как свободной от клеток поверхностью субстрата) и подвижностью клетки (как ее атрибутом). Таким образом, следу-

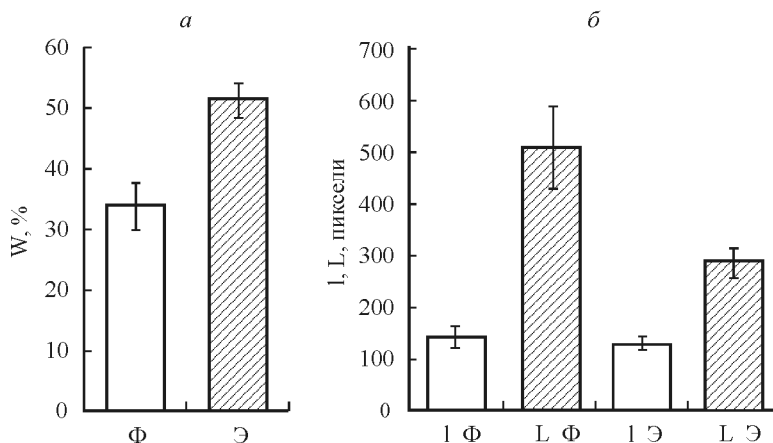


Рис. 6. Параметры миграции фибробластоподобных (Ф) и эпителиоподобных (Э) клеток гепатомы Зайдела: степень эффективности миграции W (а) и суммарный путь клеток L (б).

1 — расстояние между точками локализации клетки на первом (0 ч) и последнем (22 ч). Буквы «Ф» и «Э» при параметре указывают на тип клеток. Представлены средние значения (столбики) и их ошибки (вертикальные отрезки).

