
МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ФОРМЫ КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ ЧЕЛОВЕКА, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ *IN VITRO**

О.С. Стрелкова, Ю.Н. Гусарова,
О.Б. Саврова

Кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии
Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 6, Москва, Россия, ГСП, 117198

И.Б. Алиева

Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
Москва, Россия, 119992

Форма клеток различных тканей организма зависит от выполняемой ими функции и в норме может служить морфологическим критерием, по которому производится классификация тканей организма. Клетки изменяют свою форму в ответ на внутренние и внешние воздействия *in vivo* и *in vitro*, изменение формы является критерием трансформации клеток при злокачественном перерождении. В настоящее время одним из широко используемых методов определения степени трансформации клеток является электронная микроскопия. Несомненным достоинством метода является то, что изменение морфологии самой клетки, а также внутриклеточных органоидов, возможно анализировать на ультраструктурном уровне, что делает анализ высокоинформативным и достоверным. Однако метод электронной микроскопии достаточно трудоемок, а значит для анализа требуется проводить предварительный отбор клеток. В настоящей работе предлагается метод предварительного морфологического анализа субпопуляции клеток карциномы человека, позволяющий оценить степень трансформации клеток по сравнению с нормой.

Ключевые слова: морфологический анализ, форма клеток, клетки карциномы человека *in vitro*.

Одной из первичных морфологических характеристик клетки в составе ткани является ее форма. Клетки различных тканей организма крайне переменчивы по форме, которая зависит от выполняемой ими функции и в норме может служить морфологическим критерием, по которому производится классификация тканей организма. Клетки могут изменять свою форму в ходе физиологических процессов, происходящих в организме при нормальной жизнедеятельности (например, бокаловидные клетки теряют свою типичную форму после выброса секрета и восстанавливают ее по мере накопления новой порции секреторных гранул), а также в ответ на внутренние и внешние воздействия *in vitro* [1] и *in vivo* [2]. Кроме того, изменение формы является критерием трансформации клеток при злокачественном перерождении [3].

Целью исследования был выбор морфометрических параметров для количественного описания выделенных типов формы клеток карциномы человека *in vitro* и характеристики их отличий от нетрансформированных клеток.

* Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ (№ 09-04-00363 и № 12-04-00488).

Материалы и методы. В работе использовали клетки перевивной линии HeLa (первоначально клетки выделены из карциномы шейки матки в 1952 г). Клетки культивировали при 37 °С и 5% CO₂ в среде DMEM/F12 («Sigma», США) с добавлением 3% эмбриональной сыворотки и гентамицина. Для экспериментов клетки сажали на покровные стекла и культивировали в течение суток до достижения монослоя.

Получение цифровых изображений. Для исследования формы клетки, растущие на покровном стекле, фиксировали 1,5% раствором глутарового альдегида (Sigma, США) на физиологическом фосфатном буфере (PBS), pH = 6,8 в течение 10 мин. Полученные препараты фотографировали, используя микроскоп Nikon Eclipse TE2000 (Nikon Intech Co., Япония). Изображения записывали с помощью цифровой охлаждаемой ПЗС-камеры Hamamatsu ORCA-2 (Hamamatsu Photonics, Япония), управляемой программой MetaView (Universal Imaging, США), используя объектив 60/1,4. Разрешение полученных 12 битных изображений составляло 9 пиксел/мкм. Обработка изображений проводилась в программе Adobe Photoshop (Adobe Inc., США).

Количественная оценка морфометрических параметров. В ходе исследования проводили морфометрический анализ клеток, используя следующие параметры для измерения: периметр клетки, площадь клетки и ее ламеллы. Для оценки извилистости края клетки (отклонения формы анализируемой клетки от формы круга) использовали U-index — соотношение периметра и площади клетки, рассчитанное по формуле $U = P / (2\sqrt{\pi \cdot S})$, предложенной ранее [4]. Данные обрабатывали статистически в программе Sigma Plot 7.1 (SPSS Science, США) и Excel (Microsoft Corp., США).

