

DOI: 10.31116/tsitol.2018.08.09

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ МОРФОМЕТРИЯ КЛЕТОК ЭПИТЕЛИО- И ФИБРОБЛАСТОПОДОБНОГО ТИПОВ В КУЛЬТУРЕ

© Ю. П. Петров,\* Н. В. Цупкина

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

\* электронный адрес: yure3ov@mail.ru

Визуально у культивируемых клеток можно наблюдать два морфологических типа — эпителио- и фибробластоподобный. К первому относятся округлые и малоподвижные клетки. Клетки второго типа имеют вытянутую форму и филоподиеподобные отростки. Очевидно, что эти характеристики в значительной степени субъективны, что затрудняет изучение биологии клеток, адаптируемых и адаптированных к росту в культуре. Для их формализации нами предложена количественная характеристика — показатели EF. С их помощью можно оценить процентное соотношение вклада в форму клеток соответственно филоподий (EF1), вытянутости или поляризации (EF2) и округлости клетки (EF3). На примере 6 различных клеточных линий показано, что для эпителиоподобных клеток  $EF1 = 15.4 \pm 2.6$ ,  $EF2 = 2.9 \pm 1.9$ ,  $EF3 = 81.7 \pm 3.2$  %, а для клеток фибробластоподобного типа — соответственно  $39.9 \pm 5.9$ ,  $4.5 \pm 0.4$  и  $55.6 \pm 5.6$  %. Сделан вывод: если клетки двух линий хотя бы по одному из показателей EF имеют различия, то они могут быть отнесены к разным клеточным типам.

Ключевые слова: форма клетки, филоподии, поляризация клетки

В настоящее время продолжается внедрение клеточных технологий в практическую медицину (Kohn, 2017; Lin et al., 2017; Yang, Chian, 2017). Однако успешная разработка самих клеточных технологий невозможна без тщательного изучения биологии клеток, переведенных из организма в условия искусственного культивирования. Биология культивируемых клеток в первую очередь должна базироваться на изучении общих закономерностей как адаптации клеток к росту *in vitro*, так и формирования у них устойчивых характеристик при культивировании вне организма, особенно в течение длительного периода времени.

Давно замечено, что при культивировании клетки приобретают либо эпителио-, либо фибробластоподобную форму. Несмотря на то что нет общепринятого определения этих двух типов форм клеток, у всех, кто работает с клеточными культурами, есть общее представление о том, какие клетки относить к тому или иному типу. Основными морфологическими признаками фибробластоподобных клеток, по-видимому, можно считать их поляризацию (вытянутость) и активную миграцию по субстрату, сопровождающуюся постоянным изменением формы в результате образования (и исчезновения) филоподий. В отличие от фибробластоподобных эпителиоподобные клетки имеют более округлую форму, малоподвижны и не склонны к интенсивному образованию филоподий. Таких описательных характеристик может быть и достаточно для фенотипической дифференциации клеток, однако использование их в качестве параметров при изучении закономерностей поведения клеток в культуре

затруднительно, особенно в тех случаях, когда клетки не имеют отчетливых морфологических различий.

Для того чтобы сравнительный анализ клеток был объективным, их морфологические характеристики необходимо формализовать. При изучении биологии клеток в культуре мы используем такие морфометрические параметры, как площадь проекции клетки на подложку, коэффициенты распластывания и поляризации. Однако этих параметров недостаточно для корректной оценки того, к какому типу относить клетки той или иной линии. В настоящей работе была поставлена следующая задача: ввести дополнительные параметры для количественной оценки формы клеток и с их помощью показать, что эпителио- и фибробластоподобные типы культивируемых клеток — это их объективно существующие состояния, характерные для клеток, переведенных в условия *in vitro*.

### Материал и методика

В настоящей работе были использованы цифровые изображения препаратов интактных клеток, на которых ранее нами были выполнены различные эксперименты (Спичкина и др., 2008; Петров, Цупкина, 2012, 2016, 2017; Петров и др., 2014). Эти клетки были разделены на две группы. К 1-й группе (эпителиоподобного типа) были отнесены клетки линии HeLa-M клон 11, клетки линии СНО и кератиноциты человека (КЧ). Ко 2-й группе (фибробластоподобного типа) — клетки линии NCTC клон 929, клетки линии 3T3-N1H и мезенхимные стро-

мальные клетки (МСК) кролика. Клеточные линии HeLa-M, CHO, 3T3-N1H и NCTC клон 929 были получены из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). МСК были выделены из костного мозга подвздошных костей кролика (Петров, Цупкина, 2017). Кератиноциты человека получены от пациентов во время косметических операций (Спичкина и др., 2008).

Морфометрию клеток проводили на препаратах, полученных через 1 сут после посева (кератиноцитов через 2 сут). К этому времени клетки хорошо распластывались, но монослой еще не формировался. Анализ морфометрических параметров клеток выполняли на их цифровых изображениях в формате JPEG, полученных с помощью инвертированного светового микроскопа Nikon ECL IPSE TS100 (объектив 20×), оборудованного цифровой камерой Canon EOS 600D, разрешение 5184×3456 пикселей.