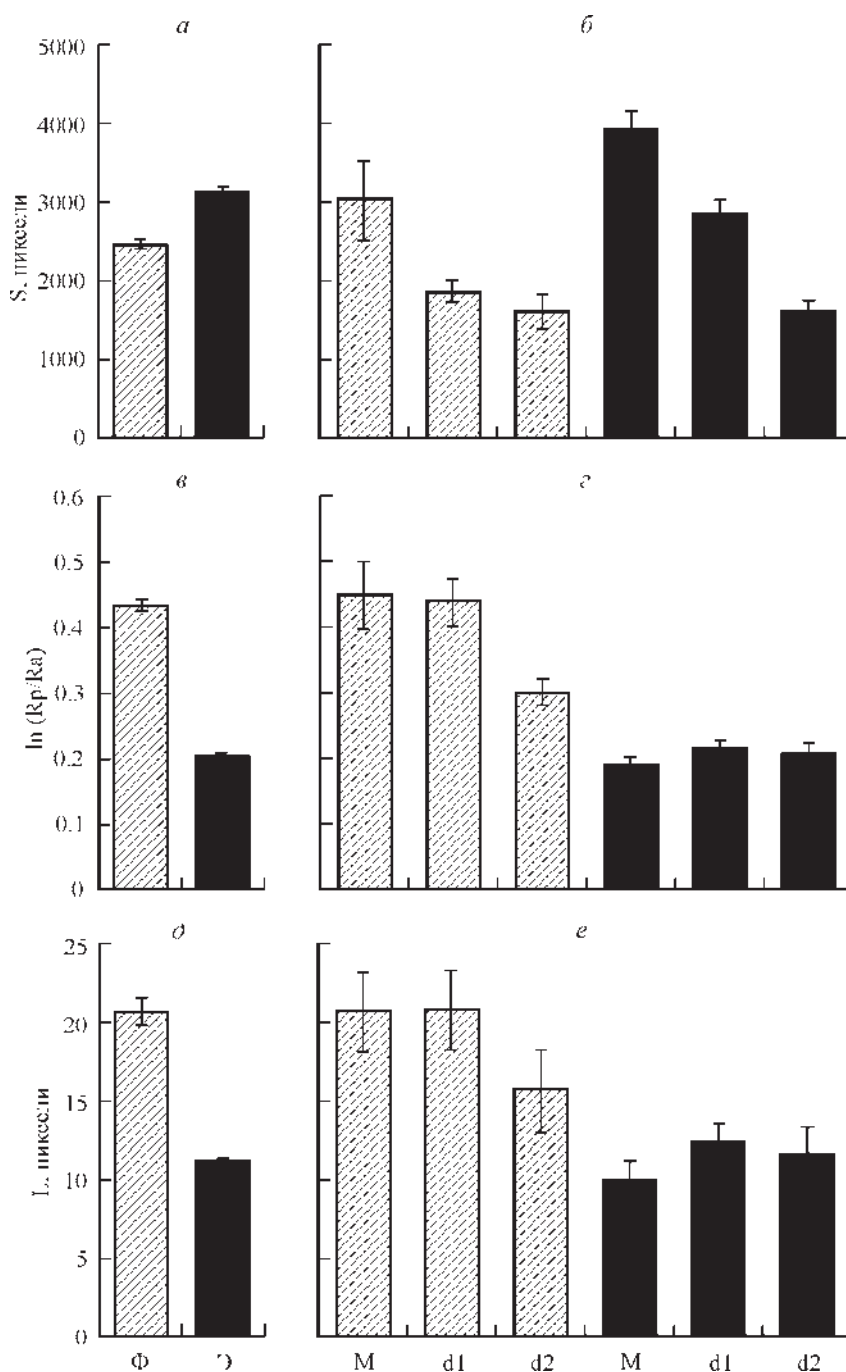


Рис. 7. Средние значения площади проекции клетки на подложку S (а, б), коэффициента распластывания $\ln(Rp/Ra)$ (в, г) и длины «пробега» L за 20 мин (д, е) фибробластоподобной (Ф, светлые столбцы) и эпителиоподобной (Э, темные столбцы) клеток. М — материнские клетки, d1 — дочерние клетки, d2 — внучатые клетки. Представлены средние значения (столбики) и их ошибки (вертикальные отрезки).

ет различать миграцию отдельных клеток и групп клеток. В первом случае направленность миграции неопределена (клетки независимы друг от друга, поэтому их векторы движения индивидуальны). Во втором случае клетки, либо взаимодействуя друг с другом, либо одинаково реагируя на внешний фактор, движутся в одном направлении. В связи с этим судить о направленности движения различных клеток по параметру W можно только в том случае, если сравниваются его средние величины групп клеток, находящихся в одних и тех же условиях (в данном случае фактором, объединяющим клетки, является

свободное от клеток пространство раны). Использование этого параметра по отношению к отдельно взятой клетке характеризует эффективность ее движения в одном из направлений, т. е. вектор ее движения может быть направлен в любую сторону, возможно и в рану. Если она движется хаотично, то величина W низкая, если будет предпочитать какое-то свое индивидуальное направление, то этот параметр будет расти. К слову сказать, если выборка клеток достаточно велика и они двигаются хаотично, то средняя величина W (с учетом знака вектора) такой группы клеток будет стремиться к нулю.

