



TARTU RIIKLIK ÜLIKOOL

MEDITSIINI KESKLABORATOORIUM

ZOOLOGIA KATEEDER

Toomas Veidebaum

KOLHITSIINI MÕJUST KANA

EMBRÜODE ESMASKULTUURI

RAKKUDELE

(Diplomitöö)

Juhendaja:

biol.kand. Jüri Kärner

TARTU 1970

S I S U K O R D

1.	S I S S E J U H A T U S	4
2.	K I R J A N D U S E Ü L E V A A D E	7
3.	T Ö Ö Ü L E S A N D E D	12
4.	M A T E R J A L J A M E T O O D I K A	14
4.1.	L Ä H T E M A T E J A L J A S Ö Ö T M E D	14
4.2.	K U L T I V E E R I M I S E M E T O O D I K A	15
4.3.	U U R I M I S E M E T O O D I K A	16
4.3.1.	Valgusmikroskoopia.	16
4.3.2.	Elektronmikroskoopia.	16
4.4.	T Ö Ö K A I T S E	18
5.	T Ö Ö T U L E M U S E D	19
5.1.	F I B R O B L A S T I D E E H I T U S V A L G U S M I K R O S K O O B I S	19
5.1.1.	Kontrollkultuurid.	19
5.1.2.	Kolhitsiini toimele tekkivad muutused fibroblastides	23
5.2.	F I B R O B L A S T I D E U L T R A S T R U K T U U R	27
5.2.1.	Fibroblastide ultrastruktuur kontrollkultuurides.	27
5.2.2.	Muutused fibroblastide ultrastruktuuris kolhitsiini toimele.	33
5.2.3.	Katsefibroblastide taastumine kolhitsiini vabas söötmes.	39
6.	A R U T E L U	46
	K O K K U V Ö T E	52

О ВЛИЯНИИ КОЛХИЦИНА НА ФИБРОБЛАСТЫ ПЕРВИЧНЫХ ТКАНЕВЫХ
КУЛЬТУР. 54
K I R J A N D U S 56

1. SISSEJUHATUS

Sügislille (*Colchicum autumnale*) raviv toime reuma- ja podagrahaigeile oli teada juba väga ammu. Märkusi selle kohta leiame E b e r s i papüürusest (1550 a. e.m.a.), T e o p h r a s t e s e (372 - 285 a. e.m.a.) töödest ja paljudest ürikutest meditsiini kohta Vana-Indias, Vana-Hiinas ja araabiamaades (E i g s t i a n d D u s t i n , 1955). Euroopa kliinikutes hakati sügislille ekstrakti laiemalt kasutama 18. sajandil (S h a r p , 1909).

Teaduse areng 19. sajandil võimaldas lähemalt uurida sügislilles sisalduva raviaine keemilisi omadusi ja bioloogilist toimet. Ekstraktist puhastatud alkaloid nimetati esialgu veratriiniks, hiljem aga kolhitsiiniks (C o h e n e t a l . , 1940; E i g s t i a n d D u s t i n , 1949). Esimese kaaluka tööna kolhitsiini mõjust organismidele väärrib tähelepanu P e r n i c ' i uurimus 1889. aastast (E i g s t i e t a l . , 1949). Selgus, et kolhitsiini manustamine põhjustab koertel mao- ja soolenäärmetes mitooside arvu järsu tõusu. Katseloomade uuritud kudedes prevaleerusid sealjuures mitoosi metafasis figuurid. P e r n i c ' i väide kolhitsiini arreteerivast toimest mitoosile metafasis leidis kinnitust reas töödes käesoleva sajandi esimesel poolel (D i x o n , 1905; D i x o n and M a l d e n , 1908; L i t s , 1933; D u s t i n e t a l . , 1937). Antud töö seisukohalt pakuvad erilist huvi L u d f o r-

d i (1936) tähelepanekud kolhitsiini toimest koekultuuris kasvavatele rakkudele. Nimetatud autor avastas rida muutusi kolhitsiini toimel ka interfaasi rakkudes.

Kolhitsiini bioloogilise toime põhjalikum selgitamine laiendas tunduvalt antud alkaloidi kasutamist praktikas. Juba kolmekümnendatel aastatel tehtud uurimustest selgus, et kolhitsiini mõjul saame polüploidiseerida taimerakke, kuna see alkaloid ei takista kromosoomide kahekordistumist, takistab aga nende lahknemist mitoosi anafaasis (D e r m e n , 1938, 1940; E i g s t i , 1938; N e b e l and R u t t l e , 1938; B a r b e n and C u l d a n , 1943). Tänu sellele, et kolhitsiini toimeaja oskusliku valikuga on võimalik esile kutsuda rakkude polüploidiseerumist, kasutatakse kolhitsiini taimeselektsioonis (C и д о р о в и др., 1965). Seoses kolhitsiini antimitootilise efektiga katsetati teda korduvalt meditsiinis pahaloomuliste kasvajate raviks (D u s t i n , 1934a,b; A m o r o s o 1935; C l e a r k i n , 1937; S e e d et al., 1940; B r u e s , 1942; D o u t r e and B i r a b e n , 1947; S i n g e r et al., 1956; T r o w e l l , 1960). Kolhitsiini mürgine toime organismile, eriti aga närvisüsteemile ja vereleomele on siiani takistanud kolhitsiini laialdasemat kasutamist kasvajate kemo-terapias. Uurimistöö selles suunas ei ole sugugi lõppenud. Kuni viimase ajani on avaldatud töid selle alkaloidi mõjust kasvajatele (C r e a s e y and C h o u , 1968; S a w i c k i and K i e l e r , 1968). Asendamatuks vahendiks on kolhitsiin ja tema derivaadid tsütogeneetilises uurimistöös, et saada uuritavates kudedes suurel arvul kromosoomide garnituure.

Käesolevas töös kasutatakse kolhitsiini seoses tsütoloogiliste probleemidega. Elektronmikroskoopia üheks puuduseks tu-

leb lugeda staatilist kujutist. Tsütoloog saab ettekujutuse ultrastruktuuride dünaamikast ja nende funktsioonist eksperimentide ülesseadmise ja osaliselt paralleelsete valgusmikroskoopiliste vaatlustega. Eriline osa on seejuures ainetel, mis spetsiifiliselt mõjutavad vaid teatud raku komponente. On andmeid, et kolhitsiini mõjul vigastuvad raku eelkõige mikrotuubulid (D a l e s , 1963; R o b b i n s and G o n a t a s , 1964; M a l a w i s t a and B e n s c h , 1967; T i l n e y and G i b b i n s , 1968; W h i t e , 1968; Wisniewski et al., 1968). Mikrotuubulite avastamisest on möödunud vaid seitse aastat, mistõttu täpsemad andmed nende talitluse kohta raku, eriti aga interfaasis, puuduvad.

Võimalusi sellisteks uurimusteks pakub kolhitsiini mõjul sugenevate muutuste selgitamine raku organoidides. Käesoleva töö autorile seati ülesandeks uurida selliseid muutusi koekultuuris kasvavates fibroblastides ja selgitada, millises ulatuses need muutused on pöörduvad s.o. taastuvad normaalsete tingimuste korral.

Töö viidi läbi TRÜ Meditsiini Kesklaboratooriumi elektronmikroskoopia kabineti baasil. Avaldan siirast tänu kõigile morfoloogiasektori töötajatele, eriti aga oma juhendajale Jüri Kärnerile ja vanemlaborant Mall Kurele igakülgse abi eest käesoleva diplomitöö materjali kogumisel, läbitöötamisel ning vormistamisel.

2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

Praktilistest eesmärkidest lähtudes on põhjalikumalt uuritud kolhitsiini mõju mitoosile (N e b e l , 1937; L u d - f o r d , 1936, 1953; B u r e a u e t V i l t e r , 1939; E i g s t i a n d D u s t i n , 1955; F r e e h m a n , 1960; F i r k e t , 1965; M a l a w i s t a , 1968; P a d a w e r , 1968). Empiirilisel on leitud kolhitsiini kontsentratsioonid ja toimeajad mitooside peatamiseks mitmesuguste organite uurimisel. Selle kõrval puuduvad kirjanduses süstemaatilised ülevaated kolhitsiini mõjust raku üksikute organoidide ehitusele ja talitlusele. Ülevaate esitamist raskendavad erinevate katsetingimustega saadud andmed, mis ei ole omavahel sageli võrreldavad.

Käesoleval ajal ei ole ühtset seisukohta, milline organoid raku on primaarseks kahjustuskoldeks. Kolhitsiini mõju mehhanismi uurimisel on loomulikult pilgud suunatud eelkõige kõrvalekalletele mitoosiaparaadis. Mitoosiaparaadi moodustavad kääv, tsentrioolid ja kromosoomid (^{Закунд} ~~Завадоний~~, 1966).

Mitoosi peatamist metafasis kolhitsiini toimel põhjendatakse kirjanduses kahe erineva seisukohaga. Ühelt poolt oletatakse, et kolhitsiini mõjul on takistatud tsentrioolide liikumine rakupoolustele (B r i n k l e y , 1965; S t u b b l e - f i e l d , 1965; B r i n k l e y e t a l . , 1967) ning selle-

ga seoses moodustuv kääv on deformeerunud (P o r i c h a r d
et B o u c h a r d - M a d r o l l e , 1964; K l e i n f e l d
and S i s k e n , 1966). Ei ole aga õige näha antud olukorras
primaarset kahjustust tsentrioolide talitluses. On teada, et
eksperimentaalne tsentrioolide hävitamine rakkudes ei takista
mitoosi normaalset kulgu (S o r o k i n , 1962). Hoopis põh-
jendatum on seisukoht, et kääviniidid kahjustuvad või koguni
lagunevad kolhitsiini toimel (B a r b e n and C u l d a n ,
1943; G a u l d e n and C a r l s o n , 1951; I n o u e ,
1952; G r e e n , 1962). Seda tõendavad mitmed tööd nii val-
gus- (D a l e s , 1963) kui ka elektronmikroskoopilisel ta-
semel (R o b b i n s and G o n a t a s , 1964a; D a u n -
w a l d e r and W h a l e y , 1965).

