



УДК 576.311.34:576.353.11

ПОВЕДЕНИЕ КЛЕТОЧНОГО ЦЕНТРА ПРИ РАСПЛАСТЫВАНИИ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТОВ

Г. О. Гудима, И. А. Воробьев, Ю. С. Ченцов

Ранее было показано [1], что при распластывании на стекле нормальных эмбриональных фибробластов мыши происходит активация образования микротрубочек (МТ) в клеточном центре, т. е. количество их в радиально распластанных и поляризованных клетках превышало соответствующую величину для клеток монослойной культуры. Кроме того, на этих стадиях активные центриоли были ориентированы преимущественно перпендикулярно плоскости субстрата. В настоящей работе мы провели электронно-микроскопическое исследование клеточного центра при распластывании *L*-клеток, чтобы выяснить, характерны ли для сильно трансформированных фибробластов закономерности поведения центриолей, обнаруженные в нормальных клетках.

Материалы и методы. В работе использована перевиваемая культура *L*-клеток (трансформированные фибробласты мыши). Клетки выращивали на среде, состоящей из девяти частей среды 199, девяти частей 0,5 %-ного гидролизата лактальбумина, двух частей сыворотки крупного рогатого скота с добавлением пенициллина и стрептомицина. Клетки отделяли от поверхности стекла с помощью трипсина и суспендировали в среде культивирования. Каплю суспензии наносили на покровное стекло, после чего клетки свободно оседали на его поверхность. Фиксацию для просвечивающей электронной микроскопии проводили по стандартной методике [3] через 20 мин (начальное прикрепление), 2 ч (радиальное распластывание), 1 сут (поляризация) и 3 сут (монослой) после прикрепления клеток к стеклу. Следует отметить, что стадия радиального распластывания в *L*-клетках выражена плохо [4], и поэтому выделение ее носит несколько условный характер. *L*-клетки фиксировали также в суспензии. Для лучшего выявления МТ на срезах клетки в указанные выше сроки перед фиксацией обрабатывали раствором неионного детергента тритон X-100. Обработка детергентом и процедура подготовки материала для электронной микроскопии описаны ранее [1, 2]. Серийные срезы залитых в эпон клеток изготавливали на ультратоме LKB III. Плоскость резания была параллельна плоскости субстрата с точностью до 1—2°. Срезы монтировали на покрытие формваровой подложкой бленды с отверстием 2×1 мм и окрашивали цитратом свинца по Рейнольдсу. Препараты просматривали и фотографировали на электронных микроскопах HU-11B и HU-12 при ускоряющем напряжении 75 кВ и JEM-100CX при ускоряющем напряжении 80 кВ.

МТ, отходящие от центриолей, подсчитывали на серийных срезах, проходящих через клеточный центр в обработанных детергентом клетках. Методика подсчета МТ различной длины на серийных срезах описана нами ранее [1]. Отдельно учитывали три группы МТ: а) короткие, не выходящие за пределы окружности диаметром 0,8 мкм, в середине которой находится центриоль, и продолжающиеся не более чем в двух соседних срезах; б) средние, один раз пересекающие окружность диаметром 0,8 мкм; в) длинные, один раз пересекающие окружность диаметром 2 мкм, в середине которой находится центриоль. Если МТ пересекала обе окружности, ее учитывали дважды — как среднюю и как длинную. МТ, два раза пересекающие указанные окружности, не учитывали. Используемая методика исключает повторный учет одной и той же МТ на серийных срезах и дает возможность дифференцированного подсчета МТ различной длины в районе клеточного центра.

Общую сумму МТ каждой группы делили на число просчитанных серийных срезов и использовали этот параметр для сравнения активности центриолей на разных этапах распластывания *L*-клеток.