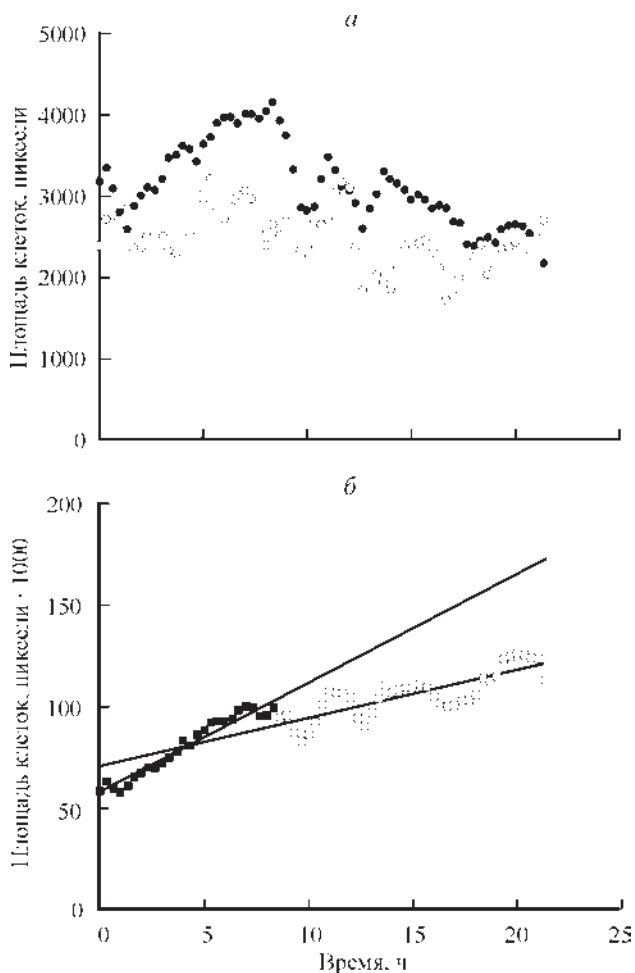


Рис. 8. Динамика изменения средней площади проекции клеток на подложку в зависимости от их типа (а) и суммарной площади всех клеток в процессе закрытия ими свободного пространства экспериментальной раны (б).

а: темные и светлые кружки — соответственно эпителио- и фибробластоподобные клетки. б: темные и светлые квадраты — площадь, занимаемая клетками соответственно на 1-м и 2-м этапах наблюдения. Сплошные линии — соответствующие линии линейной регрессии.

Данные параметра W для клеток Зайдела представлены на рис. 6, а. Видно, что W у фибробластоподобных клеток значительно ниже, чем у эпителиоподобных ($P < 0.01$). Создается впечатление, что этот факт противоречит естественной способности фибробластоподобных клеток активно передвигаться по подложке. Однако его легко объяснить, если обратиться к результату, представленному на рис. 6, б. Как видно, суммарный путь (L) фибробластоподобных клеток за время наблюдения почти вдвое превышает эту же величину эпителиоподобных клеток. В то же время величины l у них практически одни и те же. Отсюда следует, что эпителиоподобные клетки более целенаправленно идут в свободное пространство раны, чем фибробластоподобные. Направленность (векторность) фибробластоподобных клеток в сторону свободного пространства раны как специфичная характеристика у этих клеток отсутствует. Они активно передвигаются в разных направлениях (по типу броуновского движения), контактируя при этом с другими клетками, перемещающимися в свободное пространство раны. В результате движение фибробластоподобных клеток в рану

становится зависимым от направленной миграции других клеток. Косвенно на это указывает отсутствие различий по величине l между эпителио- и фибробластоподобными клетками гепатомы Зайдела.

Различия эпителио- и фибробластоподобных клеток по площади проекции на подложку, коэффициенту распластывания и скорости движения (3). Несмотря на то что изначально отобранные группы клеток по численности небольшие, провести анализ средних значений некоторых клеточных параметров вполне возможно. Во-первых, измерение параметров каждой клетки проводили индивидуально через каждые 20 мин, что давало достаточное число измерений как по каждой клетке, так и группы в целом. Во-вторых, как уже упоминалось, измерения проводили и на клетках-потомках. Результаты расчета средних величин площади проекции клетки на подложку представлены на рис. 7.

Как можно видеть, визуальный (субъективный) отбор клеток по принадлежности к тому или иному клеточному типу объективно подтверждается расчетными данными. Площадь проекции на подложку у фибробластоподобных клеток ниже ($P < 0.01$), но этот факт не столь важен, поскольку параметр неспецифичен как признак различия между эпителиальными и фибробластными клетками. Однако у тех и у других выявлена одна и та же тенденция — по мере закрытия раны у клеток последующих поколений происходит уменьшение этого параметра (рис. 7, б).

