

<https://doi.org/10.3176/biol.1973.3.09>

УДК 576.311:578.086.3

ТООМАС ВЕЙДЕБАУМ, ЮРИ КЯРНЕР

## ВЛИЯНИЕ КОЛХИЦИНА НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ ФИБРОБЛАСТОВ КУРИНЫХ ЭМБРИОНОВ В ТКАНЕВОЙ КУЛЬТУРЕ

В работах последнего времени предполагается, что колхицин специфично связывает белки микротрубочек (Borisy, Taylor, 1967a, b; Weisenberg и др., 1968), вызывая блокирование расхождения хромосом и другие нарушения клеточной деятельности. Так, прекращается движение органоидов (Freed и др., 1968) и самих клеток в тканевой культуре (Васильев и др., 1972). Несомненный интерес представляют при этом внутриклеточные изменения, которым в литературе уделяется еще мало внимания.

В данной работе изучались особенности ультраструктуры фибробластов куриных эмбрионов тканевых культур под влиянием колхицина.

### Материал и методика

Изучались культуры кожно-мышечной ткани 8—10-суточных куриных эмбрионов. Трипсинизированные культуры были изготовлены по стандартной методике (Reřabek, Reřabek, 1960). Культуры выращивались на покровных стеклах во флаконах из-под пенициллина. В качестве питательной среды использовалась среда для фибробластов (Puck и др., 1956) следующего состава: синтетическая среда-199 — 10%, телячья сыворотка — 17, эмбриональный экстракт — 4, физиологический раствор Хенкса или Эрла — 69%.

Всего изучено 24 серии тканевых культур в латентной фазе развития. Колхицин добавлялся в питательную среду через 24—48 ч после посева в конечной концентрации 5 мкг/мл. Культуры изучались в течение 3 ч с интервалами через каждые 30 мин.

Для электронномикроскопического исследования культуры фиксировались по Гирш и Федорко (Hirsch, Fedorko, 1968) в смеси глутаральдегида и тетроксидна осмия. Вместо какодилатного буфера применялся коллидиновый (Bennett, Luft, 1959). Фиксированные и обезвоженные клетки снимались со стекла лезвием бритвы и заливались в эпон 812 или в смесь аралдита и эпона 812 (Mollenhauer, 1964).

Ультратонкие срезы были изготовлены на ультрамикротоме ЛКБ-8800. По мере надобности срезы дополнительно контрастировались с ацетатом уранила и цитратом свинца по Рейнольдсу (Reynolds, 1963). Срезы просматривались в электронном микроскопе УЭМВ-100В.

## Результаты

Фибробласты тканевых культур отличаются обширным комплексом Гольджи в околоядерной зоне (рис. 1). Отдельные диктиосомы состоят из 3—5 уплощенных мешков, которые окружены как гладкими, так и окаймленными мелкими пузырьками. Немногочисленные более крупные вакуоли располагаются вблизи формирующей стороны диктиосом. В основном матриксе видны микротрубочки и микрофиламенты.

В течение первых часов после добавления колхицина в питательную среду тканевой культуры комплекс Гольджи претерпевает ряд изменений (рис. 2). Количество диктиосом и мелких пузырьков в околоядерной зоне явно уменьшено. Некоторые оставшиеся диктиосомы характеризуются расширенными мешками, в других же нарушена упорядоченность расположения элементов. Следует отметить, что сохранившиеся микротрубочки наблюдаются в зоне таких измененных диктиосом. Хорошо выражены в подопытных клетках переходные мембранные структуры между шероховатой эндоплазматической сетью и диктиосомами. Светлые вакуоли, описанные в контрольных культурах у формирующей стороны диктиосом, служат теперь прямым продолжением цистерн шероховатой эндоплазматической сети.

Плотные тельца под влиянием колхицина претерпевают также ряд изменений. В контрольных культурах эти образования окружены одной мембраной (рис. 3). Они содержат мелкозернистый, весьма плотный матрикс и в различном количестве пузырьки и вакуоли. В подопытных клетках плотные тельца имеют неравномерные контуры (рис. 4, 6). Под их внешней мембраной появляется светлая зона. Формы разложения рассматриваемых структур различны (рис. 4, 5, 6), что выражается отпочкованием пузырьков и вакуолей. После 2—3-часового опыта во многих клетках обнаруживается множество вакуолей (рис. 7), которые по своим размерам сравнимы с предсуществующими плотными тельцами. Вакуоли эти содержат единичные пузырьки и малоконтрастный фибриллярный материал.