Предварительные числовые характеристики клеток, в частности площадь проекции клетки на подложку (площадь клетки), получали с помощью программы ImageJ 1.48v (Rasband, W. S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, США, <http://imagej.nih.gov/ij>), очерчивая контуром клетки вручную по их периметру. Кроме площади клетки — параметра, рассчитываемого автоматически программой ImageJ, использовали и такие параметры клетки, как их коэффициенты распластывания и поляризации, расчет которых выполняли с помощью программы Excel 2010 (MS Corporation, США). Поскольку для расчетов использовали относительные величины, значения площади и периметра клеток оставляли в пикселях. В каждой из исследуемых популяций (как отдельных групп клеток) было обработано по несколько различных полей зрения и подсчитано не менее 1000 клеток на точку (на данную клеточную популяцию).

Коэффициент распластывания  $R_p/R_a$  был предложен нами ранее для морфометрии культивируемых клеток (Kuz'minukh, 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 больше клетка распластана на подложке, т. е. у нее в значительной степени выражены филоподии или подобные им вытянутые образования (отростки) цитоплазмы. 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.

Коэффициент поляризации  $M/m$  — это соотношение длинной ( $M$ ) и короткой ( $m$ ) осей клетки, если ее форму представить в виде эллипса (Петров, Цупкина, 2012). Значения  $M$  и  $m$ , как и площадь клетки, автоматически рассчитываются программой ImageJ при очерчивании клетки контуром. Минимальное значение коэффициента поляризации равно 1, если величины  $M$  и  $m$  равны. Чем больше клетка вытянута (поляризована), тем выше величина этого коэффициента. Этот параметр, так же как и коэффициент распластывания, удобнее использовать в виде логарифма —  $\ln(M/m)$ .

Оба коэффициента в определенной степени связаны между собой. Как при поляризации, так и при образовании филоподий, увеличивается периметр клетки. Очевидно, что в случае равного увеличения периметра при рав-

ной площади две визуально различные по форме клетки (вытянутая без филоподий и округлая с филоподиями) будут иметь одну и ту же величину коэффициента распластывания. Для того чтобы дифференцировать влияние факторов, влияющих на форму клетки посредством образования филоподий или способствующих ее вытянутости (поляризации), в настоящей работе мы вводим новый параметр — показатель EF (E — epithelioid, F — fibroblast-like). Подробнее он будет описан в разделе «Результаты».

О достоверности средних значений судили, используя критерий  $t^2$  Стьюдента.

## Результаты

Визуальное представление о форме клеток исследуемых популяций дает рис. 1, на котором приведены фрагменты рабочих полей зрения клеток HeLa-M (а), CHO (б), КЧ (в), NCTC клон 929 (г), 3T3-N1H (д) и МСК (е). Как видно, во всех случаях клетки практически разобщены, т. е. в целом отсутствует прямой контакт между ними. В такой разреженной культуре, как мы полагаем, резко снижается обоюдное механическое взаимодействие клеток, что позволяет им без прямого влияния друг на друга сохранять индивидуальные особенности формы. Если исходить из визуального, субъективного восприятия, то, принимая во внимание общее представление об эпителио- и фибробластоподобных клеточных типах, об этих клетках можно сказать следующее.

У некоторых клеток HeLa-M (рис. 1, а) определяются укороченные филоподии или небольшие выпячивания цитоплазмы. Форма этих клеток скорее округлая, чем вытянутая. Она косвенно указывает на низкую степень их подвижности. Клетки линии CHO (рис. 1, б), несмотря на то что они заметно удлинены, почти не имеют филоподий, а лишь небольшое количество коротких отростков. Очевидно, что такие клетки в основном ведут «соседский образ жизни». Округлая форма кератиноцитов (рис. 1, в) не вызывает сомнений, при этом у некоторых из них определяются короткие филоподиеподобные отростки. Из-за округлости форм и признаков, косвенно указывающих на малоподвижность, все эти клетки мы отнесли к эпителиоподобному типу. К предшественникам фибробластоподобного типа можно отнести клетки линии NCTC клон 929 (рис. 1, г), у которых отчетливо выявляются множественные филоподии. У клеток линии 3T3-N1H (рис. 1, д) филоподии выражены в меньшей степени, но они более поляризованы, чем клетки линии NCTC. Эту же особенность можно отметить и для МСК кролика (рис. 1, е).

Анализируя форму различных клеток, культивируемых на обычной пластиковой подложке, мы используем, как правило, три параметра: площадь клетки (точнее, ее проекцию на подложку), коэффициенты распластывания и поляризации. В настоящей работе по дифференциации эпителио- и фибробластоподобного типов, по-видимому, не имеет смысла сравнивать их по среднему значению площади клетки, поскольку а priori можно полагать, что клетки каждого типа при достаточно большой выборке линий с равной вероятностью будут иметь как высокие, так и низкие средние значения этого параметра. Однако относительно величины их дисперсии (по параметру площадь) внутри данной линии (популяции) такой уверенности нет. Визуально можно отметить, например, что кератиноциты в значительной степени различаются между со-