Uute fikseerimis- ja sisestamismaterjalide rakendamine
elektronmikroskoopias võimaldas näidata, et kääviniidid koosne-
vad mikrotuubulitest. Viimasel ajal on selgunud, et mikrotuubulid
on raku organoidid, mis esinevad ka interfaasis. Mikrotuubulite-
test on seni ajani suhteliselt vähe teada. Alljärgnevalt toome
ära mõningad andmed ja oletused nende ehituse, funktsiooni ja
päritolu kohta.

Esimesena kirjeldas mikrotuubuleid ja võttus kasutusele
selle termini S l a u t t e r b a c k 1963. aastal (S l a u t -
t e r b a c k , 1963). Praeguseks ajaks on mikrotuubuleid lei-
tud nii loomsetes kui ka taimsetes rakkudes (L e d b e t t e r
and P o r t e r , 1963; d e T h e , 1964; O l p i n , 1965;
T i l n e y , 1965). Mikrotuubulite hulk ja lokaliseerimine
varieerub erinevates rakkudes küllalt laiades piirides, millele
ei osata seni seletust anda (T o k i n , 1966).

Mikrotuubulid on elektronmikroskoobis nähtavad siledapin-

naliste torukestena, mille sein koosneb kahest osmiofiilsest ning nende vahele jäävast elektronheledamast kihist (G a l l , 1966a). Viimane on siiski veidi tihedam ümbritsev põhimaatriks. Mikrotuubulite läbimõõt on 250Å piires ning seinte pak-sus ligikaudu 50Å (G a l l , 1966b). Nende organoidide pik-kuseks tuuakse 0,2 - 30µ (А л о в и др., 1969). On kirjel-datud mikrotuubulite anastomoose tsentrioolidega (Т о к и н , 1966), plasmamembraaniga ja Golgi aparaaadi väikeste vesiiku-litega (S l a u t t e r b a c k , 1963)

Mikrotuubulite funktsiooni ja päritolu kohta on mitmeid hüpoteese, millele seni puuduvad veenvad tõestused. S l a u t t e r b a c k (1963) arvab, et mikrotuubulid on raku trans-portsüsteemiks veele ja mõningatele madalamolekulaarsetele ainetele. Sama autor arvab, et selle süsteemi abil võib toimuda eelpool nimetatud ainete transport ka ekstsellulaarsest keskkonnast. L e d b e t t e r ja P o r t e r (1963) näevad mikro-tuubulites raku toest. T o k i n (Т о к и н , 1966) leiab, et mikrotuubulid määravad teiste organoidide orientatsiooni ning tänu oma kontraktiilsusele ka liikumise raku.

Ka kromosoomide lahkemist anafaasis põhjendatakse sellega, et mikrotuubulitel on kontraktiilne võime (D i v a n , 1966; F o r s h e i t and H a y a s h i , 1967). Kuna kolhitsiin blokeerib akromaatilise aparaaadi valkude sulfhüdrüülrühmad (D u s t i n , 1947, 1949; M a z i a and D a n , 1952) in-aktiveerub kontraktiilne funktsioon. Tuleb märkida, et sulfhüdrüülrühmade osa mitoosis praegu veel täpselt ei teata. Teatak-se aga, et raku toimivad selle rühma kontsentratsiooni tsük-lilised muutused olenevalt raku elutsüklist (M a z i a , 1954; S a k a i and D a n , 1959; I k e d a and W a t a n a b e ,

1965; А л о в и А с п и з , 1966), kusjuures nende hulk saavutab maksimumi hiliseks profaasiks (З у с е в а и др., 1969).

Andmeid mikrotuubulite moodustumise kohta ei ole spetsiaalselt avaldatud. Oletatakse, et nende moodustumiseks vajaliku aine süntees toimub tsentrioolide piirkonnas sealse ribonukleiinhappe kontrolli all (S t u b b l e f i e l d and B r i n k l e y , 1967). Vastuväitena taolisele seisukohale tuuakse mikrotuubulite esinemine rakkudes, kus tsentrioolid puuduvad või on täheldatavad väga harva (P o r t e r and B r u n i , 1965). Seega võib mikrotuubulite moodustumine olla seotud ka teiste rakustruktuuridega (d e T h e , 1965 ref. Т о к и н , 1966 järgi).

Mikrotuubulid ei hävi mitte ainult mitoosis kolhitsiini mõjul, vaid hävivad täielikult (R o t h et al., 1965) või reagregeeruvad filamentideks (R o b b i n s and G o n a t a s , 1964) ka interfaasis olevas rakus juba lühiajalise mõjutamise tagajärjel.

Kuigi kolhitsiin on eelkõige "käävimürk", muutub tema toimel ka teiste organoidide ehitus. Nii näiteks tihenevad selle alkaloidi mõjul kromosoomid (B r o u n g a r t and O t t , 1942; J o k e l a i n e n , 1968). Kinetohoori diferentseerumine olevat seejuures takistatud (J o k e l a i n e n , 1968), kuid väljakujunenud kinetohoor on elektronmikroskoopiliselt täiesti normaalne (K r i s h a n , 1968).

On andmeid, et kolhitsiinile reageerib tuum ka raku interfaasis. Esimesena juhtis sellele tähelepanu juba kolhitsiini mõju taasavastaja D u s t i n (1934b). Rakutuumade suurenemine D u s t i n 'i katsetes leidis kinnitust mitmes hilisemas töös (L u d f o r d , 1936; K o s t o f f , 1938; B r o w n and

S e e d , 1945). Pikemaajaliste mõjutuste tulemusena toimub aga tuumade fragmentatsioon (B r u e s and J a c k s o n , 1937; R o d k i e w i c z and M i k u l s k a , 1967; W a n k a , 1968), tuumamembraani lagunemine (W i r k u s and M e e n a k s h i , 1968) ja kromatiini kogunemine kääkudesse (N a t h a n i e l et al., 1968).

Praegused teadmised endoplasmaatilise retiikulumi, Golgi aparaadi ja mitokondrite struktuuri muutumisest kolhitsiini toimel on väga napid. Rõhutatakse endoplasmaatilise retiikulumi tugevat kahjustumist ning tema tunduvat vähenemist rakus (R o d k i e w i c z and M i k u l s k a , 1967; W i r k u s and M e e n a k s h i , 1968). Samal ajal suureneb tsütoplasmas vabade ribosoomide hulk ning tekib arvukalt ebakorrapäras-tesse kimpudesse koondunud filamente (P e t e r s o n and M u r r a y , 1966; K r i s h a n et al., 1968). Mõned ribosoomid võivad olla seotud üksikute filamentidega (N a t h a n i e l et al., 1968).

On väiteid ka selle kohta, et kolhitsiin põhjustab Golgi aparaadi hüpertroofia (W I L S O N , 1962) või tema täieliku kadumise rakust (R o b b i n s and G o n a t a s , 1934; К я р н е р , 1967a).

Elektronmikroskoopilisel tasemel mitokondrite ultrastruktuuris muutusi ei toimu (W I L S O N , 1962), valgusmikroskoobis on näidatud nende orientatsiooni kadumist lihasrakkudes (G o d m a n , 1955). Seda saab põhjendada mikrotuubulite vi-
gastumisega rakus (Т о к и н , 1966; K l a u s , 1968).

3. T Ö Ö Ü L E S A N D E D

Kolhitsiini toimel peatuv raku jagunemine tõstatab tsütoloogia ette rida küsimusi. Mitoosi katkemise põhjused ei ole lõplikult selgitatud, kuid enamuse vaatlusi räägib mikrotuubulite primaarse vigastumise kasuks. Siinjuures kerkib otsekohe küsimuste ring mikrotuubulite talitlusest raku interfaasis, sugulaslikest struktuuridest ja seostest teiste organoididega.

Kolhitsiini mõjuga seotud tsütoloogiliste probleemide uurimiseks valisime käesolevas töös ühekihilised primaarsed koekultuurid. Selliseid koekultuure on võimalik uurida elusalt, mis aitab kaasa elektronmikroskoopiliste vaatluste tõlgendamisele. Koekultuuride meetodi kasutamisel tuleb arvestada rakkude iseärasusi seoses viibimisega kunstlikes tingimustes. Väär on seisukoht, et trüpsiniseeritud koekultuurid kujutavad endast indiferentsete rakkude kolooniaid. Nagu näitavad Meditsiini Kesklaboratooriumis läbiviidud uurimused, on trüpsiniseeritud esmaskultuurid diferentseeruvad koesüsteemid, kus rakud säilitavad koelise determineerituse (П и л ь д в е р е , 1963 В е - р о м а н , 1967). Oma küpsusastmelt on esmaskultuurid võrreldavad embrüonaalsete kudede ja koeregeneraatidega. Erinev koeline päritolu, diferentseerumisaste ja elutsükli faas teevad esmaskultuuridest äärmiselt heterogeense süsteemi, millest ülevaate saamiseks on vajalikud laiaulatuslikud uurimused, eri-

ti ultrastruktuuride tasemel. Diplomitöö materjalide kogumiseks valisime seetõttu kana embrüode "nahk-lihaskoe" trüpsiniseeritud kultuuride fibroblastid, millede ultrastruktuuri oli Meditsiini Kesklaboratooriumis juba eelnevalt uuritud (К я р н е р , 1969, 1970). Katsete ülesseadmisel piirdusime seejuures vaid koekultuuri latentsuse faasiga, kus rakkudel puudub mitootiline aktiivsus.