Эндоплазматическая сеть в контрольных культурах представлена немногочисленными вакуолями и единичными цистернами вокруг плотных телец (рис. 3). В подопытных клетках количество цистерн эндоплазматической сети вокруг разлагаемых плотных телец увеличено (рис. 4, 6). Цистерны содержат плотный материал и покрыты рибосомами. В отдельных случаях наблюдается контакт их с плотными тельцами (рис. 6) и с вакуолями (рис. 7). В конце опыта (через 3 ч после добавления колхицина) местами обнаружены скопления цистерн эндоплазматической сети (рис. 8).

Из других особенностей воздействия колхицина надо отметить увеличение количества микрофиламентов, которые располагаются часто пучками под плазматической мембраной (рис. 4, 7). В большинстве случаев полость перегородок митохондрий расширена (рис. 4, 5).

## Обсуждение

По нашим наблюдениям, в обработанных колхицином клетках происходит редукция комплекса Гольджи, разложение предсуществующих плотных телец и увеличение количества цистерн эндоплазматической сети вокруг них. Как показывают автордиографические (Jamieson, Palade, 1966, 1967a, б), цитохимические (Friend, Murray, 1965) и биохимические (Siekevitz и др., 1967; Jamieson, Palade, 1968a, б) исследования, существует функциональная связь между комплексом Гольджи и эндо-

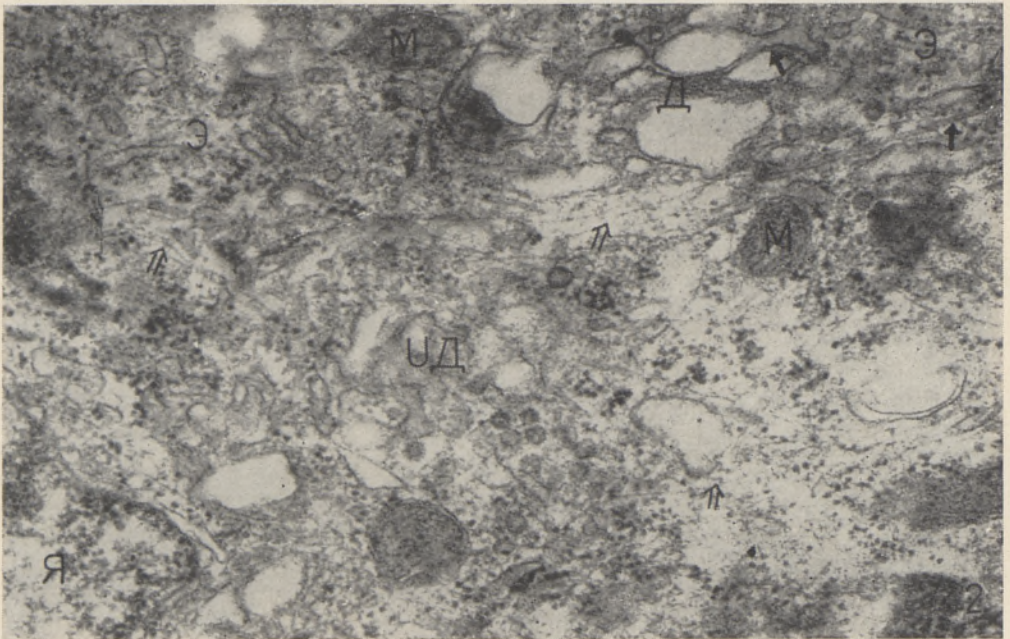
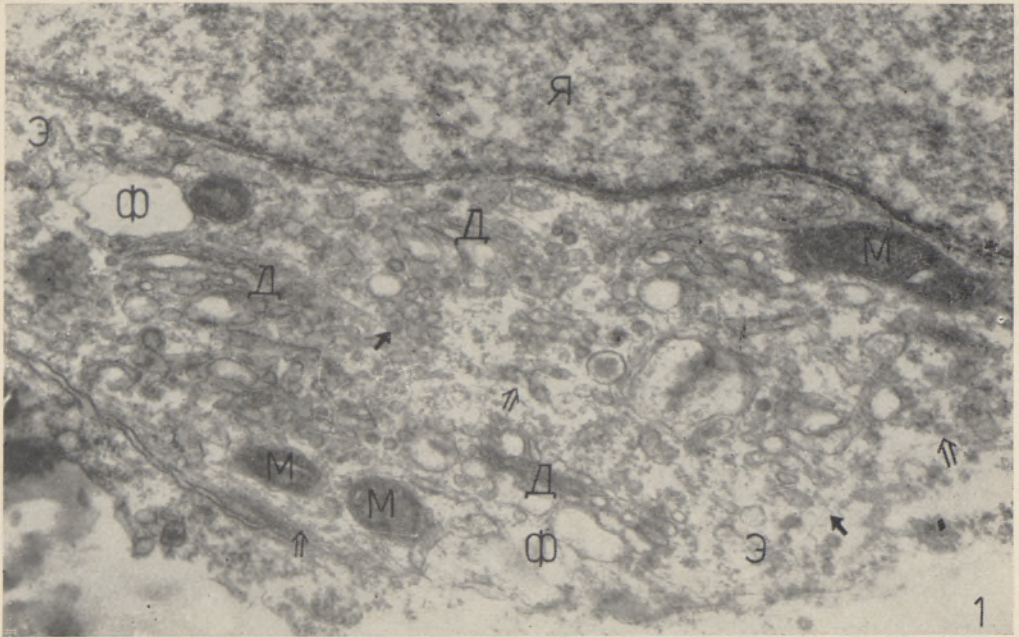