Клетки обеих групп резко различались по коэффициенту распластывания ($P < 0.001$) (рис. 7, в). Чем выше значение этого параметра, тем больше у клетки филоподий. Поэтому более высокие значения коэффициента распластывания характерны для фибробластоподобных клеток. В процессе закрытия раны этот параметр остается стабильным у эпителиоподобных клеток по мере их размножения, но снижается у фибробластоподобных (рис. 7, г), что способствует постепенному нивелированию морфологических различий клеток обеих групп. По-видимому, это тоже связано с уменьшением размера клеток при формировании моноослой.

Наличие филоподий способствует клеточной подвижности. Поэтому неудивительно, что было обнаружено различие, причем двукратное, скорости движения по субстрату у отобранных групп клеток ($P < 0.01$; рис. 7, д). В процессе размножения клеток этот параметр, как и коэффициент распластывания, начинал уменьшаться лишь у фибробластоподобных клеток 3-го поколения, в то время как у эпителиоподобных он практически не изменялся (рис. 7, е).

Изменения площади проекции клеток в процессе закрытия раны (4). Динамика изменений средней площади проекции фибробласто- и эпителиоподобных клеток показана на рис. 8, а (соответственно светлые и темные кружки). Нетрудно заметить, что в период до 9—10 ч происходит увеличение этого клеточного параметра, затем площадь клеток начинает уменьшаться. Более отчетливо эта тенденция прослеживается у эпителиоподобных клеток. Скорее всего, это связано с тем, что в выборку были включены как вступающие в митоз клетки, так и выходящие из него, т. е. мелкие округлые клетки. Отследить период выхода из митоза материнских клеток технически было невозможно. У дочерних клеток размер менялся как до, так и после митоза. Наблюдение за внучатыми клетками было кратковременным, поэтому

вклад их постмитотического состояния заметно сказывался на среднем размере этих клеток. Нельзя исключить и то, что при формировании монослоя клетки, уплотняясь, уменьшают площадь своей проекции на подложку.

Поскольку характер изменения средней площади клетки сходен у эпителио- и фибробластоподобных клеток, имело смысл суммировать данные по площади клеток обоих типов, чтобы проследить динамику закрытия свободного пространства экспериментальной раны. Полученный результат представлен на рис. 8, б. Видно, что в целом процесс закрытия раны идет непрерывно, однако на 1-м этапе этот процесс более интенсивен, чем на 2-м. Более того, если вначале он идет равномерно, то затем приобретает черты синусоидальности. Такой различный характер формы кривых можно объяснить тем, что на 1-м этапе закрытия раны клетками происходит в большей степени из-за увеличения их площади проекции на подложку. На 2-м этапе изменение хода кривой на синусоидальный, по-видимому, можно объяснить как уменьшением размера клеток перед их вступлением в митоз и сразу после него (при расчетах эти клетки входили в общую выборку, занижая средние величины), так и возможной синхронностью пролиферации клеток. Однако о достоверности такого феномена говорить пока рано из-за относительно небольшой выборки клеток.

Обсуждение

Культивирование клеток *in vitro* не совсем правильно рассматривать преимущественно как метод моделирования их поведения в организме, в котором в отличие от условий культуры есть специализированные системы управления всеми процессами. Чтобы такое моделирование было адекватным, необходимо при экстраполяции знать границы, нарушение которых недопустимо. В связи с этим очень важно изучать различные аспекты поведения клеток в культуре, характеризуя их не только качественно, но и количественно, причем как по отношению к отдельной взятой клетке, так и ко всей популяции в целом. Исходя из этих представлений мы в настоящей работе рассматриваем поведение клеток в культуре с двух позиций — нанесения экспериментальной раны (как свободной поверхности) и реакции на нее эпителио- и фибробластоподобных клеток, одновременно присутствующих в полученной нами ранее монослойной линии гепатомы Зайдела (Терюкова, 2013).