Результаты и обсуждение. В *L*-клетках, находящихся внутри монослоя, каждая содержит две центриоли, располагающиеся вблизи друг от друга, формируя единый клеточный центр. По отношению к МТ центриоли неравнозначны — одна из них, имеющая придатки, является основным центром схождения МТ, т. е. активной (рис. 1, *a*, см. вклейку). Количество МТ, отходящих от активных центриолей в *L*-клетках, нахо-

Таблица 1

Количество микротрубочек, отходящих от активных центриолей на разных стадиях распластывания *L*-клеток

The average number of microtubules radiating from the active centrioles at different stages of spreading

Стадия распластывания	Количество микротрубочек на срез, $M \pm m$		
	Короткие	Средние	Длинные
Монослой (11)	$0,66 \pm 0,15$	$4,0 \pm 0,86$	$3,0 \pm 0,69$
Суспензия (21)	$2,5 \pm 0,31$	$2,7 \pm 0,33$	$1,6 \pm 0,16$
Начальное прикрепление (12)	$3,1 \pm 0,52$	$2,3 \pm 0,33$	$1,0 \pm 0,17$
Радиальное распластывание (12)	$2,28 \pm 0,40$	$4,22 \pm 0,36$	$3,15 \pm 0,42$
Поляризация (8)	$1,6 \pm 0,17$	$4,83 \pm 0,65$	$3,7 \pm 0,40$

Примечание. В скобках указано число просчитанных серий срезов.

Таблица 2

Положение клеточного центра в *L*-клетках на различных стадиях распластывания

The position of the centrosome in L-cells at different stages of spreading

Стадия распластывания	Положение клеточного центра			Количество клеток с разошедшимися центриолями
	Выше ядра	Сбоку от ядра	Ниже ядра	
Монослой (14)	2	5	7	0
Суспензия (5)	—	—	—	1
Начальное прикрепление (15)	4	6	5	3
Радиальное распластывание (15)	3	8	4	1
Поляризация (13)	0	10	3	0

Примечание. В скобках указано количество изученных клеток.

дящихся внутри монослоя, составляет $0,66 \pm 0,15$ коротких, $4,0 \pm 0,86$ средних и $3,0 \pm 0,69$ длинных МТ/срез ($M \pm m$) (табл. 1). Перичентриолярные сателлиты обнаруживаются на активной центриоли не всегда. От неактивных центриолей МТ практически не отходят (рис. 1, *b*, см. вклейку). На неактивных центриолях перичентриолярные сателлиты всегда отсутствуют. Ресничек в *L*-клетках обнаружено не было. Клеточный центр располагается, как правило, под ядром или сбоку от него (табл. 2). Из 27 изученных центриолей лишь 4 располагались под углом более 75° к плоскости субстрата.

В суспендированных *L*-клетках структура клеточного центра несколько изменяется (рис. 2, *a*, см. вклейку). Почти в четыре раза по сравнению с клетками монослоя возрастает число коротких МТ; количество длинных МТ, наоборот, падает примерно вдвое (табл. 1). Данные изменения статистически достоверны ($p < 0,01$). Уменьшение числа средних МТ в суспендированных клетках по сравнению с клетками монослойной культуры статистически недостоверно ($p > 0,05$).

В *L*-клетках, зафиксированных на стадии начального прикрепления, число коротких МТ, отходящих от активных центриолей, достигает максимума, в то время как число средних и длинных МТ — минимума

(табл. 1, рис. 2, б, см. вклейку). Клеточный центр в это время располагается примерно с равной вероятностью над ядром, сбоку от него или под ним (табл. 2). На стадии начального прикрепления встречаются иногда клетки с разошедшимися центриолями (разошедшимися мы считаем центриоли, удаленные друг от друга более чем на 2 мкм). Из 29 изученных центриолей лишь одна располагалась под углом более 75° к плоскости субстрата.

На стадии радиального распластывания в *L*-клетках центриоли располагаются чаще всего сбоку от ядра, с меньшей вероятностью — выше или ниже его (табл. 2). Лишь в одной клетке нам встретились разошедшиеся центриоли. В *L*-клетках на стадии радиального распластывания 2 из 30 центриолей располагались по отношению к плоскости субстрата под углом более 75° . В радиально распластанных *L*-клетках количество отходящих от активных центриолей коротких МТ не отличается достоверно от такового в клетках на стадии начального прикрепления (табл. 1, рис. 2, в, см. вклейку). Количество же средних и длинных МТ возрастает и достигает уровня, наблюдавшегося в клетках монослойной культуры (табл. 1, рис. 2, в).