Käesoleva töö läbiviimisel püstitati kaks põhiküsimust:

1. Missugused muutused toimuvad kana fibroblastides kolhitsiini toimele?
2. Kuidas rakud taastuvad kolhitsiinivabas söötmes pärast mõjutamist?

Katses kasutati kolhitsiini samas kontsentratsioonis nagu seda on tarvitatud tsütogeneetilistes laboratooriumides mitooside peatamiseks (H s u , 1965).

4. M A T E R J A L J A M E T O O D I K A

4.1. L ä h t e m a t e r j a l j a s ö ö t m e d .

Töös uuriti kana fibroblaste "nahk-lihaskoe" esmases koe-kultuuris*. Koekultuurid valmistati 7 - 12 päevastest kana loo-detest. Käesolevas töös on arvestatud 18 katseseeria uurimis-tulemusi.

Koekultuure kasvatati katteklaasidel penitsilliini alt va-banenud pudelites. Nii katteklaasid kui ka penitsilliinipudelid pesti ja steriliseeriti vastavalt eeskirjadele (P o d c и др., 1957).

Fibroblastide kasvuks kohandatud sööde koosnes vereseeru-mist - 17%, söötimest 199 - 10%, embrüonaalekstraktist - 4% ja Hanksi või Barle'i füsioloogilisest lahusest - 69% (P u c k et al., 1956).

Vajalik pH (7,4 - 7,6) saavutati 5% naatriumbikarbonaadi lisamisega. Et otsustada söötme pH üle, selleks oli keskkonda lisatud fenoolpunast. Söötmes kasutatav embrüonaalekstrakt val-mistati kana loodetest M e r c h a n t ' i (1960) ja P a u l ' i (1960) poolt antud juhiste järgi. Looded peenendati kääridega ning täiendavalt purustati uhmris. Seejärel lisati võrdne hulk füsioloogilist lahust ja segati hoolikalt. Ekstrakt puhastati lootejäänustest tsentrifuugimisega (3000 pööret/min. 15 min.

*Virusoloogid mõistavad "nahk-lihaskoe" all loodet ilma pea ja sisusteta (A н д ж а п а р и д з е и др., 1960).

jooksul). Bakteriaalse saastumise vastu lisati söötmele penitsilliini ja streptomütsiini 100 - 250 üh./ml.

4.2. Kultiveerimise meetodika.

Koekultuuride valmistamine toimus aseptilistes tingimustes. Vastavatest nõuetest lähtudes (R e r a b e k und R e r a - b e k , 1960), töötati boksis, mida eelnevalt oli kiiritatud üks tund kvartslambiga. Kõik klaasvahendid steriliseeriti 1,5 tundi 160°C juures kuumkapis, metallist riistu keedeti vahetult enne kultiveerimise algust 20 minutit. Boksis viibivatest töötajatest oli igaüks riietatud steriilsesse kitlisse, mütsi ja maski. Enne loodete eraldamist valati munad üle denatureeritud piiritusega.

Munadest eraldatud loodetel eemaldati pea ja sisused ning tükeldati teravate kääridega umbes 1mm³ suurusteks tükkideks. Rakkude isoleerimiseks kasutati 0,25% trüpsiini isotoonilises lahuses (pH 7,6). Trüpsiniseeriti magnetsegajaga toatemperatuuril 20 minutit. Seejärel trüpsiin koos rakkudega tsentrifugeeriti (1000 pööret/min.) viie minuti jooksul. Rakud pesti füsioloogilise lahusega ja tsentrifugeeriti uuesti. Seejärel rakud suspendeeriti söötmes arvestusega, et igas milliliitris söötmes oleks 70000 - 100000 rakku. Saadud suspensiooni külvati 1-1,5ml igasse penitsilliinipudelis. Koekultuurid kasvasid termostaadis 37°C juures.

Katsetingimustele allutati 2 - 3 päevased koekultuurid, millele söötmesse lisati kolhitsiini lõppkontsentratsiooniga 5 µg/ml. Koekultuure uuriti 1, 3, 24 tunni järel pärast kolhitsiini manustamist. Osa koekultuure viidi pärast 3 tunnulist mõjutamist

tagasi normaalsesse s^oötmesse ning fikseeriti elektronmikroskoopiliseks uurimiseks 1, 3 ja 24 tunni järe^l.

4.3. Uurimise metoodika.

4.3.1. Valgusmikroskoopia.

Elusaid rakke jälgiti faaskontrastmikroskoobiga (MEW - 6 baasil). Katteklaasid koekultuuridega pesti hoolikalt füsioloogilises lahuses ja sulundati alusklaasile leukoplasti abil.

Happelise fosfataasi levikut uuriti H o l t i (1959) poolt modifitseeritud Gomori meetodiga. Koekultuurid fikseeriti 1 tunni jooksul Bakeri segus, mis sisaldas 8% sahharoosi, 0 - 4° C juures. Gomori järgi inkubeeriti 1 tund 37° C juures.

Polüsahhariidide levik rakus tehti kindlaks PAS reaktsiooniga. Glükogeeni eemaldamiseks töödeldi kontrollpreparaate 1% diastaasilahusega.

Fotografeeriti mikroskoobist MEW-6 filmidele " Mikpat-200" ja " Mikpat-300".

4.3.2. Elektronmikroskoopia.

Ühekihelistes koekultuurides kasvavate rakkude ultrastruktuur säilus kõige paremini F e d o r k o ja H i r s c h 'i (1968) poolt antud metoodika järe^l, mida nimetatud autorid kasutasid leukotsüütide ultrastruktuuri uurimiseks. Fikseeriti 1% OsO₄ ja 2% glutaaraldehüüdi segus (vahekorras 2:1), mis oli puhverdatud s-kollidiinis pH 7,4-ni. Koekultuure fikseeriti 10 minutit 0° C juures, pesti hoolikalt kollidiinpuhvris ning töödeldi täiendavalt 20 minutit 1% uranüülatsetaadi lahusega. Pre-

paraadi veetustamiseks kasutati tõusvat alkoholi rida. Hoiti 50°, 60°, 70°, 80°, 90° ja 96° alkoholisisalduses 10 minutit 4°C juures. Edasi hoiti pool tundi 100° alkoholisisalduses (kaks vahetust à 15 minutit). Ühele nendest vahetustest lisati kristallike fosforvolframhapet rakustruktuuride kontrastsuse tõstmiseks. Seejärel viidi koekultuurid absoluutsesse atsetooni, atsetooni ja Epon 812 segusse (vahekord 1:1) ja puhtasse Epon 812-sse. Rakud eemaldati katteklaasilt žiletiga ning sisestati kunstlikku vaiku (Epon 812) želatiinkapslis. Polümeriseerumine toimus 37° C juures (24 tundi) ja seejärel 60° C juures kuni täieliku polümeriseerumiseni.

Sobiva meetodika valikul kasutati veel järgmisi võtteid. Fikseerimine 1,33% OsO₄-s-kollidiinipuhvris - sisestamine metakrülaadidesse (B e n n e t t and L u f t , 1959); fikseerimine 2% glutaaraldehüüdiga, postfikseerimine 1% OsO₄-ga - sisestamine araldiidi ja Epon 812 segusse (M o l l e n h a u e r , 1967). Nimetatud võtete kasutamisel ilmes rakkudes rida töötlemise artefakte, mistõttu neist loobuti.

Lõigud valmistati paksusega 300 - 400Å ultramikrotoomil YMT-2. Klaasnoad murti Tokujamu ja Okanura meetodil (Г о л ь - д и н , 1963). Lõigud kanti vaskvõrkudele ja kontrasteeriti täiendavalt seatinatsitraadi lahusega (R e y n o l d s , 1963). Põhilahus lahjendati 1:100-le. Kontrasteerimine toimus 5 minuti jooksul Petri tassis, kust CO₂ oli eemaldatud NaOH abil.

Preparaate uuriti elektronmikroskoobiga JEM-100B. Fotografeerimiseks kasutati MK-tüüpi fotoplaate suurusega 6x9cm.

4.4. Töökaitse.

Töö teostamisel jälgiti üldisi keemialaboratooriumi ohutus-
tehnikat eeskirju (ОСНОВНЫЕ..., 1965) ja iga erioperatsiooni te-
gemisel sektorisiseseid töökaitse eeskirju.

Preparaatide valmistamisel ja histokeemiliste reaktsioonide
sooritamisel järgiti "TRÜ Meditsiini Teadusliku Uurimise Kesk-
laboratooriumi biokeemiaspektori ohustehnika eeskirju (1967)".
Lenduvate mürgiste ainetega töötamisel toimusid kõik operatsioo-
nid tõmbekapi all ja jälgiti, et nad ei satuks hingamisteedesse.
Nahale toksiliste ainetega töötati kummikinnastega, lähtudes
vastavatest eeskirjadest (Вредные..., 1963). Eloksoidvaikudega
töötati selleks spetsiaalselt sisseseatud töökohal ning juhini-
duti vastavatest eeskirjadest (Санитарные..., 1965).

Elektrilise aparatuuriga töötamisel jälgiti tootva tehase
poolt kaasa antud eksploatatsioonieeskirju. Elektriaparaadid
olid maandatud ja maanduse efektiivsus kontrollitud vastavalt
neid aparate tootvate tehaste instruksioonidele ja vastavatele
töökaitse eeskirjadele (Тööstusettevötete..., 1963).