Метод искусственного повреждения монослоя культивируемых клеток в виде экспериментальной раны был предложен для изучения ненаправленной (без создания градиента хемоаттрактанта) миграции клеток, ее типов и скорости под влиянием тех или иных факторов в стандартных условиях (Catalano et al., 2012; Liu et al., 2012; Xu et al., 2013). Однако в настоящей работе такой методический прием мы используем только для механического удаления части клеток и искусственного получения свободной поверхности для изучения реакции на него клеток, находящихся на стадии *steady state*. Это важно подчеркнуть для понимания и оценки получаемых результатов.

Как правило, при обычном культивировании клеток основанием для их пересева является формирование монослоя. При его достижении клетки, как правило, перестают делиться из-за контактного ингибирования размножения (Abercrombie, Heaysman, 1954). Если клетки вове-

ре не пересевать, может произойти спонтанное отслоение монослоя. После пересева клеткам необходимо некоторое время для адаптации к новому культуральному сосуду — это латентный период. Затем они начинают интенсивно размножаться — экспоненциальная фаза роста культуры. Потом пролиферация замедляется, формируется монослой, и культура переходит в фазу *steady state*. Таким образом, в классическом варианте рост числа клеток в культуре идет в соответствии с S-образной зависимостью.

Нанесение экспериментальной раны на монослой можно считать экстраординарным событием для культивируемых клеток, адаптированных к периодическим пересевам. У сформировавшегося в виде монослоя сообщества клеток «неожиданно» появляется свободное пространство, которое можно занять. Оно обнаруживается не после пересева, к которому клетки, прошедшие по крайней мере несколько пассажей, уже должны быть как-то адаптированы, а в результате частичного и локального повреждения монослоя. В результате клетки получают возможность сразу реализовывать свои способности для оккупации этого свободного пространства, минуя морфофункциональные состояния в лаг-фазе, экспоненциальной фазе и переходе к состоянию *steady state*.

Как было показано ранее, клетки эпителия верхних дыхательных путей в культуре для закрытия экспериментальной раны используют три свои способности — миграцию в рану, распластывание, т. е. увеличение площади проекции клетки на подложку, и пролиферацию (Salva et al., 2004). Это же подтверждают и наши результаты. Однако необходимо отметить, что не все клетки в полной мере реализуют эти потенции в случае экспериментальной раны. Только очень небольшая доля клеток популяции, расположенных вблизи краев раны, напрямую участвует в закрытии свободного пространства, в то время как подавляющее большинство клеток вне раны остается в состоянии *steady state*, что можно наблюдать визуально. Этот факт также подтверждают данные, полученные на фибробластах линии 3T3 при закрытии ими экспериментальной раны (Bindschadler, McGrath, 2007). Отметим, что краевые клетки, будучи уже распластанными, могут сразу, минуя фазу шара, типичную для только что пересеванных клеток (Петров, Цупкина, 2016, 2017), начать двигаться в сторону свободной от клеток поверхности субстрата. Однако «могут» не означает «должны». В этом заключается важный вопрос: является ли нанесение раны сигналом для миграции клеток вообще и в ее сторону в частности? Как показывают полученные результаты, для монослойных клеток обоих типов гепатомы Зайдела ответ в первой части утвердительный. Тем не менее относительно направленности движения клеток в рану ответ не так однозначен. Во-первых, необходимо различать такие понятия, как «активное», т. е. самостоятельное движение клетки, и ее «пассивное» движение, связанное с влиянием на ее перемещение соседних клеток. Во-вторых, оба понятия не связаны с понятием «направленность». Вероятно, нетрудно представить, что если для клеток нет соответствующего сигнала или они его не воспринимают, то в системе координат x, y среднее значение вектора как параметра, указывающего преимущественное направление движения клеток, будет стремиться к нулю с ростом выборки клеток. Напротив, если клетки восприимчивы к данному сигналу, они будут активно перемещаться в его направлении. Если одни клетки в данной популяции не воспринимают сигнал, но находятся во взаимодействии с

клетками, на которые сигнал действует, то они вынужденно будут смещаться в направлении миграции вторых клеток.