В поляризованных *L*-клетках центриоли обнаруживались в основном сбоку от ядра, реже — под ним и не обнаруживались над ядром (табл. 2). В девяти из 13 изученных клеток центриоли располагались между ядром и ведущим краем клетки, в трех клетках — между ядром и боковым краем, и в одной — позади ядра. Три из 27 центриолей располагались под углом более 75° к плоскости субстрата. В поляризованных *L*-клетках количество коротких МТ уменьшается по сравнению с радиально распластанными *L*-клетками, но по-прежнему достоверно превышает соответствующую величину для клеток монослойной культуры (вероятность случайности различий в обоих вариантах $p < 0,01$). Количество средних и длинных МТ, отходящих от активных центриолей, не отличается достоверно от соответствующих величин, полученных для клеток на стадии радиального распластывания и в монослое (табл. 1, рис. 2, г, см. вклейку).

Анализ поведения клеточного центра при распластывании, поляризации и движения нормальных фибробластов и клеток линии ЗТЗ позволил выявить следующие закономерности [1, 2]. Во-первых, при суспендировании росших в монослое клеток резко меняется соотношение коротких и длинных МТ, отходящих от активных центриолей: коротких становится в 60 раз больше (от $0,1 \pm 0,03$ до $6,2 \pm 1,18$ МТ/срез), а количество длинных уменьшается в два раза (с $4,2 \pm 0,48$ до $2,1 \pm 0,46$ МТ/срез). Таким образом, при округлении фибробластов в процессе отделения от подложки длинные МТ разрушаются, но одновременно около центриолей появляется большее количество коротких МТ. Это может свидетельствовать об активации клеточного центра. Рост МТ за пределы клеточного центра становится возможным лишь после прикрепления фибробластов к субстрату. Максимально интенсивное образование МТ наблюдали на стадиях радиального распластывания и поляризации. При суспендировании *L*-клеток также происходит увеличение числа коротких МТ, но меньшее, чем в нормальных фибробластах (в четыре раза). На стадиях радиального распластывания и поляризации *L*-клеток наблюдается рост МТ за пределы клеточного центра, но число их достигает лишь уровня, обнаруженного в монослое, и практически не превышает его.

Сравнивая количество МТ, отходящих от активных центриолей, в ряду монослой — суспензия — радиальное распластывание — поляризованные клетки, мы должны отметить, что изменения, происходящие в клеточном центре *L*-клеток, выражены гораздо слабее, чем в нормальных фибробластах [1]. В частности, количество длинных и средних МТ в распластывающихся и поляризованных *L*-клетках практически не отличается от такового в клетках монослоя, в то время как в нормальных фибробластах число этих МТ увеличивается в два раза. Это свидетельствует о том, что в отличие от нормальных фибробластов в *L*-клетках

количество отходящих от активных центриолей протяженных МТ не зависит от того, контактируют клетки друг с другом или разобщены.