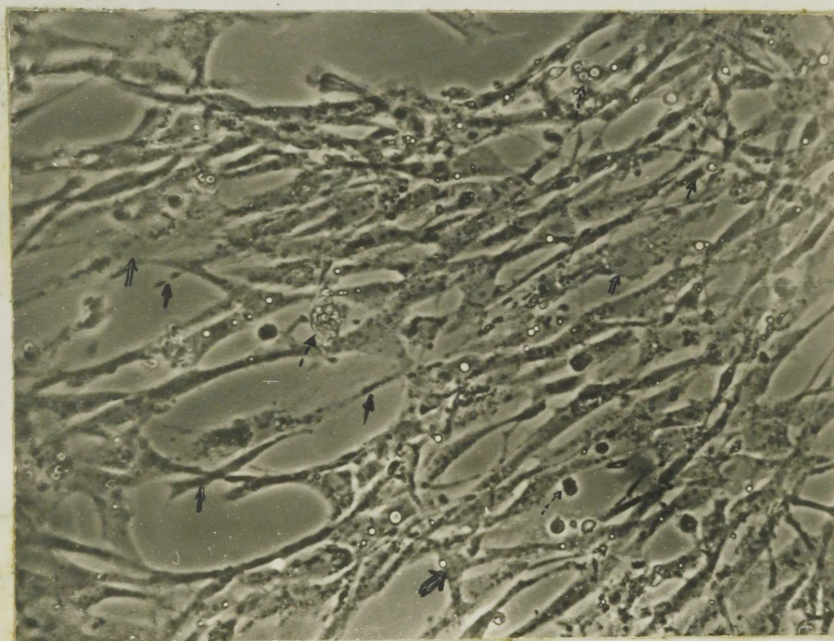
Enne tööleasumist Meditsiini Kesklaboratooriumis instrueeri-
ti diplomanti kõikides töökaitseesse puutuvates küsimustes.

5. TÖÖ TULEMUSED

5.1. Fibroblastide ehitus valgus- mikroskoobis.

5.1.1. Kontrollkultuurid.

Klaasile kinnitunud fibroblaste iseloomustab kuju variee-
ruvus samades piirides nagu see on tuntud organismis (3 a -
В а р з и н , 1953).

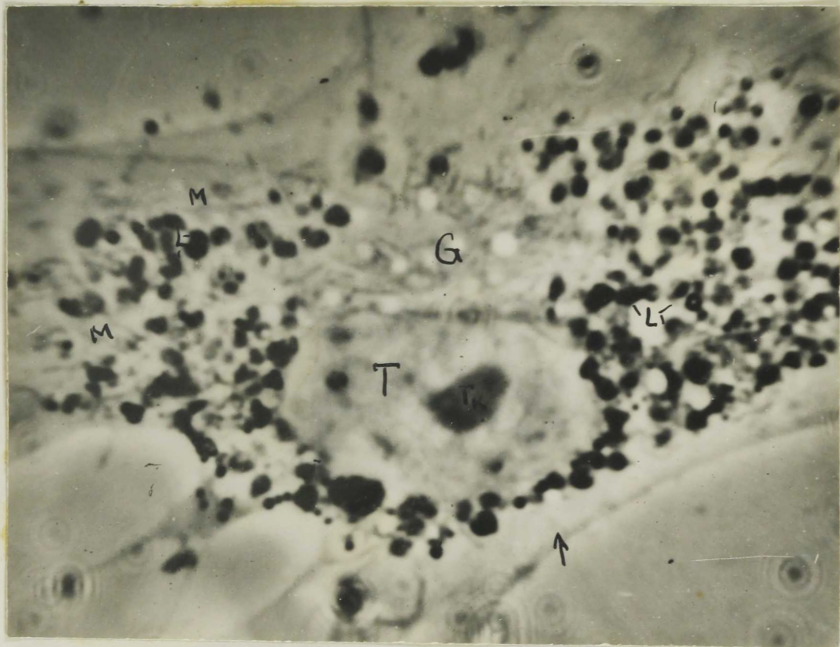


Joon.1. Fibroblastide võrgustik kana "nahk-lihaskoe" kultuuris.
Ühekordne nool - vähediferentseerunud fibroblastid,
kahekordne nool - diplasmaatilised tähtjad fibroblastid,
katkendlik nool - degenerereeruvad rakud. Faaskontrast-
mikroskoop. Ob.10, ok.10.

Arvesse võttes intaktsete kudede uurimistulemusi, võib erista-
da ka koekultuuris kõiki üleminekuvorme vähediferentseerunud

käävikujulistest fibroblastidest (ühekordne nool joon.1) väljakujunenud diplasmaatilisusega tähtjate fibroblastideni (kahekordne nool joon.1). Koekultuuri latentsuse faasis seostuvad nad pikkade jätkete abil ühekihiliseks võrgustikuks (joon.1). Degenerereeruvad rakud (katkendlik nool joon.1) vabanevad võrgustikust, ümarduvad, vakuoliseeruvad ja eralduvad klaasilt. Kasvavate fibroblastide pikkus varieerub 50-80 μ , laius 20-40 μ piires.

Kana embrüonaalsed fibroblastid on ühe, harva kahe tuumaga. Tuuma kuju sõltub samuti raku diferentseerumisastmest.



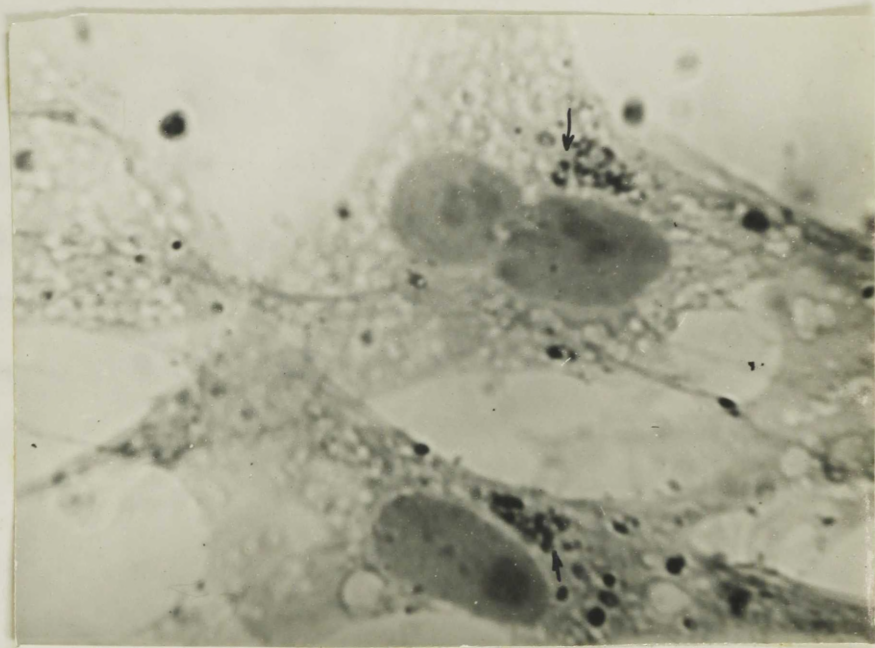
Joon.2. Väljakujunenud diplasmaatilisusega fibroblast kontrollkultuurist. T - tuum, Tk - tuumake, G - Golgi tsoon, M - mitokondrid, L - lüsoosomid. Ühekordne nool viitab ektoplasmale. Faaskontrastmikroskoop. Ob.90, ok.10.

Diferentseerunud fibroblasti tuum on sageli neerjas, käävjatel rakkudel aga rohkem ümardunud või ovaalne. Karüoplasma on uuri- misperioodil homogeenne (joon.2), sisaldades 1-2 ebakorrapärase piirjoontega tuumakest.

Fibroblastide diferentseerumisel koekultuuris suureneb tsü-

toplasmas valgusmikroskoobis eristatavate organoidide ja sisalduste hulk. Viimaste erinev levik endo- ja ektoplasmas ongi elusate fibroblastide diplasmaatilise aluseks. Endoplasmasse on koondunud Golgi aparaat, enamuse lüsoosime ning mitokondreid (joon.2).

Elusates fibroblastides on Golgi aparaat identifitseeritav retikulaarse Golgi tsoonina tuuma ühel küljel (joon.2). Neer- ja tuuma puhul paikneb nimetatud tsoon tuuma nõgusal küljel. Retikulaarse ilme Golgi tsoonile annavad nii heledad vakuoolid ($0,2 - 0,6 \mu$), kui ka ülejäänud tsütoplasma varieeruv tihedus. Kogu Golgi tsooni diameeter ulatub diferentseerunud rakkudes $3 - 5 \mu$.



Joon.3. Happelise fosfataasi levik kontrollkultuuri fibroblastides. Reaktsiooniprodukt võrgustikuna Golgi tsoonis (nool) ja graanulitena endoplasmis. Holt'i poolt modifitseeritud Gomori meetod. Hematoksüliin. Ob.90, ok.10.