Рис. 1. Комплекс Гольджи эмбрионального фибробласта курицы в тканевой культуре. Я — ядро; Д — диктиосомы; Ф — вакуоли у формирующей стороны диктиосом; М — митохондрии; Э — эндоплазматическая сеть; жирные стрелки — микротрубочки; двойные стрелки — микрофиламенты. Увел. 37 500X.

Рис. 2. Комплекс Гольджи эмбрионального фибробласта курицы в тканевой культуре, обработанной колхицином в течение 1 ч. Нарушено расположение мешков в диктиосоме (ид). Вакуоли в контакте (стрелка) с эндоплазматической сетью. Остальные обозначения см. рис. 1. Увел. 42 500X.

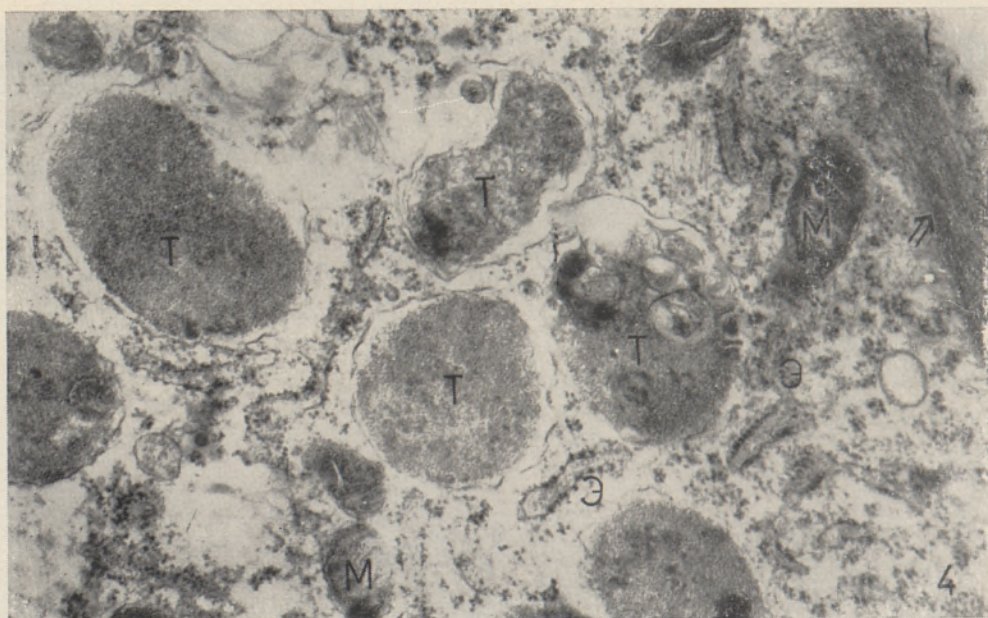
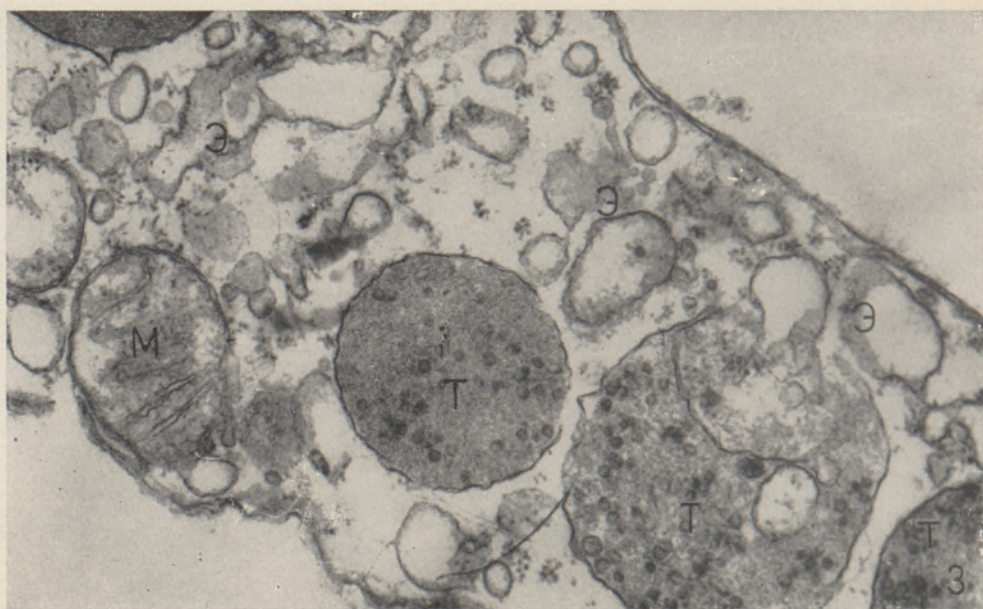


Рис 3. Плотные тельца (Т) и эндоплазматическая сеть в фибробласте эмбриональной куриной ткани. Обозначения см. рис. 1. Увел. 42 300×.

Рис. 4. Светлые зоны под мембранами плотных телец (Т) в фибробласте после однократной обработки колхицином. Цистерны с плотным содержанием между тельцами. Остальные обозначения см. рис. 1. Увел. 33 200×.