Как следует из представленных в настоящей работе экспериментальных данных, сигналом для миграции клеток в данном направлении является свободное пространство экспериментальной раны. Заполнение ее клетками сначала идет преимущественно за счет их миграции, а затем этот процесс дополняется размножением клеток, отчего скорость закрытия раны увеличивается. По-видимому, эти процессы связаны, т. е. миграция, предшествуя пролиферации, возможно отчасти, инициализирует ее. Однако вряд ли эта последовательность жестко привязана к каждой конкретной клетке. Тем не менее о последовательности «сначала миграция, потом пролиферация» говорят данные и других авторов, показавших, что в культуре пролиферация трансформированных клеток четырех различных эпителиев верхних дыхательных путей человека также начиналась только примерно через 10 ч после нанесения раны (Salva et al., 2004). Нельзя исключить, что в такой последовательности на рану реагируют не только краевые клетки, но и вся клеточная популяция. По крайней мере у нас есть данные, полученные на эпителиоподобных клетках линии СНО, о том, что контроль размножения может, например, осуществляться через средний размер клеток данной популяции (Петров, Негуляев, 2011).

Возвращаясь к оценке миграции клеток в свободное пространство экспериментальной раны с помощью предложенного нами параметра W , следует сказать, что сходный параметр был описан ранее Ломакиной (2011). Он был представлен как соотношение D/T , где D — путь клетки по прямой от первой до последней точки, а T — весь ее путь. Формально оба соотношения одинаковы, принципиальное различие связано с их использованием в эксперименте и интерпретацией полученных результатов. В работе Ломакиной экспериментальных точек было всего 4 (через каждые 2 ч), в нашей работе — больше 60 (через каждые 20 мин). Кроме того, упомянутый автор рассматривает это соотношение как параметр, характеризующий направление миграции клетки. Однако это, как уже было сказано относительно W , не совсем верно. Параметр D , так же как W , не может указывать конкретное направление движения отдельно взятой клетки, например, в рану. Он, как величина безразмерная, лишь констатирует вероятность движения клетки в одном из наиболее предпочтительных направлений (в том числе и в рану) по сравнению со всеми другими направлениями. Именно поэтому только в случае достаточно большой группы клеток, рассчитывая среднее значение W для всей выборки клеток (данной линии, сублинии, популяции), можно говорить о направленности движения в рану всей популяции эпителиоподобных клеток гепатомы Зайдела.

Анализируя параметр W , рассчитанный для клеток обоих типов, можно прийти к выводу, что между ними имеются принципиальные различия. Несмотря на то что эпителиоподобные клетки менее активны, чем фибробластоподобные, и медленнее передвигаются по субстрату, среднее значение их W в 1.5 раза выше, т. е., реакция первых клеток на свободное пространство не вызывает сомнения, чего нельзя сказать о вторых. Напротив, поскольку по параметру l оба типа клеток не имеют различий (рис. 6, б), можно полагать, что равенство по этому параметру в сочетании с выраженной хаотичной (беспорядочной) подвижностью фибробластоподобных клеток, ско-

рее, указывает на их пассивное движение в рану вследствие взаимодействия с эпителиоподобными клетками, чем вследствие реакции на свободное пространство.