Lüsoosime on elusates fibroblastides vaadeldavad faastumede ja -heledate sfäärulitena (joon.2). Nimetatud struktuurid ümbritsevad pärjana tuuma ja Golgi tsooni. Lüsoosime

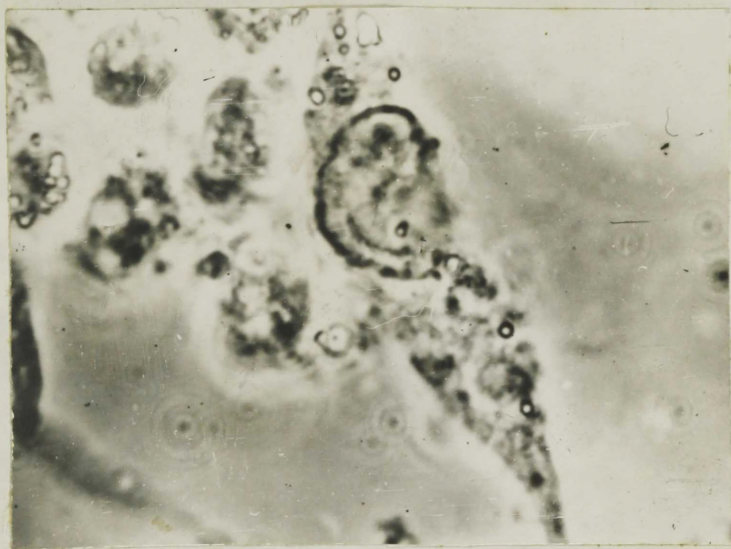
diameeter varieerub valgusmikroskoobi lahutusvõime piirilt kuni 1 mikronini. Meditsiini Kesklaboratooriumis on näidatud samadel koekultuuridel, et lüsoosoomide tiheduse ja paigutuse erinevus üksikutes rakkudes on seotud lüsoosoomide intensiivse moodustumisega koekultuuri latentsuse faasis (К я р н е р , 1963, 1967a, b). Kirjeldatud sfäärulite lüsoosomaalset iseloomu kinnitab morfoloogilise kriteeriumina kasutatav tsütokeemiline reaktsioon happelisele fosfataasile. Reaktsiooniprodukt levib sfäärulites kas peente sõmeratena või suurte homogeensete künkudena (joon. 3). Peale lüsoosoomide avastati happelist fosfataasi uuritava perioodil ka Golgi tsoonis, mida seostatakse kirjanduses lüsoosoomide moodustumisega. Täiendavalt uuriti rakkudes veel polüsahhariidide levikut PAS-reaktsiooni abil. Glükogeeni ei avastatud. KÜll aga langes diastaasile resistentsete polüsahhariidide levik kokku lüsoosoomide omaga.

Mitokondrid on elusates fibroblastides eristatavad niitjate moodustistena pikkusega 0,5 - 3 μ m. Nad levivad üle kogu tsütoplasma, seejuures on iseloomulik nende orienteeritus raku pikitelje suunas (joon. 2). Golgi tsoonis mitokondrid enamuses puuduvad.

Rasvatilgad on hästi äratuntavad tänu oma tugevale valgusmurrdvusele. Nad levivad grupiti endoplasmas, kusjuures nende arv erinevates rakkudes võib varieeruda suurtes piirides. Eriti palju rasva on degenerereeruvates rakkudes.

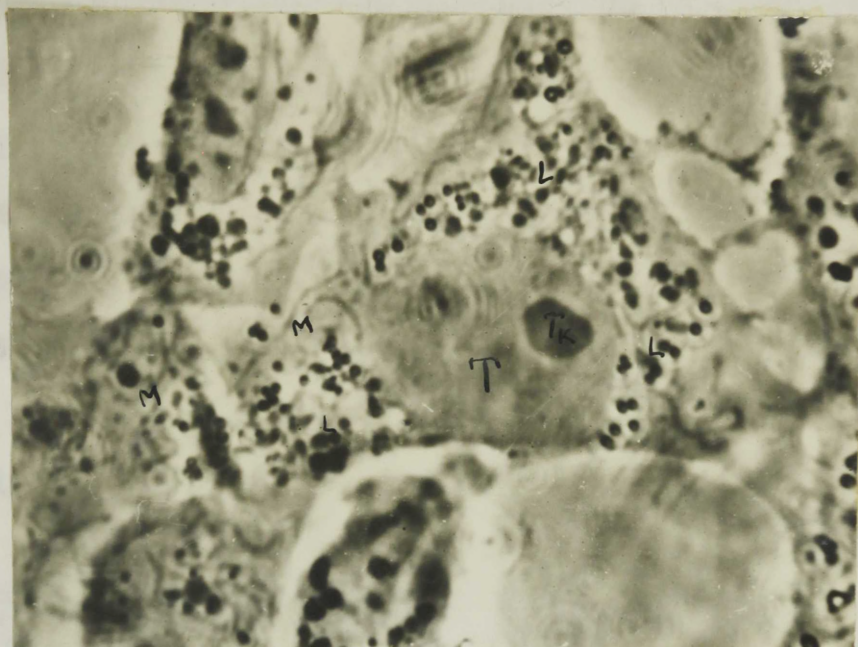
5.1.2. Kolhitsiini toimele tekkivad muutused fibroblastides.

Kolhitsiin põhjustab paljude rakkude hävimise juba esimes-te tundide jooksul pärast manustamist koekultuuri söötmesse. Seejuures eeskätt degenerereeruvad vähediferentseerunud monoplas-maatilised fibroblastid. Viimased ümarduvad, tuumad kootuvad, karioplasma muutub heterogeenseks ja tsütoplasma laguneb (joon. 4).



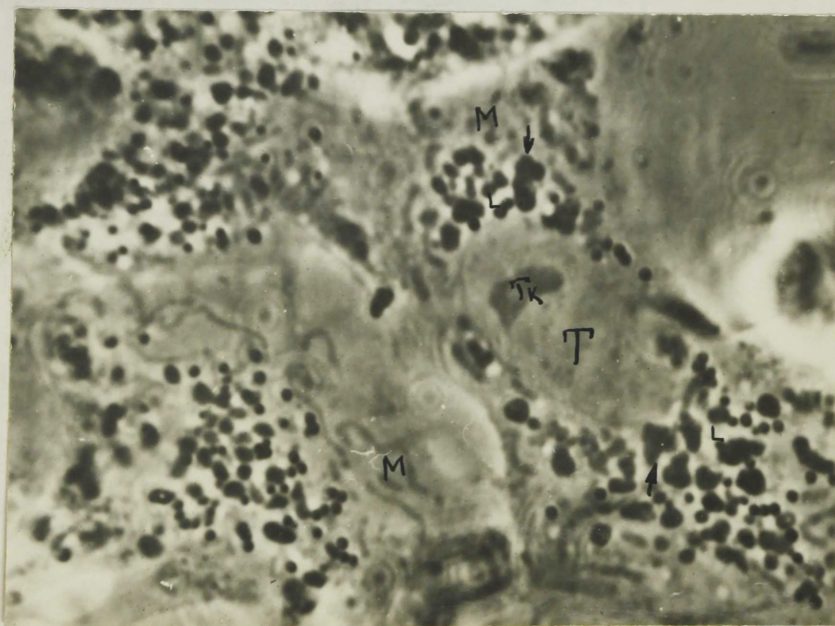
Joon.4. Kolhitsiini mõjul degenerereerunud fibroblastid koekul-tuuris. Faaskontrastmikroskoop. Ob.90, ok.10.

Diplasmaatilised fibroblastid on kolhitsiini toimele re-sistentsemad, kuid ka nende ehituses võib täheldada rida muutu-si. Rakujätked lühenevad, tuum ja tuumake ümarduvad (joon.5). Üheks iseloomulikumaks muutuseks tuleb lugeda Golgi tsooni ka-dumist juba ühetunnise katse jooksul. Lüsosoomid suurenevad sa-mal ajal diameetrilt omavahelise liitumise tagajärjel (joon.6). Happelise fosfataasi hulk lüsosoomides kahaneb, Golgi aparaa-dile iseloomulik fermentatiivne võrgustik ei ilmestu. Diastaa-siresistentsete polüsahhariidide hulk ja seostumine lüsosoomi-dega on sarnane kontrollikultuuri rakkudega.



Joon.5. Fibroblast pärast ühetunnilist mõjutamist kolhitsiiniga.

T - tuum, Tk - tuumake, M - mitokondrid, L - lüsoosomid. Faaskontrastmikroskoop. Ob.90, ok. 10.



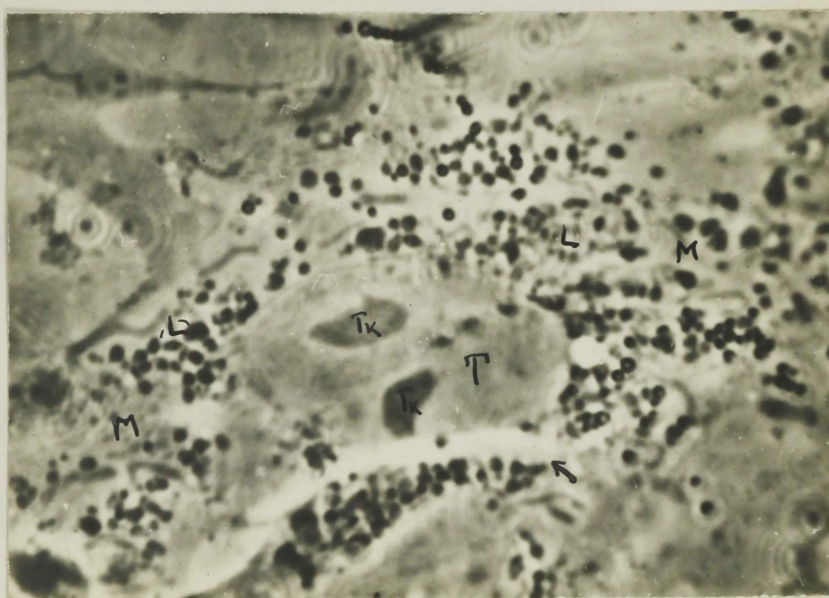
Joon.6. Suurenenud lüsoosomid pärast ühetunnilist mõjutamist kolhitsiiniga (nool).

T - tuum, Tk - tuumake, M - mitokondrid, L - lüsoosomid. Faaskontrastmikroskoop.

Ob.90, ok.10.

Rakkude diplasmaatilisuus kaob lüsoosoomide ja mitokondrite ühtlase jaotuvuse tõttu kogu tsütoplasmas. Seejuures mitokondrid ei ole enam orienteeritud raku pikitelje suunas.

Kolmetunnilise katse jooksul ülalkirjeldatud muutused fibroblastides süvenevad. Lisaks neile võib tähele panna lüsoosoomide, mitokondrite ja rasvatilkade rühmitumist, mistõttu tsütoplasmas kujunevad nimetatud organoididest vabad homogeen-
sed kanalid laiuselg kuni 0,7 μ (joon.7).