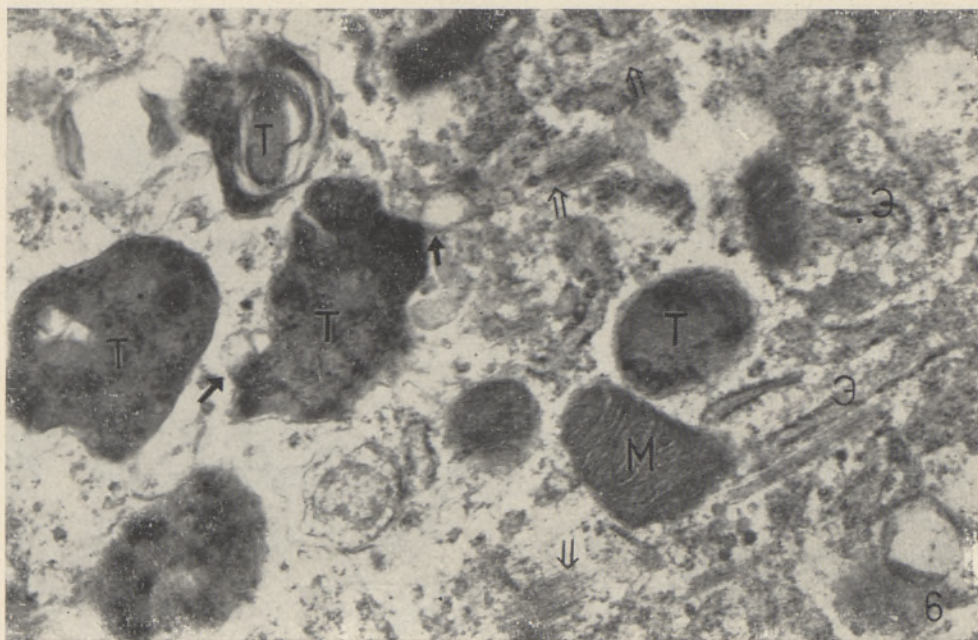
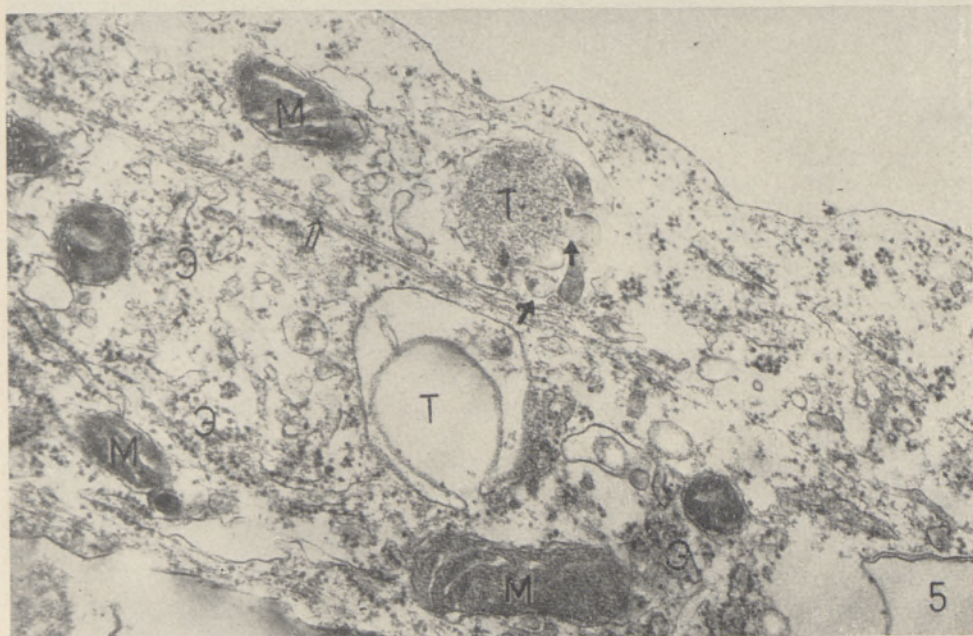


Рис. 5—6. Разные стадии разложения плотных телец в фибробластах, обработанных колхицином в течение 1 ч. Отпочкование пузырьков от плотных телец (стрелки) и увеличенное количество цистерн эндоплазматической сети вокруг них. Обозначения см. рис. 1. Увел. 29 700×.