Несмотря на то что клетки линии Зайдела состоят из двух морфологически разных типов, пролиферация их в ране идет в целом синхронно, что, вероятно, можно рассматривать как признак согласованности этого процесса между обоими клеточными типами. При этом клетки, находящиеся в ране, в процессе ее закрытия и после в целом имеют больший размер (по параметру площадь клетки), чем клетки вне раны (если исключить мелкие округлые пре- и постмитотические клетки). Увеличение размера клеток в ране можно рассматривать как дополнительный фактор, ускоряющий ее закрытие, в первую очередь на начальных этапах, т. е. до начала активной пролиферации.

Принимая во внимание, что эпителио- и фибробластоподобные клетки имеют отчетливые различия по большинству из изученных в настоящей работе параметров, можно полагать, что монослойная линия гепатомы Зайдела состоит из двух субпопуляций. Тем не менее это не означает, что данная клеточная линия не может быть разделена на другие субпопуляции по каким-либо иным параметрам. Например, как показывают данные, представленные на рис. 4 и 5, и эпителио-, и фибробластоподобные клетки начинают делиться приблизительно в одно и то же время, причем часть их дочерних клеток за время наблюдения успевает дать еще одно потомство. Иными словами, у части клеток обеих субпопуляций продолжительность клеточного цикла оказывается относительно короткой. А как было показано нами ранее, в линии Зайдела можно выделить субпопуляцию клеток с короткой продолжительностью клеточного цикла (в среднем около 14.5 ч; см.: Петров и др., 2017), не связанную с морфологией клеток.

Авторы искренне благодарят Е. И. Сахенберг за культивирование монослойной линии гепатомы Зайдела и Ю. А. Негуляева за помощь при проведении цейтраферной видеосъемки.

Список литературы

- Крахмаль Н. В., Завьялова М. В., Денисов Е. В., Вторушин С. В., Перельмутер В. М. 2015. Инвазия опухолевых эпителиальных клеток: механизмы и проявления. *Acta Naturae*. 7 : 18—31. (Krahmal N. V., Zavyalova M. V., Denisov E. V., Vtorushin S. V., Perelmutter V. M. 2015. Cancer invasion: patterns and mechanisms. *Acta Naturae*. 7 : 18—31.)
- Ломакина М. Е. 2011. Изменения актинового цитоскелета и динамики клеточного края, определяющие характер клеточной миграции при трансформации фибробластов: Автореф. канд. дис. М. 24 с. (Lomakina M. Ye. 2011. Changes in the actin cytoskeleton in the dynamics of the cellular edge, which determine the nature of cell migration at the transformation of fibroblasts: PhD Thesis. Moscow. 24 p.)
- Петров Ю. П., Негуляев Ю. А. 2011. Средний размер клетки как фактор, отражающий взаимодействие клеток линии СНО в процессе их пролиферации. *Цитология*. 53 (8) : 671—678. (Petrov Yu. P., Negulyaev Yu. A. 2011. The average size of the cell as the factor reflecting interaction of cells of cho line during their proliferation. *Tsitologiya* (Russian). 53 (8) : 671—678.)
- Петров Ю. П., Терюкова Н. П., Сахенберг Е. И., Иванов В. А., Снопов С. А. 2017. Сравнение продолжительности клеточного цикла монослойной линии гепатомы Зайдела и ее сублиний 3Н и 9С в культуре. *Цитология*. 59 (3) : 185—193. (Petrov Yu. P., Teryukova N. P., Sahenberg E. I., Ivanov V. A.,

Snopov S. A. 2017. Cell cycle duration in cultured lines of hepatoma Zajdela with signs of cancer stem cells and progenitors. *Tsitologiya* (Russian). 59 (3) : 185—193.)

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

Петров Ю. П., Цупкина Н. В. 2017. Сравнение формы мезенхимных стромальных клеток кролика в течение пяти пассажей после получения первичной культуры. *Цитология*. 59 (1) : 62—68. (Petrov Yu. P., Tsupkina N. V. 2017. Comparison of the shape of rabbit mesenchymal stromal cells during five passages after production of primary culture. *Tsitologiya* (Russian). 59 (1) : 62—68.)