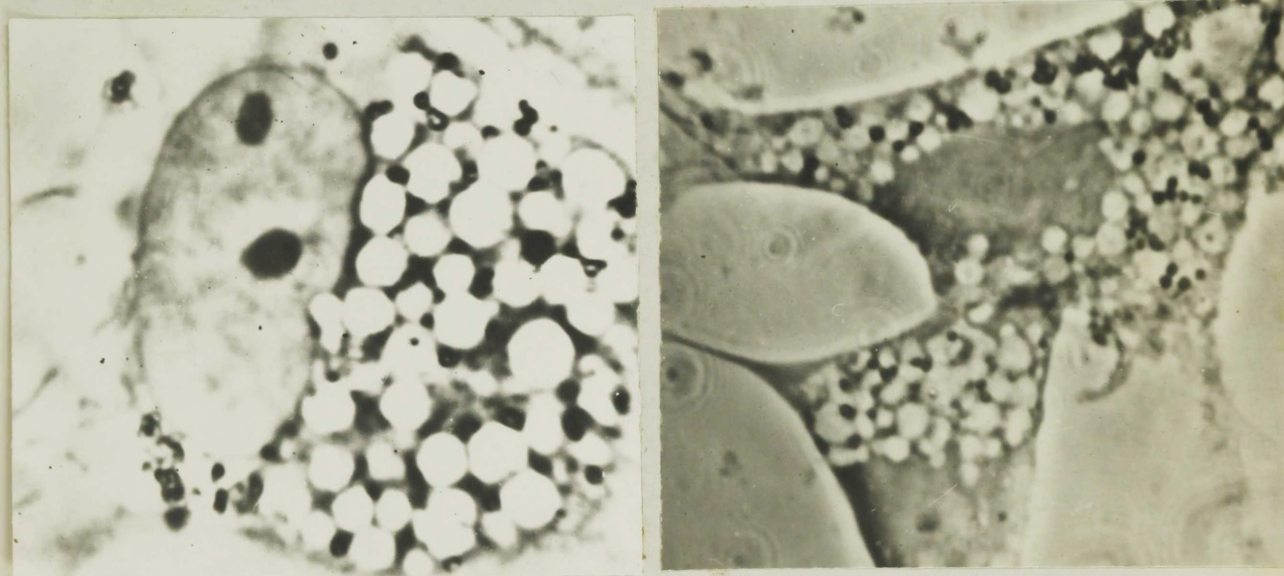


Joon.7. Fibroblast pärast 3-tunnilist mõjutamist kolhitsiiniga.
Nool viitab ulatuslikule heledale alale tuuma juures.
T - tuum, Tk - tuumake, L - lüsoosomid, M - mitokond-
rid. Faaskontrastmikroskoop. Ob.90, ok.10.

Sageli piirab selline valgusmikroskoobis diskreetsete organoi-
didevaba tsoon kogu tuuma. Üksikute rakkude tsütoplasmas lisan-
duvad nimetatud komponentidele veel suuremad heledad vakuolid
(diameeter 3-4 μ). Happelise fosfataasi aktiivsus kirjeldatava
katseperioodi lõpuks on tugevasti langenud. Reaktsiooniproduk-
ti üksikud sõmerad viitavad lüsoosoomide asukohale. Lüsoosoomide
polüsahhariidide sisalduses valgusmikroskoobi abil muutusi ei
ole võimalik sedastada.

Kolmetunnilise katse vältel tekkinud muutused on pöörduva iseloomuga. Nimelt, taastades koekultuuris normaalse söötme, kujuneb juba mõne tunni jooksul rakkude diplasmaatilisus sarnaselt kontrollkultuuridele.

Kolhitsiini manulus ööpäeva kestel põhjustab tsütoplasma tugeva vakuolisatsiooni, mis on iseloomulik degenerereeruvatele rakkudele (joon.8a,b).



Joon.8a,b. Tugevasti vakuoliseerunud fibroblastid pärast 24-tunnist mõjutamist kolhitsiiniga. Faaskontrastmikroskoop. Ob.90, ok.10.

Niitjaid mitokondreid ei ole võimalik avastada. Morfoloogiliselt lüüesoomidele iseloomulike sfäärulite arv on vähenenud ja nad on kokkusurutud saarekesteks vakuoolide foonil (joon.8b). Tuuma piirjoon on sageli ebakorrapäraselt sopiline, kohati tugevasti deformeerunud.

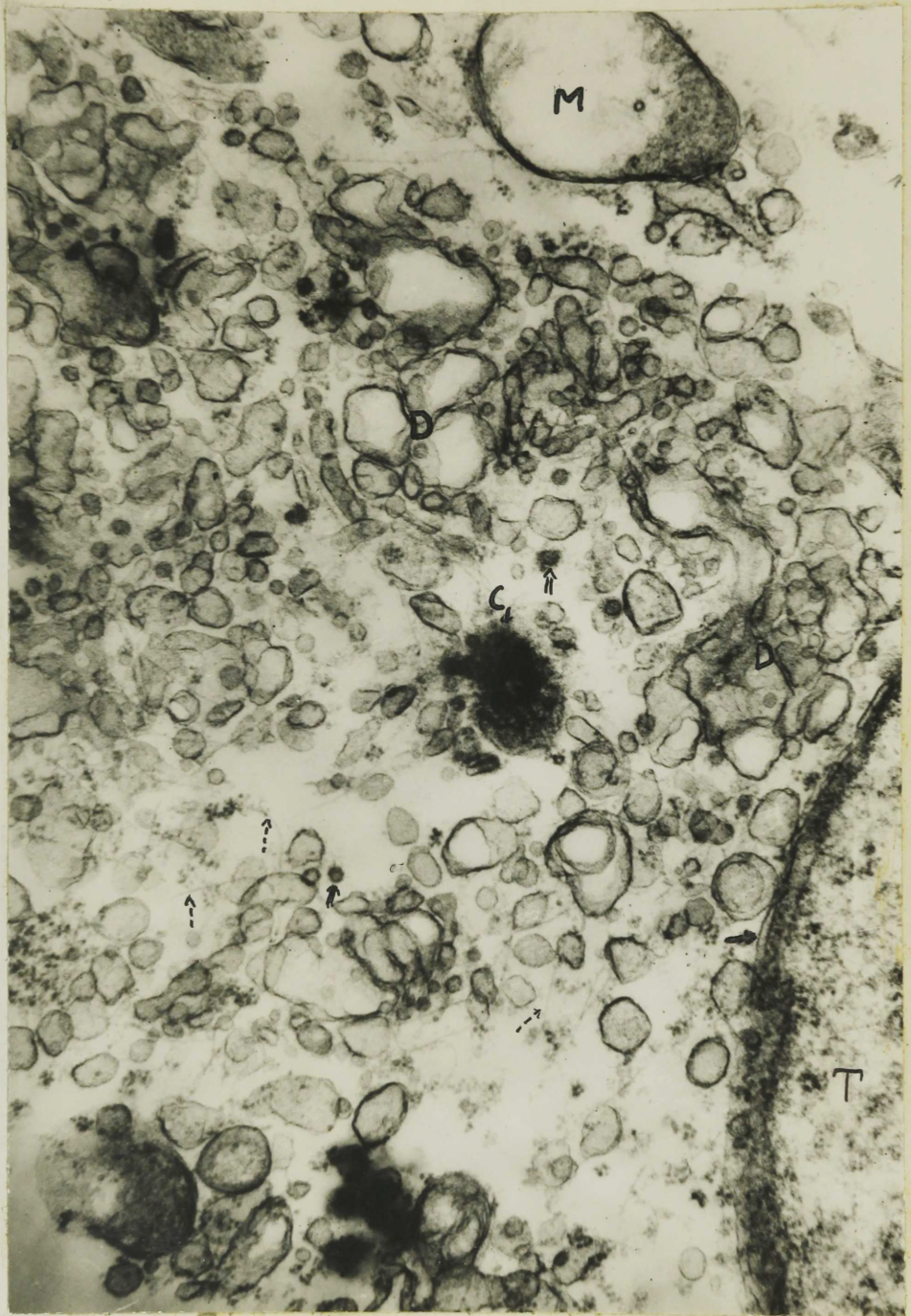
Ööpäeva kestel sugenevad muutused fibroblastides viivad rakkude hävimisele. Normaalsesse söötmesse paigutamisel ei ole rakud suutelised enam taastuma.

5.2. Fibroblastide ultrastruktuur.

5.2.1. Fibroblastide ultrastruktuur kontrollkultuurides.

Fibroblasti tuum on peensõmeraline, veidi suurema tihedusega pinnal. Tuumakate koosneb kahest membraanist, millede omavaheline kaugus on 200Å piires (ühekordne nool joon.9).