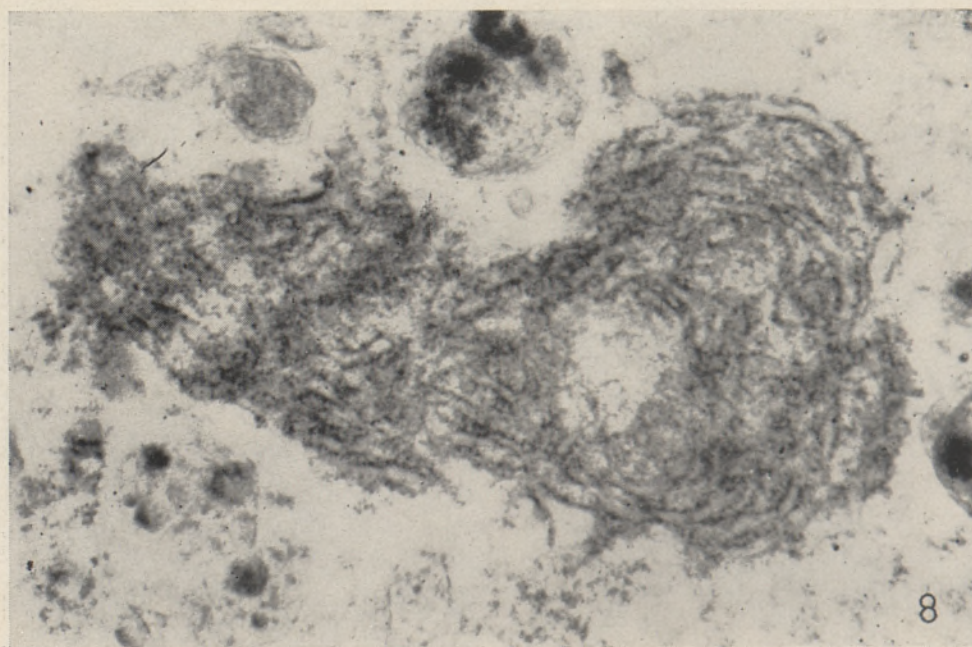
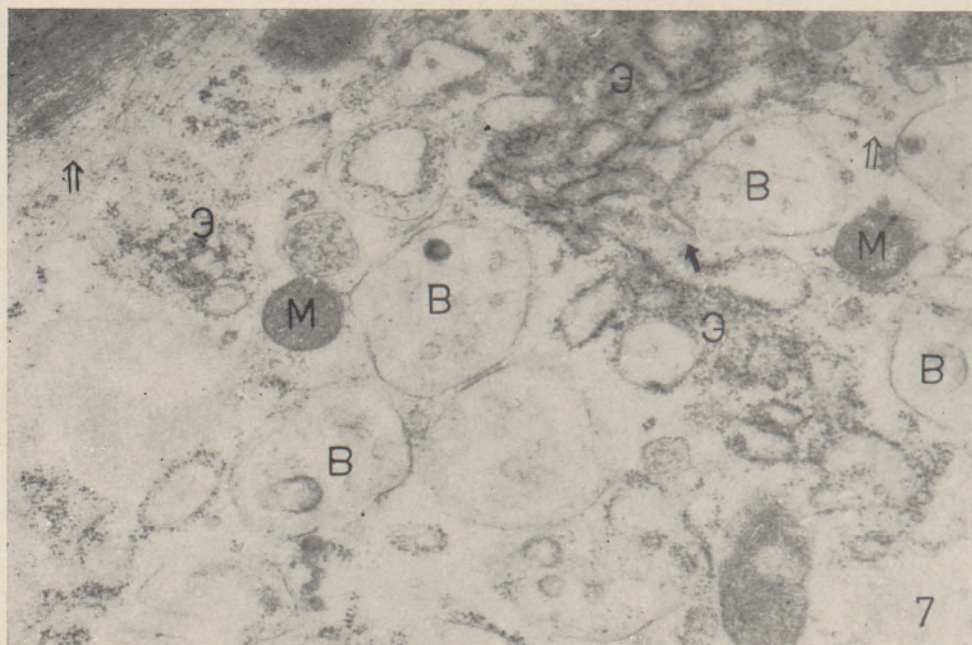


Рис. 7. Вакуоли (В) как дериваты плотных телец в фибробласте 2-часового опыта. Скопление цистерн между вакуолями. Стрелка указывает на контакт вакуоли с цистернами. Обозначения см. рис. 1. Увел. 34 500X.

Рис. 8. Крупное скопление цистерн эндоплазматической сети в фибробласте после 3-часового опыта. Увел. 32 800X.

плазматической сетью. Процесс этот заключается в формировании пузырьков от эндоплазматической сети, которые, передвигаясь в зону Гольджи, сливаются друг с другом и образуют новые цистерны диктиосом аппарата Гольджи (см. обзор Moggé и др., 1971). Прекращение формирования диктиосом в наших опытах подтверждает гипотезу о нарушении интрацеллюлярного движения (Freed и др., 1968), которое препятствует, кроме всего прочего, транспорту мембран от эндоплазматической сети к комплексу Гольджи. Убедительным доказательством этого является наше наблюдение о том, что вакуоли, участвующие в формировании диктиосом в контрольных клетках, располагаются в подопытных клетках в тесном контакте с цистернами эндоплазматической сети вокруг диктиосом.