Результаты и обсуждение. Клетки HeLa (карциномы шейки матки) имеют эпителиальное происхождение. В норме выделенные в культуру эпителиальные клетки имеют правильную округлую или полигональную форму и не имеют выраженной полярности. Трансформированные клетки карциномы в культуре вариабельны по форме, могут поляризоваться, их ламелла может формировать стабильные края, их цитоплазма способна образовать отростки, иногда значительные по длине. Таким образом, первой задачей настоящего исследования был выбор признака, по которому можно было бы разделить все морфологические формы клеток HeLa на группы. Таким критерием для характеристики формы клеток *in vitro* было выбрано количество стабильных краев на ее ламелле. Используя этот критерий, выделяли следующие морфологические типы формы клеток: округлые (не имеющие стабильных краев) (рис. 1а), дисковидные (с единственным стабильным краем) (рис. 1б), фибробластоподобные (имеющие два стабильных края) (рис. 1в), звездчатые (имеющие более двух стабильных краев) (рис. 1г). Соотношение клеток различных морфологических типов в культуре карциномы шейки матки HeLa значительно различается — преобладают клетки с измененной морфологией, имеющие стабильные края и отростки, а округлые клетки нормальной формы составляют около 30% (рис. 2). В работе анализировали следующие параметры: периметр клетки, ее площадь, площадь ламеллы, отношение периметра к площади. Оказалось, что средние значения периметров клеток выделенных форм различаются незначительно (не более, чем на 10%) и составляют в среднем $208,61 \pm 8,52$ мкм

(табл. 1; рис. 3а). Площади клеток различались существенно (рис. 3б); наибольшая площадь была у дисковидных клеток ($2576,39 \pm 277,82 \text{ мкм}^2$), она в 2 раза превосходила площадь звездчатых клеток ($1393,73 \pm 90,59 \text{ мкм}^2$). Площадь ламеллы клеток разной формы напрямую зависела от площади клетки в целом: с увеличением площади клетки величина ламеллы также возрастала, с уменьшением — падала (рис. 3в).

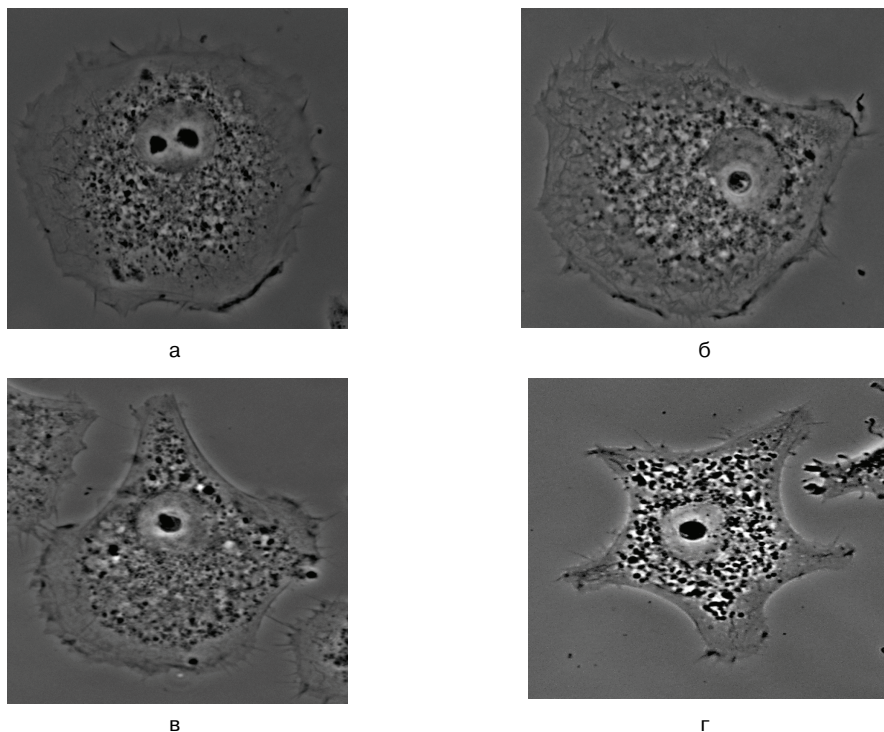


Рис. 1. Морфологические типы формы клеток в культуре карциномы шейки матки HeLa:

а) округлые клетки, по всему периметру которых располагается активный край: стабильные края отсутствуют, выраженных выростов цитоплазмы не наблюдается; б) дисковидные клетки с единственным стабильным краем: весь периметр клетки является активным, кроме одного выраженного стабильного края; в) фибробластоподобные клетки: имеющие один выраженный активный край ламеллы, сформированный в направлении движения клетки, и противоположный «хвостовой» отдел; г) звездчатые клетки: клетки с более чем одним стабильным краем и выраженными «активными» отростками

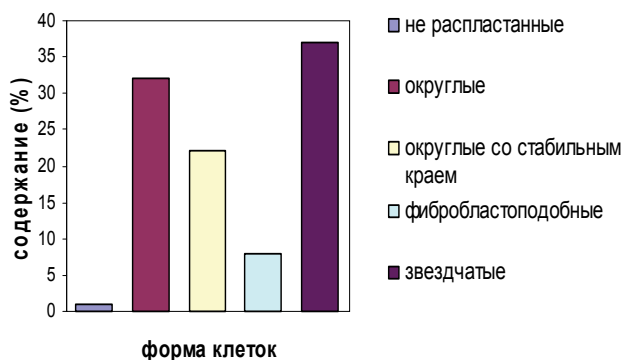


Рис. 2. Соотношение клеток различных морфологических форм в культуре карциномы шейки матки HeLa