Golgi aparaat lokaliseerub tuuma vahetus naabruses, nagu seda võis loota valgusmikroskoopiliste vaatluste põhjal. Ta koosneb üksikutest diktüosoomidest, mis ümbritsevad tsentrioole (joon.9). Üksiku diktüosoomi moodustavad 3-4 üksteise vastu liibuvat tsisterni, millede läbimõõt on 200m μ . Diktüosoomitsisternide sisu on hele, sageli vaid veidi tihedam Golgi tsooni põhi- maatriksist. Diktüosoomi ümbritseb nii kumeral kui ka nõgusal poolusel arvukalt vesiikuleid ja tuubuleid. Seerialõikude uurimisega õnnestus jälgida üksikute diktüosoomide omavahelisi ühendusi väänlevate tuubulite kaudu. Vesiikulite läbimõõt varieerub 30m μ - 250m μ . Paljud väikesed vesiikulid on kontaktis diktüosoomitsisternidega. Viimaste vahetus naabruses võib jälgida üleminnekuvorme vesiikuliteni, millede pind on kaetud ribosoomidega, seega granulaarse endoplasmaatilise retiikulumi elementideni. Golgi tsooni vähearvuliseks, kuid alatiseks komponendiks on vesiikulid, millede pind on kaetud elektrontiheda aine kihiga (kahekordne nool joon.9). Edaspidi nimetame neid kaetud vesiikuliteks (inglisekeelses kirjanduses "coated vesicles", venekeelses kirjanduses "окаймленные пузырьки"). Kaetud vesiikulite läbimõõt on 30-50m μ . Nad on enamuses ka elektrontiheda sisuga. Sageli võib kohata kaetud vesiikulite liikumist vastu diktüosoomitsisternerne. Selliseid vesiikuleid leidub ka teistes tsütoplas-

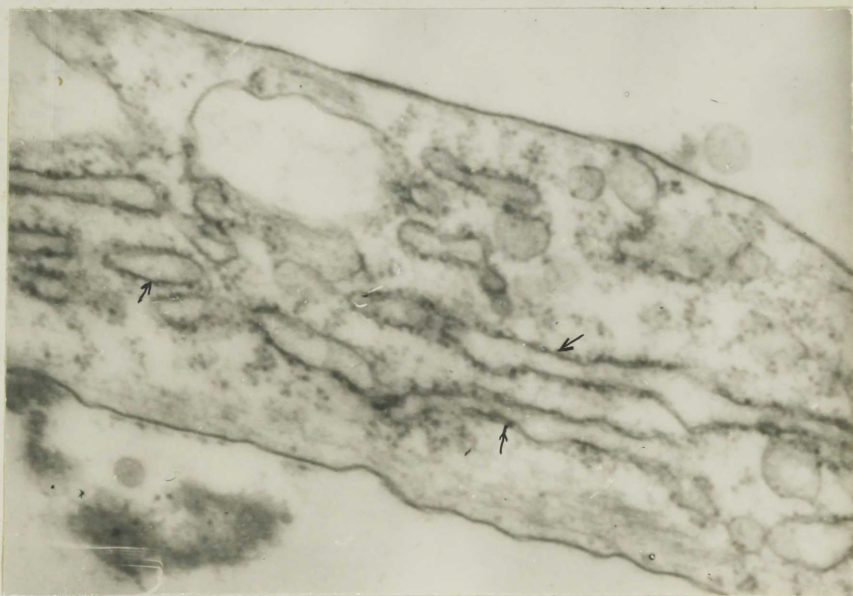


Joon.9. Golgi aparaat kontrollkultuuri fibroblastis. T- tuum, M - mitokondrid, D - diktüsoomid, C - tsentriool. ühekordne nool viitab tuumakattele, kahekordne nool kaetud vesiikulitele, katkendlik nool filamentidele. Elektronmikroskoop. S. 46800 x.

ma osades, eriti aga rakupinnal plasmamembraani all. Peale ülalnimetatud komponentide esinevad Golgi tsoonis üksikud va-

bad polüsoomid ja peente filamentide ($\sim 50\text{\AA}$) võrgustik (joon. 9, katkendlik nool). Filamendid ulatuvad tsentriooli ümbritsevasse elektrontihedasse ainesse. Sageli läbivad nad diktuosomi intertsisternaalselt. Hajutatult leidub taolisi filamente ka mujal tsütoplasmas, kusjuures siis ei moodusta nad võrgustikku, vaid on orienteeritud raku pikitelje suunas.

Endoplasmaatiline retiikulum esineb vahetult ümber Golgi aparraadi vesiikulitena, mujal tsütoplasmas $50\text{--}60\text{m}\mu$ läbimõõduga tsisternide (nool joon.10) ja omavahel anastomoseeruvate kanalitena. Ebaregulaarsed laiendid membraaniga ümbritsetud ruumis ulatuvad sageli $0,4\text{m}\mu\text{--}0,6\text{m}\mu$. Endoplasmaatilise retiikulumi



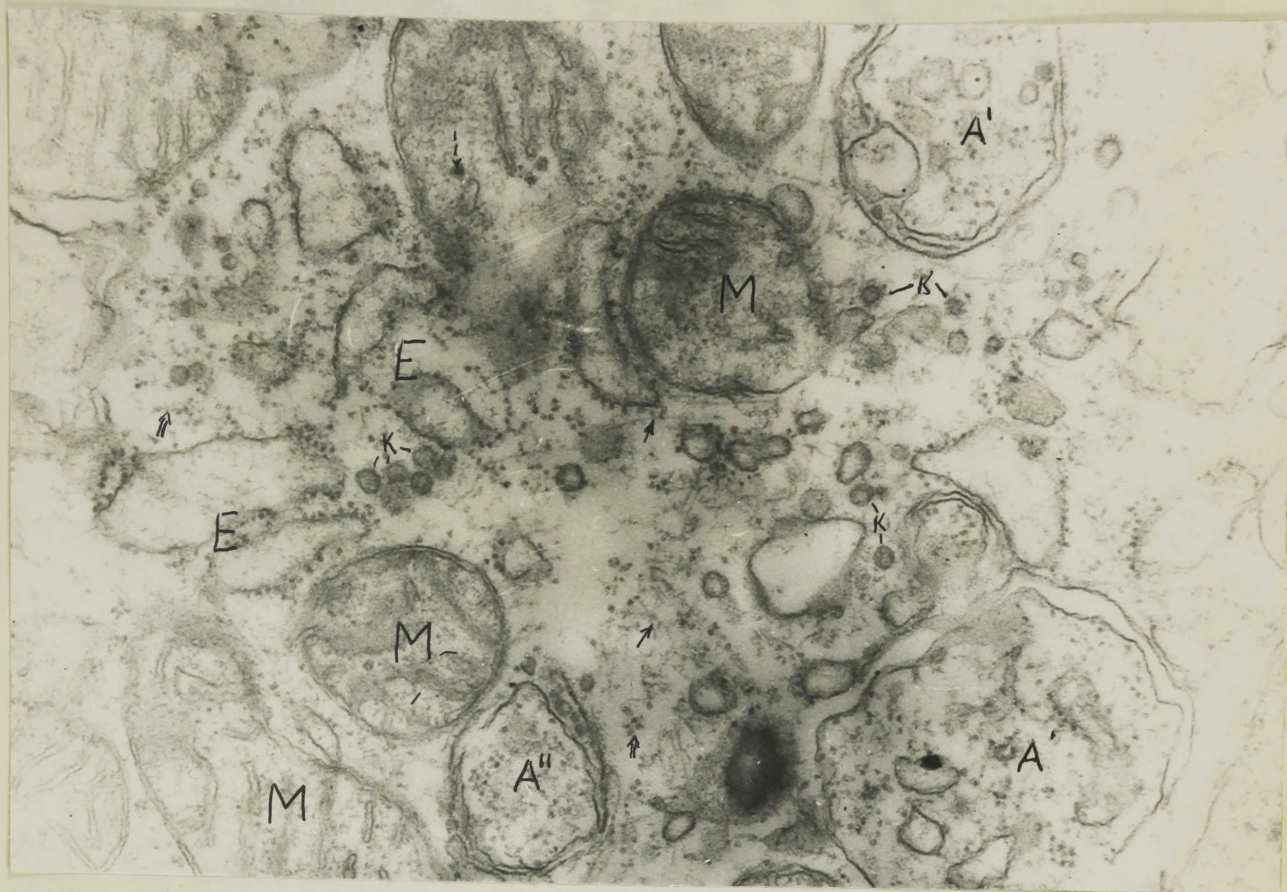
Joon.10. Endoplasmaatilise retiikulumi tsisternid (nool) kontrollkultuuri fibroblastis. Elektronmikroskoop.

S. 52800 x.

pind on ebahühtlaselt kaetud ribosoomidega. Vabad polüsoomid põhitsütoplasmas on spiraali- või rosetikujulised (ühikordne nool joon. 12).

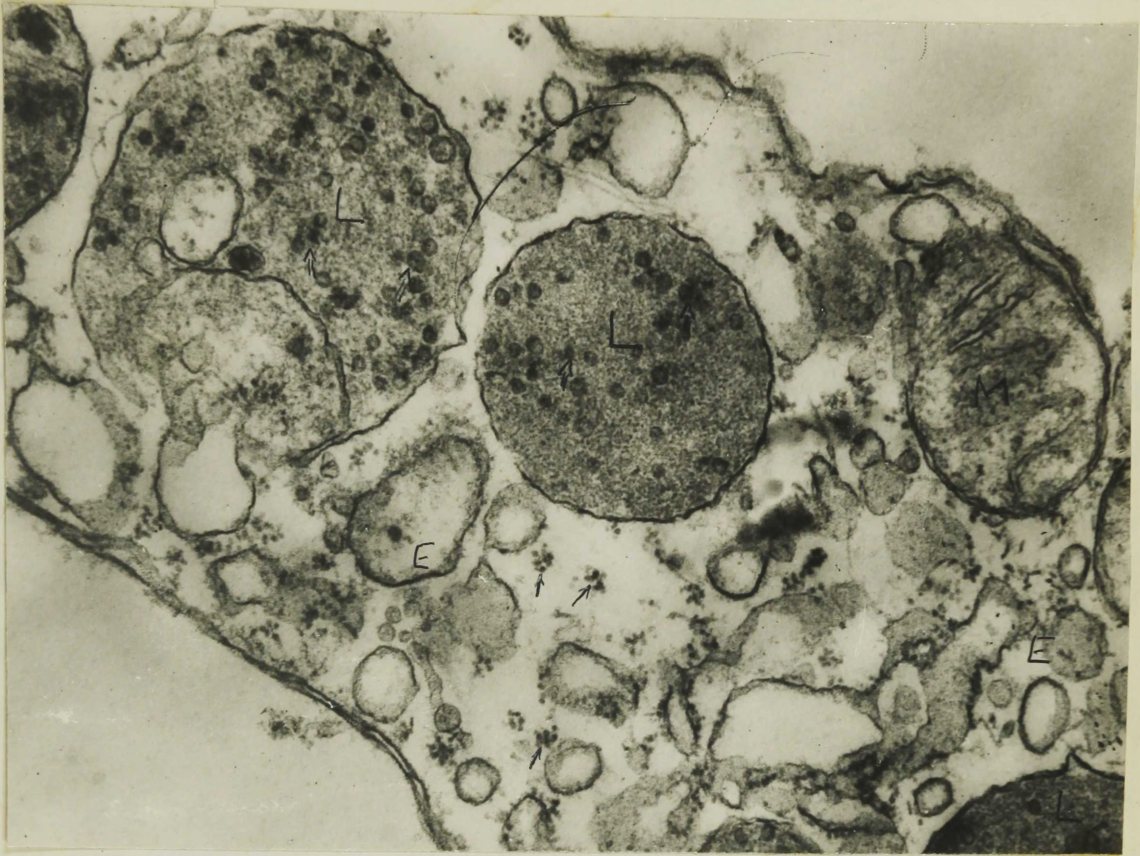
Mitokondrite maatriks on peensõmeraline ja veidi tihedam ümbritsevast põhimaatriksist. Mitokondrisiseseid graanuleid