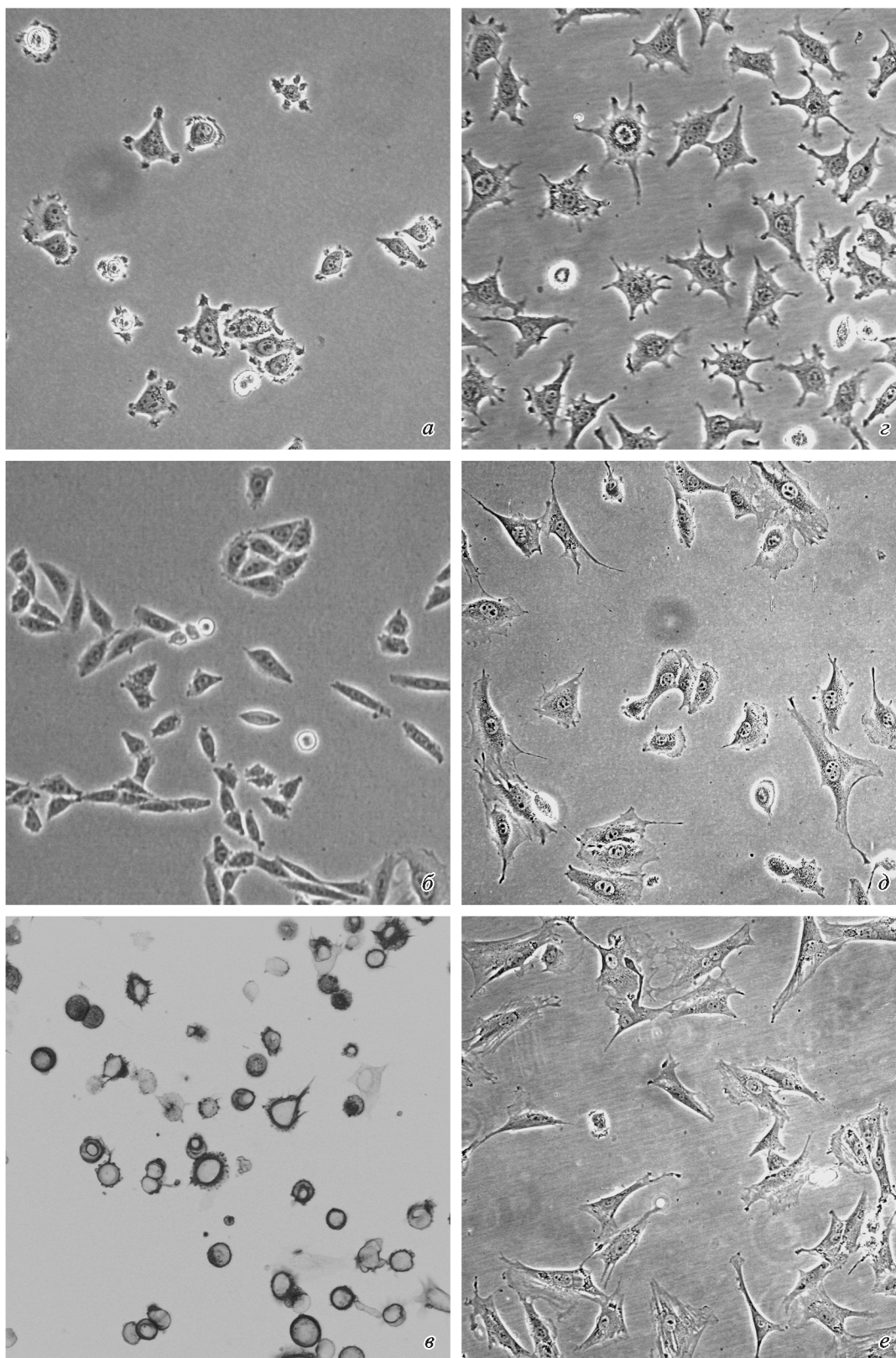


Рис. 1. Фрагменты рабочих полей зрения клеток различных популяций, демонстрирующие разные типы формы клеток. Эпителиоподобный тип представлен клетками линии HeLa-M (а), линии CHO (б) и кератиноцитами человека (в), фибробластоподобный — клетками линии NCTC клон 929 (г), линии 3Т3-НИН (д) и мезенхимными стромальными клетками кролика (е).