К настоящему времени накопился уже весьма обширный материал по проблеме лизосом (см. сборник статей под ред. Dingle, Fell, 1969). По мнению многих авторов, основной их функцией является интрацеллюлярное переваривание гетеро- и аутогенных продуктов. Известно, что разные патологические процессы характеризуются интенсивным появлением аутолизосом (цитосегрессом), в которых происходит аутолизис собственных компонентов клетки. Аутофагоцитоз в известной мере характерен и для развития первичной тканевой культуры после трипсинизации (Кярнер, 1968). Возникающие при этом аутолизосомы превращаются в плотные тельца (Кярнер, 1971). Материалы, откладывающиеся в лизосомах (в теллолизосомах, в остаточных тельцах), не поддаются перевариванию (см. обзоры de Duve, Wattiaux, 1966; Зотиков, Пинчук, 1969). С помощью колхицина нам удалось обнаружить совершенно новый аспект сущности таких структур. Корреляция между разложением плотных телец и увеличением количества цистерн шероховатой эндоплазматической сети вокруг них дает основание считать лизосомы такого рода резервным источником материала для внутриклеточной регенерации. Особенность локального скопления этих цистерн лишь вокруг плотных телец согласуется с точкой зрения о прекращении внутриклеточного движения, на котором мы коротко остановились выше.

### Заключение

Исследовалось изменение ультраструктур фибробластов куриных эмбрионов в тканевой культуре под влиянием колхицина (5 мкг/мл) в течение 3 ч. Фибробласты (через 24—48 ч после посева) характеризуются обширным комплексом Гольджи в околядерной зоне, множеством плотных телец и малоразвитой эндоплазматической сетью. Под влиянием колхицина комплекс Гольджи редуцируется, а плотные тельца разлагаются и превращаются в вакуоли. В то же время увеличивается количество цистерн шероховатой эндоплазматической сети вокруг разлагающихся плотных телец. Выдвигается гипотеза о возможной утилизации плотных телец для внутриклеточной регенерации. Описанные особенности ультраструктур фибробластов объясняются прекращением интрацеллюлярного движения под влиянием колхицина.

### ЛИТЕРАТУРА

- Васильев Ю. М., Гельфанд И. М., Домнина Л. В., Иванова О. Ю., Комм С. Г., Ольшевская Л. В., 1972. Действие метафазных ингибиторов на форму и движение фибробластов в культуре. Цитология 14 : 80.  
 Зотиков Л. А., Пинчук В. Г., 1969. Некоторые аспекты проблемы лизосом. Цитология 11 : 1205.  
 Кярнер Ю. К., 1968. Характеристика и идентификация лизосом в клетках тканевых культур. Автореф. канд. дисс., Тарту.

- Кярнер Ю. К., 1971. Связь лизосом с эндоплазматической сетью и с аппаратом Гольджи в фибробластах курицы в трипсинизированной тканевой культуре. Цитология 13 : 1204.
- Bennett H. S., Luft J. H., 1959. S-collidine as a basis buffering fixatives. J. biophys. biochem. cytol. 6 : 113.
- Borisy G. G., Taylor E. W., 1967a. The mechanism of action of colchicine-H<sup>3</sup> to cellular protein. J. cell. biol. 34 : 525.