Активность центриолей в тот или иной период распластывания фибробластов характеризуется суммарным количеством отходящих от них коротких и средних МТ. Последние либо связаны с центриолями, либо начинаются в непосредственной близости от них. При подсчетах эти группы МТ не перекрываются (см. «Материалы и методы»). Длинные МТ могут быть не связаны с центриолями и располагаться на некотором удалении от них [1]. Кроме того, при подсчетах они могут частично перекрываться с группой средних МТ (см. «Материалы и методы»). При сравнении суммарного числа коротких и средних МТ, отходящих от активных центриолей на различных стадиях распластывания нормальных фибробластов, видно, что минимальное количество МТ обнаруживается в клетках монослойной культуры, а максимальное — на стадии радиального распластывания. В *L*-клетках минимальное и максимальное количество МТ, отходящих от активных центриолей, наблюдается на тех же стадиях. Однако в *L*-клетках суммарное количество коротких и средних МТ на стадии радиального распластывания ($6,5 \pm 0,54$ МТ/срез) хотя и превышает на 40 % соответствующую величину для клеток монослойной культуры ($4,66 \pm 0,87$ МТ/срез), но не отличается от нее статистически достоверно. В случае нормальных фибробластов сумма коротких и средних МТ на стадии радиального распластывания ($8,6 \pm 0,94$ МТ/срез) достоверно (в 2,5 раза) больше, чем в клетках монослоя ($3,5 \pm 0,43$ МТ/срез) [1]. Таким образом, в нормальных фибробластах, находящихся в контакте друг с другом в монослое, активность клеточного центра тормозится по сравнению с одиночными клетками. В *L*-клетках в условиях монослойной культуры достоверного снижения активности клеточного центра не происходит. В пользу этого заключения свидетельствует также тот факт, что в монослойной культуре *L*-клеток от активных центриолей отходит в 6,6 раза больше коротких МТ, чем в клетках монослоя нормальных фибробластов.

Вторая обнаруженная нами закономерность касается ориентации центриолей. В нормальных фибробластах и клетках линии *3Т3* активные центриоли располагаются преимущественно перпендикулярно плоскости субстрата на стадии радиального распластывания и при поляризации клеток [1, 2]. Такая же ориентация сохраняется в поляризованных и движущихся нормальных фибробластах. В *L*-клетках ориентации центриолей преимущественно перпендикулярно плоскости субстрата ни на одной стадии не обнаружено.

В-третьих, в поляризованных фибробластах центриоли располагаются между ядром и ведущим краем клетки [1, 2, 5—7]. Результаты исследований поляризованных *L*-клеток подтверждают эту закономерность.

Феномен неслучайного расположения активных центриолей по отношению к плоскости субстрата представляется на сегодняшний день совершенно загадочным. Впервые ориентация центриолей преимущественно перпендикулярно плоскости субстрата была обнаружена в распластывающихся после митоза клетках линии *СПЭВ* [8]. Предположение о наличии аналогичной ориентации центриолей в мигрирующих фибробластах было сделано при изучении их расположения в клетках *3Т3* [5]. Ориентация активных центриолей преимущественно перпендикулярно плоскости субстрата обнаружена нами в мышечных эмбриональных фибробластах на стадиях радиального распластывания и поляризации, а также для клеток *3Т3* при поляризации на краю пласта [1, 2]. В фибробластах неслучайное расположение центриолей коррелировало с активацией образования длинных МТ в клеточном центре. Интересно отметить, что в эпителиальных клетках, изученных в таком же эксперименте (распластывание и поляризация на стекле), ни усиления образования МТ, ни перпендикулярной ориентации центриолей к плоскости субстрата мы не обнаружили [9]. Аналогичная картина

наблюдается и в *L*-клетках. На основании вышесказанного мы полагаем, что неслучайная ориентация активных центриолей в фибробластах связана не просто с наличием отходящих от них протяженных МТ, как предполагалось ранее [5], а с усиленным образованием и элонгацией МТ в клеточном центре.

В последние годы вновь делаются попытки сравнить поведение центриолей и системы цитоскелета в нормальных и трансформированных клетках [10]. Рассматривая под этим углом зрения упорядоченное расположение центриолей и сравнивая нормальные фибробласты, клетки ЗТЗ и *L*-клетки, мы можем предположить, что оно связано со степенью трансформации клеток. В нормальных фибробластах активные центриоли ориентированы преимущественно перпендикулярно плоскости субстрата на стадии радиального расплывания и в поляризованных клетках [1]; в слабо трансформированных клетках линии ЗТЗ такая ориентация в процессе расплывания есть, но в поляризованных движущихся клетках она отсутствует [2]. В *L*-клетках ни при расплывании, ни в поляризованных клетках перпендикулярной ориентации центриолей к плоскости субстрата нет. Если указанная закономерность подтвердится и для других типов нормальных и трансформированных фибробластов, то можно будет надеяться связать поведение центриолей с проявлением нормального или опухолевого фенотипа.