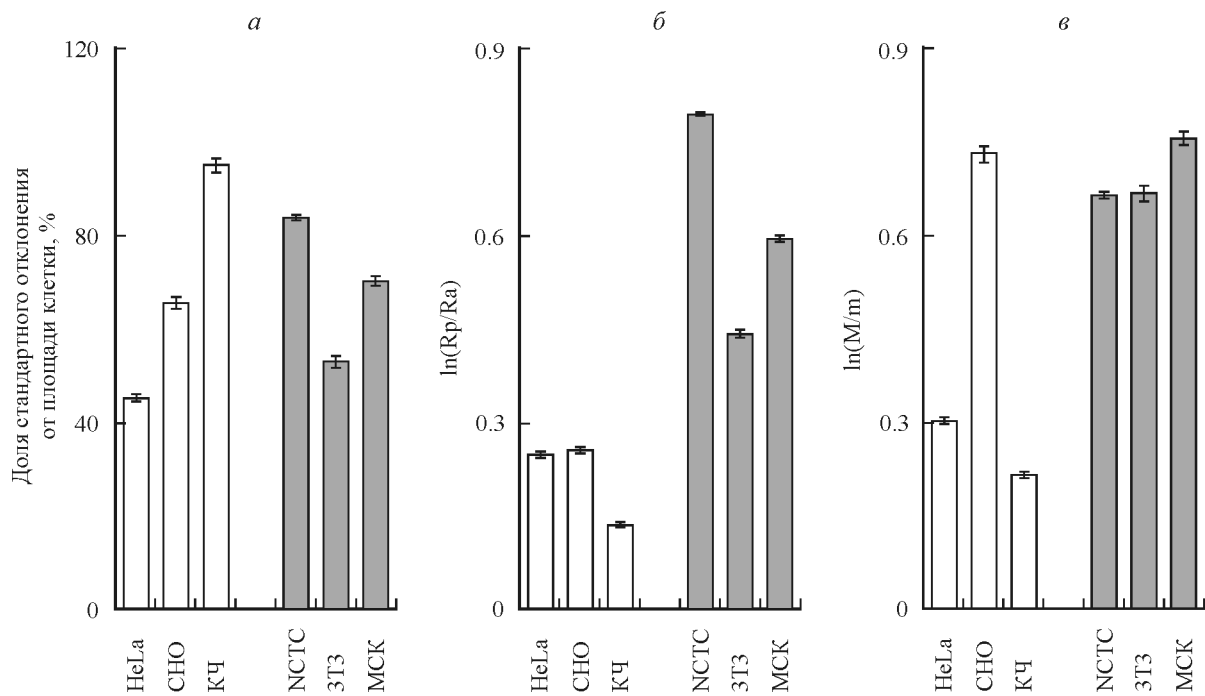


Рис. 2. Сравнение стандартного отклонения значений площади клетки от соответствующего ее среднего значения (а), а также коэффициента распластывания (б) и коэффициента поляризации (в) эпителио- (светлые столбцы) и фибробластоподобных (темные столбцы) клеток.

Стандартные отклонения (а) выражены в %. Вертикальные отрезки — ошибка среднего.

бой по площади проекции на подложку даже в пределах одного и того же поля зрения (рис. 1, в). Таким образом, оценивать сходство или различие клеток имеет смысл именно по параметру дисперсия, точнее, по ее квадратному корню — стандартному отклонению, что демонстрирует рис. 2, а. Важно отметить, что на рис. 2, а по оси ординат отложены не абсолютные значения стандартного отклонения, а относительные, т. е. данная диаграмма показывает, какую часть (в %) от среднего значения площади клетки составляет ее стандартное отклонение. Такой подход необходим для исключения влияния абсолютного значения средней площади клетки на ее дисперсию, поскольку, как правило, чем крупнее объект (любой), тем выше дисперсия его размера. Таким образом, относительная величина стандартного отклонения позволяет судить об однородности популяции клеток (в данном случае по параметру площадь клетки) вне зависимости от величины среднего значения соответствующего параметра.

Как видно на рис. 2, а, каждая клеточная популяция индивидуальна по параметру стандартное отклонение ( $P < 0.01$ ). Однако если клетки объединить по типам, взяв средние значения, то результат будет следующий. Доля стандартного отклонения от среднего значения площади для клеток эпителиоподобного типа равна  $68.5 \pm 14.5\%$ , а фибробластоподобного —  $68.9 \pm 8.9\%$ . Таким образом, по дисперсии значений площади различия между этими типами клеток нет.

В целом специфические различия между клеточными линиями выявляются как по коэффициенту распластывания  $\ln(Rp/Ra)$ , так и по коэффициенту поляризации  $\ln(M/m)$  (рис. 2, б, в). Из особенностей можно отметить отсутствие различия по коэффициенту распластывания между клетками линий HeLa-M и CHO, при этом наблюдается более чем двукратное различие по коэффициен-

ту поляризации. Если сравнивать клетки, объединяя их в группы, то различие между эпителио- и фибробластоподобными клеточными типами по коэффициенту распластывания оказывается почти трехкратным, соответственно  $0.21 \pm 0.04$  и  $0.62 \pm 0.10$  ( $P < 0.01$ ). Отметим, что в данном случае расчет средних значений выполнен исходя не из числа клеток, а из числа клеточных линий (т. е. в каждом случае  $n = 3$ ). Достоверных различий по коэффициенту поляризации между этими типами клеток формально нет, соответственно средние значения его равны  $0.42 \pm 0.16$  и  $0.70 \pm 0.03$ . Очевидно, что это связано с исключением — высоким значением этого параметра у клеток линии CHO. И если это «исключение» не «подтверждает правило», то вряд ли опровергает предположение о тенденции: клетки фибробластоподобного типа имеют более высокий коэффициент поляризации, чем клетки эпителиоподобного типа. Поэтому в целом оба параметра объективно подтверждают выявляемые визуально различия по форме клеток между этими двумя типами.

Тем не менее мы считаем, что представленная формализация этих различий не совсем адекватна. Дело не только в достоверности различий, но еще и в том, какие свойства клеток отражают данные параметры. Величина коэффициента распластывания зависит не только от числа и размера филоподий, увеличивающих периметр клетки, но и от ее поляризации, которая тоже увеличивает периметр клетки при постоянстве ее площади. Отдифференцировать эти два фактора почти невозможно даже при одновременном расчете коэффициента поляризации. Рассчитывая их как независимые параметры, мы не можем определить, какой именно вклад в изменение формы клетки вносят филоподии (или филоподиеподобные отростки), а какой — ее поляризация (удлинение, вытяну-