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*. *Cell Tissue Biol.* (Tsitologiya). 7 (3) : 245—252.)

Abercrombie M., Heaysman J. E. 1954. Observations on the social behaviour of cells in tissue culture. II. Monolayering of fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 6 : 293—306.

Bindschadler M., McGrath J. L. 2007. Sheet migration by wounded monolayers as an emergent property of single-cell dynamics. *J. Cell Sci.* 120 : 876—884.

Catalano M.G., Fortunati N., Pugliese M., Marano F., Ortolano L., Poli R., Asioli S., Bandino A., Palestini N., Grange C., Bus-

solati B., Boccuzzi G. 2012. Histone deacetylase inhibition modulates E-cadherin expression and suppresses migration and invasion of anaplastic thyroid cancer cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97 : E1150—E1159.

Kohn D. B. 2017. Historical perspective on the current renaissance for hematopoietic stem cell gene therapy. *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.* 31 : 721—735.

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.

Lin Y., Gil C. H., Yoder M. C. 2017. Differentiation, evaluation, and application of human induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37 : 2014—2025.

Liu Y., Han Y., Zhang H., Nie L., Jiang Z., Fa P., Gui Y., Cai Z. 2012. Synthetic miRNA-mowers targeting miR-183-96-182 cluster or miR-210 inhibit growth and migration and induce apoptosis in bladder cancer cells. *PLoS ONE.* 7 : e52280.

Savla U., Olson L. E., Waters C. M. 2004. Mathematical modeling of airway epithelial wound closure during cyclic mechanical strain. *J. Appl. Physiol.* 96 : 566—574.

Xu T., Xiao D., Zhang X. 2013. ECRG4 inhibits growth and invasiveness of squamous cell carcinoma of the head and neck *in vitro* and *in vivo*. *Oncol. Lett.* 5 : 1921—1926.

Yang Z. Y., Chian R. C. 2017. Development of *in vitro* maturation techniques for clinical applications. *Fertil. Steril.* 108 : 577—584.

Поступила 18 XII 2017

THE BEHAVIOR OF ZAJDELA HEPATOMA MONOLAYER LINE CELLS IN THE SPACE OF EXPERIMENTAL WOUND

Yu. P. Petrov, N. P. Teriukova, S. A. Snopov*

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;
* e-mail: snopov@hotmail.com

The long-cultivated mammalian cell lines, as a rule, have either an epithelium-like morphology or a fibroblast-like one. The monolayer cell line that we obtained from the ascites of rat Zajdela hepatoma contains cells of both types, genetically related, but phenotypically different. This allowed us to compare the behavior of these cells during their migration into the free space of the experimental wound under the same cultivation conditions. We measured the following parameters: the dynamics of the cell number in this space, the area of cell projection on the substrate, the coefficient of cell spreading, the rate of cell migration. In addition, we proposed to calculate the parameter W reflecting the cell efficacy of filling the wound. We observed that initially (at the 1st stage, within 9—10 hours) the filling of the wound space was due to the cell migration and to the increase in the area of cell projection on the substrate. Then, at the 2nd stage, the cellular division made a sufficient input to a further increase in the cell number within the wound. According to the parameter W, epithelium-like cells moved less chaotic and filled the wound approximately 1.5-fold more efficiently than did fibroblast-like cells, which movements were similar to the Brownian one. Meanwhile, the average migration rate of epithelial-like cells was about twice lower than of fibroblast-like cells. In the space of the just closed wound, the cells were of larger area sizes than their counterparts outside the wound. We suppose that such an increase in cell area sizes was a transitory one and resulted from changes in the cell functional state during migration to the wound.

Key words: Zajdela hepatoma, epithelium-like cells, fibroblast-like cells, cells in culture, cell migration, proliferation.