Средние значения периметров и площадей клеток выделенных типов

Форма клетки	Периметр клетки, мкм ($x \pm SD$)	Площадь клетки, мкм ² ($x \pm SD$)	Площадь ламеллы, мкм ² $x \pm SD$
Округлая	191,4 ± 7,0	2264,3 ± 196,9	1229,1 ± 158,6
Дисковидная	212,2 ± 9,9	2576,4 ± 277,8	1390,0 ± 191,5
Фибробластоподобная	201,4 ± 6,8	1973,7 ± 172,1	938,6 ± 100,9
Звездчатая	229,3 ± 10,3	1393,7 ± 90,6	652,4 ± 62,1

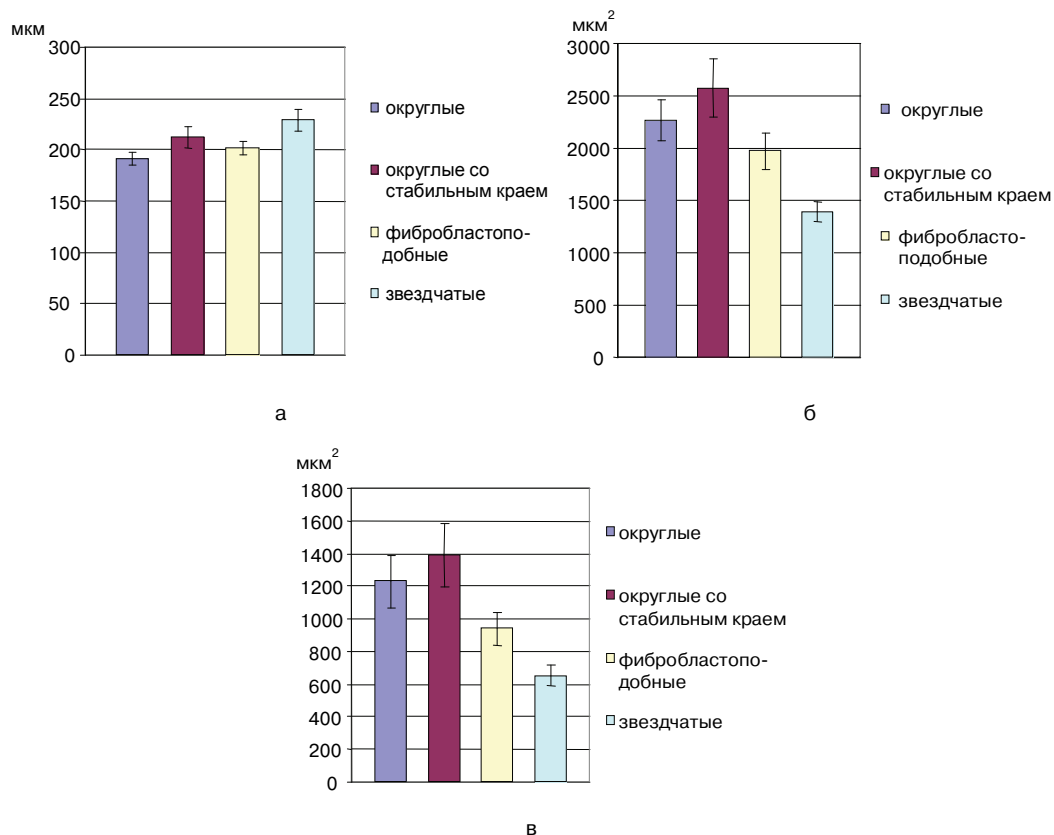


Рис. 3. Зависимость средних значений периметра клетки (а), среднего значения площади клетки (б) и площади ламеллы (в) от ее формы в культуре карциномы шейки матки HeLa.

На всех графиках: первый столбец слева — округлые клетки; второй — дисковидные клетки; третий — фибробластоподобные клетки; четвертый — звездчатые клетки

Для характеристики извилистости края клетки использовали *U*-index — соотношение периметра и площади клетки, рассчитанное по формуле, предложенной ранее для оценки формы поперечного сечения сухожилий [4] (рис. 4). По этой формуле *U*-index для круга равен единице [4]. *U*-index минимален для клеток первых двух выделенных типов (1,13—1,18 мкм⁻¹), чуть выше у фибробластоподобных (1,28 мкм⁻¹) и максимально — у звездчатых клеток (1,73 мкм⁻¹), имеющих наиболее «извилистый» край. Таким образом, предложенный параметр — *U*-index — позволяет наиболее эффективно оценить, насколько форма данной клетки отличается от округлой, а, следовательно — от нормальной, типичной для эпителия.