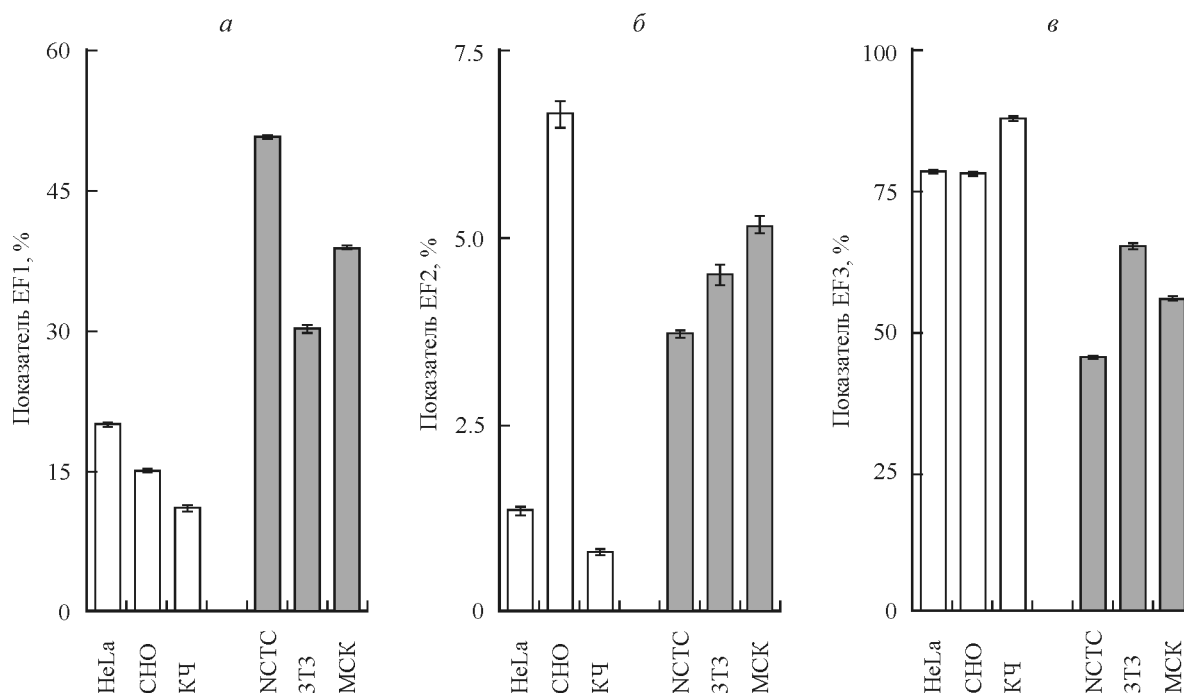


Рис. 3. Сравнение средних значения показателей EF1 (а), EF2 (б) и EF3 (в) клеток, относящихся к эпителио- (светлые столбцы) и фибробластоподобным (темные столбцы) типам.

Вертикальные отрезки — ошибка среднего. Объяснение см. в тексте.

тость). Очевидно, что для корректного подтверждения дифференциации клеток на данные типы важно знать точный вклад в это различие каждого отличительного признака.

При решении этой задачи необходимо обратить внимание на несколько логических предпосылок. Оба коэффициента (как  $Rp/Ra$ , так и  $M/m$ ) показывают, в какой степени данная клетка отличается от правильного круга, т. е. в обоих случаях пределом является одна и та же геометрическая фигура — круг. Именно поэтому ниже предельное значение каждого из коэффициентов не может быть ниже 1, т. е. случая, когда соответственно  $Rp = Ra$ , а  $M = m$ . Таким образом, форма клетки в виде круга — это частный случай, когда при данной площади клетка имеет минимальную длину периметра.

Мы не можем оценить, сколько и какие именно факторы влияют на форму клетки. Однако мы можем представить, по какому принципу их можно разделить на две группы. Одни из них стремятся сделать форму клетки отличной от круга, другие, напротив, препятствуют этому процессу, т. е. стремятся удерживать клетку в форме круга. Суммарный вклад всех этих факторов, оказывающих влияние на форму клетки, можно принять за 1, или за 100%. Кроме этого, их можно разделить на три группы: 1) факторы, способствующие образованию филоподий или каких-то иных похожих образований; 2) факторы, способствующие поляризации клетки, т. е. ее удлинению, вытянутости; 3) факторы, стремящиеся удержать клетку в форме круга.

Полагаем, что величины обоих коэффициентов (распластывания и поляризации) в равной степени зависят от факторов, поддерживающих клетку в форме круга, поскольку их минимальные предельные значения равны 1. Кроме этого, оба параметра в равной степени зависимы

от факторов, способствующих поляризации клетки, поскольку ее удлинение приводит к увеличению периметра без изменения площади. И последнее, численное различие обоих параметров связано лишь с тем, что «филоподиевый» фактор включен только в коэффициент распастывания. Таким образом, именно этот коэффициент в полной мере чувствителен ко всем факторам, оказывающим влияние на форму клетки, поэтому его значение мы берем за 1, или 100%. Основываясь на этих утверждениях, для оценки степени вклада в форму клетки факторов, способствующих образованию филоподий, удлиняющих ее или удерживающих ее в форме круга, мы предлагаем использовать показатели EF1, EF2 и EF3.

Показатель EF1 отражает степень вклада в форму клетки факторов, связанных с образованием филоподий или сходных с ними структур, и рассчитывается по формуле  $EF1 = ((Rp/Ra - M/m) / Rp/Ra) \cdot 100$  (%), где  $Rp/Ra$  — величина коэффициента распастывания, а  $M/m$  — коэффициента поляризации.