- Borisy G. G., Taylor E. W., 1967b. The mechanism of action of colchicine. Colchicine binding to sea urchin eggs and the mitotic apparatus. J. cell. biol. 34 : 535.
- De Duve C., Wattiaux R., 1966. Functions of lysosomes. Ann. rev. physiol. 28 : 435.
- Dingle J. T., Fell H. B. (editors), 1969. Lysosomes in biology and pathology. Amsterdam—London.
- Freed J. J., Bhishey A. N., Lebowitz M. M., 1968. The relation of microtubules and microfilaments to the motility of cultured cells. J. cell. biol. 39 : 47A.
- Friend D. S., Murray M. J., 1965. Osmium impregnation of the Golgi apparatus. Am. J. anat. 117 : 135.
- Hirsch J. G., Fedorko M. E., 1968. Ultrastructure of human leukocytes after simultaneous fixation with glutaraldehyde and osmium tetroxide and "postfixation" in uranyl acetate. J. cell. biol. 38 : 615.
- Jamieson J. D., Palade G. E., 1966. Role of the Golgi complex in the intracellular transport of secretory proteins. Proc. nat. acad. sci. (Wash.) 55 : 424.
- Jamieson J. D., Palade G. E., 1967a. Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell. I. Role of the peripheral elements of the Golgi complex. J. cell. biol. 34 : 577.
- Jamieson J. D., Palade G. E., 1967b. Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell. 2. Transport of condensing vacuoles and zymogen granules. J. cell. biol. 34 : 597.
- Jamieson J. D., Palade G. E., 1968a. Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell. 3. Dissociation of intracellular transport from protein synthesis. J. cell. biol. 39 : 580.
- Jamieson J. D., Palade G. E., 1967a. Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell. 4. Metabolic requirements. J. cell. biol. 39 : 589.
- Mollenhauer H. H., 1964. Plastic embedding mixtures for use in electron microscopy. Stain technol. 39 : 111.
- Morré D., Mollenhauer H. H., Bracker C. E., 1971. Origin and continuity of Golgi apparatus. In: Origin and continuity of cell organelles, (ed. by Reinert J., Unsprung H.) Springer-Verlag : 82.
- Puck T. T., Marcus P. J., Cieciura S. J., 1956. Clonal growth of mammalian cells in vitro. Growth characteristics of colonies of single HeLa cells with and without a "freeder" layer. J. exp. med. 103 : 273.
- Reřabek J., Reřabek E., 1960. Leitfaden der Gewebezüchtung. VEB, Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Reynolds E. S., 1963. The use of lead, citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. cell. biol. 17 : 208.
- Siekevitz P., Palade G. E., Dallner G., Ohad I., Omura T., 1967. The biosynthesis of intracellular membranes. In: Organizational biosynthesis (ed. by Voger H. O., Lampen J. O., Bryson V.) N. Y.—London.
- Weisenberg R. C., Borisy G. G., Taylor E. W., 1968. The colchicine-binding protein of mammalian brain and its relation to microtubules. Biochemistry 7 : 4466.