BEHAVIOUR OF CENTROSOME IN THE SPREADING OF THE TRANSFORMED FIBROBLASTS

G. O. Gudima, I. A. Vorobjev, Yu. S. Chentsov

M. V. Lomonosov State University, Moscow

Summary

In *L*-strain fibroblasts at all stages of spreading (primary attachment, radial spreading, polarization, monolayer) centrioles are randomly oriented to the substrate plane. In polarized cells centrioles are located between the nucleus and the leading edge. In suspended cells short microtubules appear near the centrioles in a number exceeding that in monolayer culture cells. The outgrowth of microtubules from the centrosome is observed in radially spread and polarized *L*-cells. In contrast to normal murine fibroblasts the number of long and middle microtubules radiating from the active centrioles does not differ significantly in the radially spread, polarized and monolayer culture *L*-cells. This fact confirms the suggestion that the orientation of centrioles perpendicular to the substrate plane which is observed during the spreading and polarization of fibroblasts is connected with the intensified growth of microtubules from the centrosome. On the basis of a comparative analysis of the centrosome behaviour in normal, slightly transformed (ЗТЗ) and strongly transformed (*L*) fibroblasts the orientation of the active centrioles perpendicular to the substrate plane and the activation of microtubule formation in the centrosome during spreading and polarization is supposed to be dependent on a degree of morphological transformation of fibroblasts.

1. Гудима Г. О., Воробьев И. А., Ченцов Ю. С. Поведение клеточного центра при расплывании фибробластов // Биол. науки.— 1983.— № 7.— С. 45—50.
2. Гудима Г. О., Воробьев И. А., Ченцов Ю. С. Изменение структуры клеточного центра при поляризации и движении фибробластов // Цитология.— 1983.— 25, № 8.— С. 883—888.
3. Zatschina O. V., Polyakov V. Yu., Chentsov Yu. S. Some structural aspects of the fate of the nuclear envelope during mitosis // Cytobiologie.— 1977.— 16, N 1.— P. 130—144.
4. Ровенский Ю. А., Ольшевская Т. А. Динамика процесса расплывания нормальных фибробластоподобных клеток и малигнизированных фибробластов линии *L* на поверхности подложки // Цитология.— 1973.— 15, № 10.— С. 1029—1036.
5. Albrecht-Buehler G., Bushnell A. The orientation of centrioles in migrating ЗТЗ cells // Exp. Cell Res.— 1979.— 120, N 1.— P. 111—118.
6. Mechanochemical proteins, cell motility and cell-cell contacts: the localization of mechanochemical proteins inside cultured cells at the edge of an *in vitro* «wound» /

(Окончание см. на с. 100).