Показатель EF2 формализует вклад факторов, способствующих поляризации клетки. Он рассчитывается по формуле  $EF2 = ((M/m - 1) / Rp/Ra) \cdot 100$  (%). Здесь также использованы величины коэффициентов распастывания и поляризации, а 1 — это числовой эквивалент факторов, удерживающих форму клетки в виде круга.

Показатель EF3 — это вклад в конечную форму клетки факторов, стремящихся удерживать ее в виде правильного круга. Он рассчитывается по формуле  $EF3 = (1/Rp/Ra) \cdot 100$  (%).

В результате сумма всех трех показателей должна составить 100%.

На рис. 3 представлены результаты расчета этих показателей для 6-клеточных линий. Поскольку показатели EF1 и EF2 связаны соответственно с коэффициентами распастывания и поляризации, можно отметить подобие



соотношения диаграмм на рис. 2, б, в и соответственно на рис. 3, а, б. Тем не менее важно обратить внимание на принципиальные различия. На рисунках видно, что столбик диаграммы показателя EF1 для клеток СНО в отличие от соответствующего столбика  $\ln(Rp/Ra)$  указывает на меньшее значение EF1 для клеток HeLa-M. Это как раз связано с тем, что величина этого показателя в отличие от коэффициента распластывания детерминируется изменением формы клетки только в результате образования филоподий. Об этом же говорит и соответствующее увеличение показателя EF2 клеток СНО. Его значение сравнительно с этим же показателем двух других популяций эпителиоподобного клеточного типа превышено в 5—6 раз, в то время как в случае коэффициента поляризации лишь в 2—3 раза. Таким образом, можно прийти к выводу о том, что независимость показателей EF1 и EF2 друг от друга выше, чем у коэффициентов распластывания и поляризации, а следовательно, и выше надежность этих показателей EF.

О более точной оценке показателей относительно факторов, влияющих на форму клетки, говорит и другой факт. При беглом взгляде на диаграммы рис. 3, а, б может создаться впечатление, что у клеток фибробластоподобного типа вклад поляризации в их форму соизмерим с вкладом филоподий. Такое неверное впечатление связано с разным масштабированием осей ординат. Оси не выровняли для того, чтобы заметнее были видны различия по показателям EF1 и EF2 в пределах данного клеточного типа. Тем не менее при внимательном анализе можно отметить, что даже для клеток СНО значение показателя EF2 в 2 раза меньше EF1. В других случаях это соотношение приближается к 1 : 10. Если же обратить внимание на значения показателя EF3 (рис. 3, в), то можно заключить, что даже у клеток фибробластоподобного типа половина всех факторов, оказывающих влияние на ее форму, препятствует ее отклонению от формы круга.

Анализируя и обобщая все данные, представленные на рис. 3, в целом можно заключить, что, как и в случае коэффициентов распластывания и поляризации, каждая популяция индивидуальна по показателям EF. Однако исходя из поставленной задачи важнее сравнивать не отдельные популяции, а их группы, в основе которых лежит дифференциация по эпителио- и фибробластоподобным типам клеток. Таким образом, конечным результатом являются данные по средним значениям показателей EF между этими клеточными типами. Средние значения EF для клеток эпителиоподобного типа равны  $15.4 \pm 2.6\%$  (EF1),  $2.9 \pm 1.9$  (EF2) и  $81.7 \pm 3.2\%$  (EF3), а для клеток фибробластоподобного типа —  $39.9 \pm 5.9\%$  (EF1),  $4.5 \pm 0.4$  (EF2) и  $55.6 \pm 5.6\%$  (EF3). Вероятность различий по показателям EF1 и EF3 очень высока ( $P < 0.01$ ). Достоверных различий по показателю EF2 в данном случае нет. Причины те же, что и в случае с коэффициентом поляризации. Поэтому и здесь можно, по-видимому, говорить об «исключении из правил», утверждая, что имеется тенденция к снижению показателя EF2 у клеток эпителиоподобного типа по сравнению с фибробластоподобными клетками. Однако наиболее важным является тот факт, что в обоих случаях средние значения показателя EF1 значительно (в 5—9 раз) превышают значения показателя EF2, несмотря на минимальное значение (3) числа выборок по каждому клеточному типу и достоверным различиям между клетками внутри выборок.

## Обсуждение

В обзоре Бозо и соавторов (2010), в котором обсуждается адекватность использования понятия «фибробласт» к соответствующим клеткам многоклеточного организма, в качестве типичных признаков, определяющих форму этой клетки, называются наличие «отростков» и «веретеновидность». Для культивируемых клеток такой общепринятой точной терминологии не существует, поэтому в качестве эквивалентов для отнесения клетки к фибробластоподобному типу мы используем понятия «филоподии» (или филоподиеподобные отростки) и «вытянутость», или «поляризация». В этих парах (отросток—филоподия, веретеновидность—вытянутость, или поляризация) такие понятия почти синонимы, однако под «отростками» все же подразумеваются в определенной степени пассивные образования, в то время как у культивируемых клеток такие структуры, как правило, активны и используются клеткой для «общения» с внешней средой и для миграции. По этой причине для клеток в культуре понятие «филоподии» мы считаем более корректным. «Веретеновидность» клетки в отличие от «вытянутости» подразумевает заостренность ее полярных концов, что характерно для клеток либо в составе тканей организма, либо в условиях плотного монослоя при культивировании их *in vitro*. Каких-либо строгих определений формы эпителиоподобных клеток не существует, поэтому фенотипически мы определяем такой тип клеток просто как противоположность фибробластоподобному типу, т. е. у таких клеток в идеале не должно быть выраженных филоподиеподобных отростков и отчетливых признаков вытянутости.