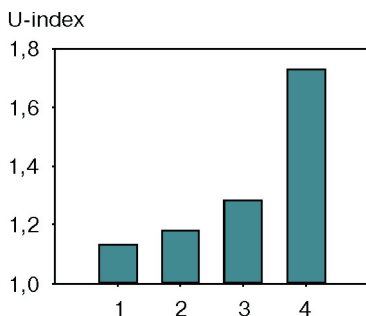


Рис. 4. Зависимость средних значений U index'a клетки от ее формы в культуре карциномы шейки матки HeLa.

Первый столбец слева — округлые клетки; второй — дисковидные клетки; третий — фибро-бластоподобные клетки; четвертый — звездчатые клетки

Актуальность применения морфологического анализа субпопуляции клеток карциномы определяется необходимостью предварительной дифференциации клеток при использовании целого ряда трудоемких методов, таких как электронная микроскопия. Согласно проведенному нами исследованию, для оценки отклонения формы клетки от нормальной можно использовать такие параметры, как площадь клетки и ее ламеллы (площадь трансформированных клеток значительно снижается по сравнению с нормой). Однако наиболее целесообразно использовать U-index (соотношение периметра клетки к ее площади), являющееся характеристикой степени извилистости края клетки и показывающее, насколько форма клетки отличается от круглой, характерной для эпителия в норме.

Предложенные параметры могут быть использованы как для первичного анализа морфологических форм субпопуляций клеток различных карцином человека, так и для предварительного отбора клеток с разной степенью трансформации для специальных методов исследования, например, для электронно-микроскопического анализа

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Смурова К.М., Бирюкова А.А., Гарсия Д., Воробьев И.А., Алиева И.Б., Верин А.Д. Реорганизация системы микротрубочек в клетках легочного эндотелия в ответ на воздействие тромбина. Цитология. — 2004. — Т. 46 — № 8. — С. 695—703.
- [2] Lucas R., Yang G., Gorshkov B.A., Zemskov E.A., Sridhar S., Umopathy N.S., Jezierska-Drutel A., Alieva I.B., Leustik M., Hossain H., Fischer B., Catravas J.D., Verin A.D., Pittet J.F., Caldwell R.B., Mitchell T.J., Cederbaum S.D., Fulton D.J., Matthay M.A., Caldwell R.W., Romero M.J., Chakraborty T. Protein Kinase C- α and Arginase I Mediate Pneumolysin-Induced Pulmonary Endothelial Hyperpermeability // *Am J Respir Cell Mol Biol.* — 2012. — V. 47 — № 4. — P. 445—453.
- [3] Fearon E.R., Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis // *Cell.* — 1990. — V. 61. — № 8. — P. 759—767.
- [4] Delalande A., Bouakaz A., Renault G., Tabareau F., Kotopoulis S., Midoux P., Arbellé B., Uzbekov R., Chakravarti S., Postema M., Pichon C. Ultrasound and microbubble-assisted gene delivery in Achilles tendons: Long lasting gene expression and restoration of fibromodulin KO phenotype // *Journal of Controlled Release.* — 2011. — V. 156. — P. 223—230.

MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF SHAPE CHANGES IN HUMAN CARCINOMA CELLS IN VITRO

**O.S. Strelkova, Y.N. Gusarova,
O.B. Savrova**

Department of Histology, Cytology and Embryology
People's Friendship University of Russia
Mikluho-Maklaya str., 6, Moscow, Russia, 117198

I.B. Alieva

Institute of physico-chemical biology n.a. A.N. Belozersky
Moscow State University n.a. M.V. Lomonosov
Lenins' hills, 1 b. 40, Moscow, Russia, 119992

Cell shape of various body tissues depends on cell functions and may serve as the morphological criterion for tissues classification. Cells change their shapes in response to internal and external factors in vivo and in vitro and it is the criterion of cells transformation in malignization. One of the widely used methods for detection of the cell transformation grade is an electronic microscopy. The apparent advantage of the method is that the morphological changes of the cell as well as the intracellular organelles can be analyzed on the ultrastructural level, which makes the analysis highly informative and reliable. However, the electronic microscopy method is very laborious, and thus for the analysis it is necessary to conduct pre-selectetion of cells. This study proposes a method of pre-morphological analysis of subpopulations of human carcinoma cells, which allows assessing the cell transformation degree compared to the normal cells.

Key words: Morphological analysis, shape of cells, human carcinoma cells *in vitro*.