1. Marshall K. C. A lysogenic strain of *Rhizobium trifolii* // Nature.—1956.—177, N 4498.—P. 92.
2. Schwinghamer E. A., Reinhardt D. J. Lysogeny in *Rhizobium leguminosarum* and *Rh. trifolii* // Austr. J. Biol. Sci.—1963.—16, N 3.—P. 597—605.
3. Szende K., Ördögh F. Die Lysogenie von *Rhizobium meliloti* // Naturwissenschaften.—1960.—47, N 17.—S. 404—405.
4. Маранц Л. А., Москаленко Л. Н., Раутенштейн Я. И. Лизогения клубеньковых бактерий люцерны (*Rhizobium meliloti*) // Изв. АН СССР.—Сер. биол.—1973.—Вып. 5.—С. 720—728.
5. Москаленко Л. Н., Раутенштейн Я. И. Лизогения клубеньковых бактерий фасоли (*Rhizobium phaseoli*) // Микробиология.—1969.—38, № 2.—С. 340—345.
6. Андреева И. Н., Москаленко Л. Н. О некоторых особенностях экспериментально полученных лизогенных культур *Rhizobium japonicum* // Там же.—1982.—51, № 5.—С. 832—837.
7. Barnett Y. M., Vincent J. M. Lysogenic conversion of *Rhizobium trifolii* // J. Gen. Microbiol.—1970.—61, pt 3.—P. 319—325.
8. Kowalski M. Prophage substitution in *Rhizobium meliloti* strains // Microbiol. Genet. Bull.—1965.—22.—P. 19.
9. Новикова Н. И., Симаров Б. В. Трансдукция у *Rhizobium meliloti* // Генетика.—1984.—20, № 4.—С. 542—548.
10. Федоров С. Н., Зарецкая А. Н. Индуцирование этилметансульфонатом ауксотрофных мутантов *Rhizobium meliloti* и их характеристика // Микробиология.—1978.—47, № 4.—С. 728—732.
11. Федоров С. Н., Бутвина О. Ю., Симаров Б. В. Мутагенное действие УФ-излучения на клубеньковые бактерии люцерны и анализ симбиотических свойств полученных ауксотрофных мутантов // Генетика.—1983.—19, № 5.—С. 727—736.
12. Новикова Н. И., Симаров Б. В. Выделение трансдуцирующих фагов *Rhizobium meliloti* // Там же.—№ 2.—С. 331—332.
13. Исследование молекулярно-генетических механизмов вирулентности клубеньковых бактерий. Сообщение II. Биохимическая характеристика и стабильность эксконъюгантов *Rhizobium meliloti* / А. А. Аронштам, Т. А. Чернова, М. Л. Румянцева, Б. В. Симаров // Там же.—№ 4.—С. 565—570.
14. Новикова Н. И., Симаров Б. В. Симбиотические свойства прототрофных трансдуктантов клубеньковых бактерий люцерны // Там же.—1984.—20, № 9.—С. 1450—1456.
15. Доспехов Б. А. Планирование полевого опыта и статистическая обработка его данных.—М.: Колос, 1972.—128 с.
16. Hemphill H. E., Whiteley H. R. Bacteriophages of *Bacillus subtilis* // Bacteriol. Rev.—1975.—39, N 3.—P. 257—315.
17. Получение мутантов *Rhizobium meliloti* с измененными симбиотическими свойствами / С. Н. Федоров, И. Г. Фокина, Н. Н. Мультиатули и др. // Биол. фиксация молекуляр. азота: Тез. докл. IV Всесоюз. Баховского коллоквиума.—Киев, 1983.—С. 127—129.
18. Barksdale L., Arden S. B. Persisting bacteriophage infection, lysogeny and phage conversions // Anp. Rev. Microbiol.—1974.—28.—P. 265—299.
19. Monoclonal antibodies to *Rhizobium meliloti* and surface mutants insensitive to them / E. Johansen, T. M. Finan, M. L. Geffer, E. R. Signer // J. Bacteriol.—1984.—160, N 1.—P. 454—457.

ВНИИ с.-х. микробиологии, Ленинград

Получено 5.02.86

Окончание. Начало см. на с. 83—87.

- A. I. Gottlieb, M. H. Heggeness, J. E. Ash, S. J. Singer // J. Cell. Physiol.—1979.—100, N 3.—P. 563—578.
7. Kupfer A., Loward D., Singer S. J. Polarization of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center in cultured fibroblasts at the edge of an experimental wound // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1982.—79, N 6.—P. 2603—2607.
8. Воробьев И. А., Ченцов Ю. С. Центриоли в клеточном цикле. II. Интерфаза и первая половина митоза // Биол. науки.—1978.—№ 11.—С. 54—64.
9. Гудима Г. О., Воробьев И. А., Ченцов Ю. С. Поведение клеточного центра при распластывании эпителиальных клеток // Цитология.—1986.—28, № 6.—С. 576—581.
10. Tucker R. W. Role of microtubules and centrioles in growth regulation of mammalian cells // Cell and Muscle Motility.—1983.—3, N 3.—P. 259—295.

МГУ им. М. В. Ломоносова

Получено 8.05.86