Несмотря на то, казалось бы незначительные понятийные различия в указанных выше терминах, они становятся принципиальными, если сравнить условия существования клеток в организме и в культуре.

По-видимому, не будет большим преувеличением утверждение о том, что для организма функциональные особенности отдельно взятой клетки гораздо важнее, чем ее морфология, поскольку именно они в конечном счете детерминируют функцию органа, в который входит данная клетка. Вряд ли форма клетки может оказывать какое-либо существенное влияние на форму этого органа. Поэтому при классификации клеток многоклеточных организмов чаще акцентируют внимание на их функциональных параметрах, а не морфологических. Да и названия клеток, как правило, связаны именно с их анатомическим происхождением (клетки почек, печени, кожи и т. п.). В культуре же функциональные особенности отдельно взятой клетки будут направлены, скорее всего, на ее адаптацию к условиям *in vitro*, что не может не отразиться на ее форме. Таким образом, форма клетки становится одним из проявлений ее функционирования, от реализации которого зависит успех ее адаптации к условиям культуры. Например, клетки, адаптированные к росту на подложке (т. е. растущие в виде монослоя), не могут размножаться в условиях суспензии. Они обязательно должны пройти стадию распластывания, прежде чем округлиться для вхождения в митоз. В то же время клетки, адаптированные к росту в суспензии, легко пролиферируют, постоянно находясь в форме шара (Петров и др., 1981а, 1981б). Следовательно, есть основание считать, что форма клетки очень важна для ее выживания в условиях *in vitro*. Это в свою очередь указывает на возрастание роли параметров, характеризующих форму

культивируемых клеток, при изучении их поведения в культуре.

В отличие от клеток организма морфофункциональная специфика культивируемых клеток детерминирована принадлежностью к ткани или органу (и как следствие прямыми, непосредственными контактами между клетками), а фазой роста культуры. Сразу после посева монослойной культуры клеткам необходимо сначала закрепиться на субстрате, и только затем они переходят к распластыванию. При этом форма клеток, как правило, еще близка к правильному кругу (Петров и др., 2015) и никаких прямых межклеточных взаимодействий еще нет. И только при формировании монослоя форма клеток начинает в значительной степени зависеть от прямого межклеточного взаимодействия. Важно отметить, что как в начале лаг-фазы, так и в плотном монослое у клеток отсутствуют филоподии или подобные им отростки. Эти структуры если и проявляются у культивируемых клеток, то они наиболее заметны в редкой культуре во время перехода ее от лаг-фазы к логарифмической. Именно поэтому для решения поставленной задачи нами были отобраны популяции клеток через 1—2 сут после посева, когда при минимальных прямых контактах друг с другом, каждая клетка максимально проявляет свои индивидуальные возможности к (ре)моделированию своей формы.

При отборе для работы минимального числа клеточных линий мы не старались отбирать их тенденциозно, рассчитывая на заведомо положительный результат. Именно поэтому для работы были использованы препараты клеток (контрольные), с которыми мы уже работали ранее, решая иные задачи. Тем не менее важно подчеркнуть, что клетки линий HeLa-M, NCTC клон 929, CHO и 3T3-N1H — это наиболее часто используемые в различных лабораториях и для различных целей культуры клеток постоянных (иммортизированных) линий, а из диплоидных (неиммортизированных) культур популярны мезенхимные клетки и кератиноциты.

Используемые нами ранее такие параметры, как площадь клетки и ее коэффициенты распластывания и поляризации, полезны для сравнения популяций различных клеточных линий, однако для дифференциации клеток на эпителио- и фибробластоподобные типы они оказываются недостаточно адекватными. По этой причине мы ввели три новых показателя, которые вместе отражают три важных качества, по которым можно судить о (степени) принадлежности клеток к тому или иному типу. Важным принципиальным отличием этих показателей от отдельно взятых параметров является то, что, дополняя друг друга, они могут помочь количественно оценить вклад каждого из трех фенотипических признаков, характеризующих форму культивируемой клетки — наличие филоподиеподобных отростков, вытянутость и степень сходства с правильным кругом. Основным практический вывод, который, по-видимому, можно принять, как правило следующий: если клетки одной линии хотя бы по одному из показателей EF резко отличны от клеток другой линии, причем эти значения лежат вблизи представленных выше соответствующих средних значений показателей для эпителио- и фибробластоподобной форм клеток, то они безусловно принадлежат к разным клеточным типам.

Полученный нами результат объективно подтверждает факт наличия у культивируемых клеток эпителио- и фибробластоподобного типов, но только для разрыхленных культур. Несмотря на минимальную выборку используемых нами клеточных линий (по 3 на тип), можно

сказать, что наиболее точно охарактеризовать принадлежность к клеточному типу могут показатели EF1 и EF3. Показатель EF2 не столь надежен, однако его вклад в общую оценку минимален, и даже для клеток с явно выраженной поляризацией его величина в среднем составляет всего около 5%. Тем не менее EF2 следует обязательно использовать в комплекте с EF1 и EF3, так как он, отражая одну из важных характеристик клетки, позволяет судить о принадлежности данной линии к тому или иному клеточному типу. Здесь вопрос, скорее, технический. Поскольку величина EF2 невелика, постольку для получения надежного (в смысле достоверности) результата необходимо увеличение выборки (не количества клеток, а числа различных исследуемых линий).