Институт зоологии и ботаники  
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию  
24/I 1973

Тартуский государственный университет

TOOMAS VEIDEBAUM, JURI KÄRNER

### KOLHITSIINI MÕJUST KANA EMBRÜODE FIBROBLASTIDE ULTRASTRUKTUURILE KOEKULTUURIS

#### Resüme

Kolhitsiini (5 µg/ml) mõjul kana embrüo fibroblastide ultrastruktuuris toimunud muutusi uuriti 3 tunni kestel. 24—48 tundi pärast külvi iseloomustab fibroblaste laialdane Golgi kompleks tuumalähedases tsoonis, suur hulk tihedaid kehasid ja vähearenenud endoplasmaatiline retiikulum. Kolhitsiini mõjul redutseerub Golgi aparaat, tihedad kehad aga lagu-



nevad ja muutuvad vakuoolideks. Lagunevate tihedate kehade ümber suureneb samal ajal karepinnalise endoplasmaatilise retiikulumi tsisternide hulk. Saadud tulemuste põhjal püstitasid autorid hüpoteesi tihedate kehade võimalikust utiliseerimisest intratsellulaarses regenereeratsioonis. Kolhitsiini mõjul tekkivaid muutusi fibroblastide tsütoplasmas seletatakse intratsellulaarse kineesi lakkamisega.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia  
Zooloogia ja Botaanika Instituut  
Tartu Riiklik Ülikool

Toimetusse saabunud  
24. I 1973

TOOMAS VEIDEBAUM, JURI KARNER

THE INFLUENCE OF COLCHICINE ON THE ULTRASTRUCTURE  
OF CHICKEN EMBRYONIC FIBROBLASTS IN TISSUE CULTURE

Summary

The influence of colchicine (5 µg/ml) on the ultrastructure of chicken embryonic fibroblasts was studied. Fibroblasts characterized by large Golgi complex in juxtannuclear region, a great number of dense bodies, and in a scant rough-surfaced endoplasmic reticulum. During three hours after colchicine administration the Golgi complex diminished. The parallel arrangement of saccules was disturbed in some dictyosomes. Dense bodies fell into vesicles and vacuoles. At the same time a great number of cisternae of rough endoplasmic reticulum was observed around the dense bodies. These observations have led us to the hypothesis that the dense bodies may be utilized for intracellular regeneration. The alterations in the ultrastructure of the fibroblast described in the present paper may be explained by an inhibition of intracytoplasmic motion under the influence of colchicine.

Academy of Sciences of the Estonian SSR,  
Institute of Zoology and Botany  
Tartu State University

Received  
Jan. 24, 1973