Если в дальнейшем при увеличении числа охарактеризованных по показателям EF клеточных линий и популяций клеток, адаптированных к условиям *in vitro*, достоверность различий между клетками эпителио- и фибробластоподобного типов будет только подтверждаться, то это потребует исследования фундаментальных причин дифференциации культивируемых клеток на эти два фенотипически различных морфологических типа. Пока можно лишь в общем предположить, что условия *in vitro* в отличие от условий *in vivo* таковы, что они вынуждают клетки в процессе адаптации к существованию вне организма реализовывать, скажем так, тот или иной тип «программы» вариативности клеточной формы, который был заложен в них еще в период эмбриогенеза.

#### Список литературы

- Бозо И. Я., Деев Р. В., Пинаев Г. П. 2010. «Фибробласт» — специализированная клетка или функциональное состояние клеток мезенхимного происхождения? Цитология. 52 (2): 99—109. (Bozo I. J., Deev R. V., Pinaev G. P. 2010. Is «fibroblast» a specialized cell or a functional condition of mesenchymal cells derivatives? Tsitologiya. 52 (2): 99—109.)
- Петров Ю. П., Андреева Е. В., Пинаев Г. П. 1981a. Противоточное распределение клеток монослойной и суспензионной культур линии L в двухфазной полимерной системе. Цитология. 23 (10): 1188—1192. (Petrov Yu. P., Andreeva E. V., Pinaev G. P. 1981a. Countercurrent distribution of L line monolayer and suspension cell cultures in a 2-phase polymer system. Tsitologiya. 23 (10): 1188—1192.)
- Петров Ю. П., Андреева Е. В., Пинаев Г. П. 1981b. Сравнение свойств поверхности клеток монослойной и суспензионной сублиний L на разных стадиях роста культуры. Цитология. 23 (10): 1213—1214. (Petrov Yu. P., Andreeva E. V., Pinaev G. P. 1981b. Comparison of properties of cell surface of monolayer and suspensional sublines L on different stages of culture growth. Tsitologiya. 23 (10): 1213—1214.)
- Петров Ю. П., Негуляев Ю. А., Цупкина Н. В. 2014. Солокализация ядрышек в ядрах клеток линии HeLa. Цитология. 56 (3): 197—203. (Petrov Yu. P., Negulyaev Yu. A., Tsupkina N. V. 2014. Colocalization of nucleoli in cell nuclei of HeLa line. Tsitologiya. 56 (3): 197—203.)
- Петров Ю. П., Негуляев Ю. А., Цупкина Н. В. 2015. Особенности распластывания клеток NCTC клон 929 после посева. Цитология. 57 (5): 370—378. (Petrov Yu. P., Negulyaev Yu. A., Tsupkina N. V. 2015. Spreading of NCTC clone 929 cells after reseeding. Tsitologiya. 57 (5): 370—378.)
- Петров Ю. П., Цупкина Н. В. 2012. Особенности роста культуры клеток линии CHO. Цитология. 54 (10): 754—760. (Petrov Yu. P., Tsupkina N. V. 2012. Growth features of CHO cells in culture. Tsitologiya. 54 (10): 754—760.)
- 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 day after reseeding. *Tsitologiya*. 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 5 passages after production of primary culture. *Tsitologiya*. 59 (1) : 62—68.)

Спичкина О. Г., Пинаев Г. П., Петров Ю. П. 2008. Анализ гетерогенности кератиноцитов человека, взаимодействующих с иммобилизованными фибронектином, коллагенами I и IV типов. *Цитология*. 50 (3) : 210—217. (Spichkina O. G., Pinaev G. P., Petrov Yu. P. 2008. Analysis of heterogeneity of human keratinocytes interacting with immobilized fibronectin and collagens I and IV types. *Tsitologiya*. 50 (3) : 210—217.)

Kohn D. B. 2017. Historical perspective on the current renaissance for hematopoietic stem cell gene therapy. *Hematol. Oncol. Clin. North. Amer.* 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.

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

Поступила 26 III 2018

#### COMPARATIVE MORPHOMETRY OF CELLS OF EPITHELIOID AND FIBROBLAST-LIKE TYPES IN CULTURE

Yu. P. Petrov,\* N. V. Tsupkina

Institute of Cytology Russian Academy of Sciences, St. Petersburg;

\* e-mail: yupe3ov@mail.ru

It is visually possible to observe two morphological type of cultivated cells — epithelioid and fibroblast-like. Rounded and sedentary cells apply to the first type. The second type cells have the lengthened form and filopodium-like protrusions. It is obvious that these characteristics are substantially subjective, therefore it complicates studying the biology of cells adapted for growth in culture. We propose the quantitative characteristic of cell shape — indicators EF. We have shown that epithelioid cells have  $EF1 = 15.4 \pm 2.6 \%$ ,  $EF2 = 2.9 \pm 1.9 \%$ ,  $EF3 = 81.7 \pm 3.2 \%$ , and fibroblast-like cells have accordingly  $39.9 \pm 5.9 \%$ ,  $4.5 \pm 0.4 \%$ ,  $55.6 \pm 5.6 \%$ . It was concluded that if the cells of the two lines differ in at least one of the EF indicators, they can be attached to different types of cells.

Key words: cell shape, filopodia, cell polarization