esineb ühes ultraõhukeses lõigus 1-2 mitokondri kohta (katkendlik nool joon. 11). Sisemembraani sopised mitokondrite matrik-



Joon.11. Mitmesugused tsütoplasma struktuurid kontrollkultuuri fibroblastis. A, A', A'' - erinevas formeerumisastmes olevad lüsoosomid, M - mitokondrid, E - granulaarne endoplasmaatiline retiikulum, K - kaetud vesikulid. Ühekordne nool viitab filamentidele, kahekordne nool ribosoomidele, katkendlik nool intramitokondriaalsetele graanulitele. Elektronmikroskoop. S.56000x.

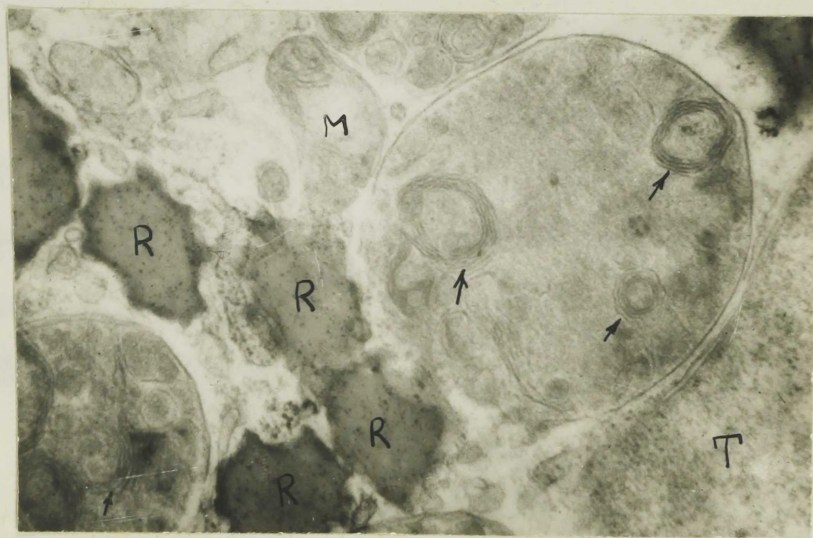
sis - kristad - paigutuvad enam-vähem võrdsete vahemaade järel (40 -60m μ), hõlmates pikkuselt kuni 4/5 mitokondri ristlõikest. üksikud mitokondrid on puhetunud, mistõttu matriks sisaldab heledaid kristavabasisid alasisid (joon.9). Ristlõikes tabatud mitokondrite vahemaa on tsütoplasmas suhteliselt konstantne (0,5-0,6M).



Joon.12. Lüsosoomid kontrollkultuuri fibroblastis. L - lüsosoomid, E - granulaarne endoplasmaatiline retiikulum, M - mitokonder. Ühekordne nool viitab rosetikujulistele polüsoomidele, kahekordne nool Golgi vesiikulitele lüsosoomide matriksis. Elektronmikroskoop. S. 52000 x.

Arvestades K ä r n e r i (К я р н е р , 1969, 1970) uurimistulemusi, võib eristada kana fibroblastide kultuurides rida erinevaid lüsosoomide arengustmeid. Koekultuuri latent-suse faasis on esindatud kõik lüsosoomide kujunemise vormid alates granulaarse endoplasmaatilise retiikulumi tsisternidega ümbritsetud autofaagilistest kolletest (joon.11) kuni tihedate sfääruliteni (joon.12, 13). Laskumata lüsosoomide ehituse üksikasjalisse kirjeldusse, toome välja vaid üksikud iseärasused, mis pakuvad huvi eriti antud töö seisukohalt. Autofaagilise

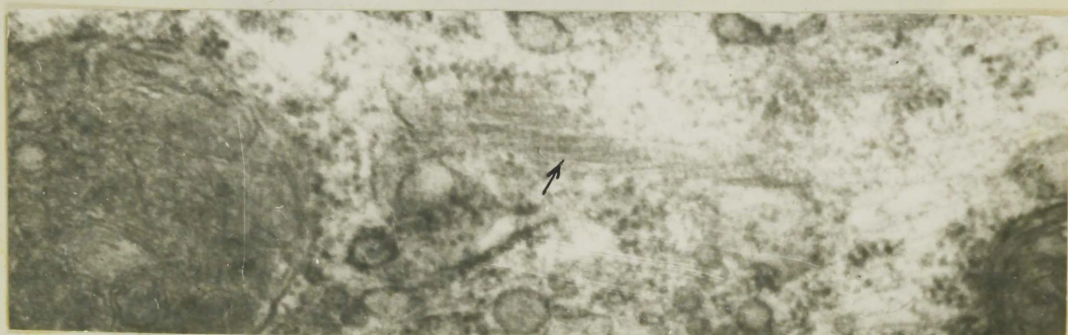
kolde esimesi astmeid iseloomustab ümbritsevate membraanide katkendlikkus. Äratuntav on nende päritolu granulaarsest endoplasmaatilisest retiikulumist (üksikud ribosoomid pindadel). Kolde sees on tsütoplasma struktuurid sel perioodil sageli identifitseeritavad (joon.11). Pärast taolise kolde ühinemist Golgi aparaaadi väikeste vesiikulitega, koldes asuvad organoidid ja tsütoplasma põhimaatriks sulavad kokku künkudeks ja lagunevad. Hilisemaid arengufaase iseloomustab maatriksi tihenemine ja välismembraani terviklikkus (joon.12). Paljud figuurid viitavad selliste lüsoosoomide jätkuvale ühinemisele Golgi aparaaadi vesiikulitega (kahekordne nool joon.12) ja endoplasmaatilise retiikulumi vakuoolidega (joon.12). Üksikutes rakkudes sugene-



Joon.13. Rasvatilgad ja müeloidfiguuridega (nool) lüsoosomid kontrollkultuuri fibroblastis. T - tuum, L - lüsoosomid, M - mitokonder, R - rasvatilgad. Elektronmikroskoop. S. 39600 x.

vad lüsoosomi maatriksisse müeloidfiguurid (nool joon.13). Sellises lüsoosomis Golgi vesiikulid puuduvad, ümbritsevas tsütoplasmas esineb aga rikkalikult rasvatilgakesi (joon.13). Rasva-

tilgakeste maatriks on homogeenne, kontuurid sopilised. Nende läbimõõt on 0,3- 0,4 μ . Lüüsoomide läbimõõt erinevates arengustades jääb 0,4-1,0 μ piiridesse. Tutvudes lüüsoomide ultrastruktuuriga on hästi mõistetav nende tiheduse suur varieeruvus elusates rakkudes faaskontrastmikroskoobiga uurimisel.



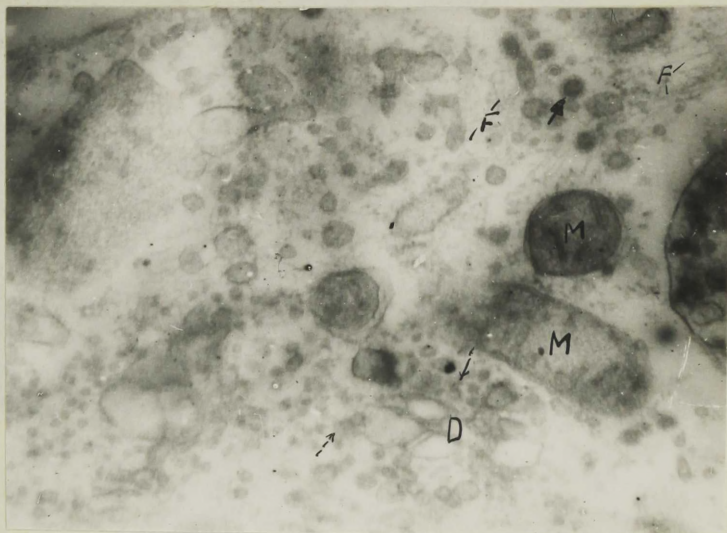
Joon.14. Filamentide tubulaarne paigutumine kontrollkultuuri fibroblastis (nool). Elektronmikroskoop. S. 42000 x.

Väljakujunenud mikrotuubuleid uuritava perioodil ei esine. Võib aga märgata filamentide kimpe, kus nad on torukesekujuliselt paigutunud (nool joon.14). Sellist torukesekujulist filamentide koondumist võib kõige enam kohata rakujätketes, harvem Golgi aparadi naabruses.

5.2.2. Muutused fibroblastide ultrastruktuuris kolhitsiini toimel.

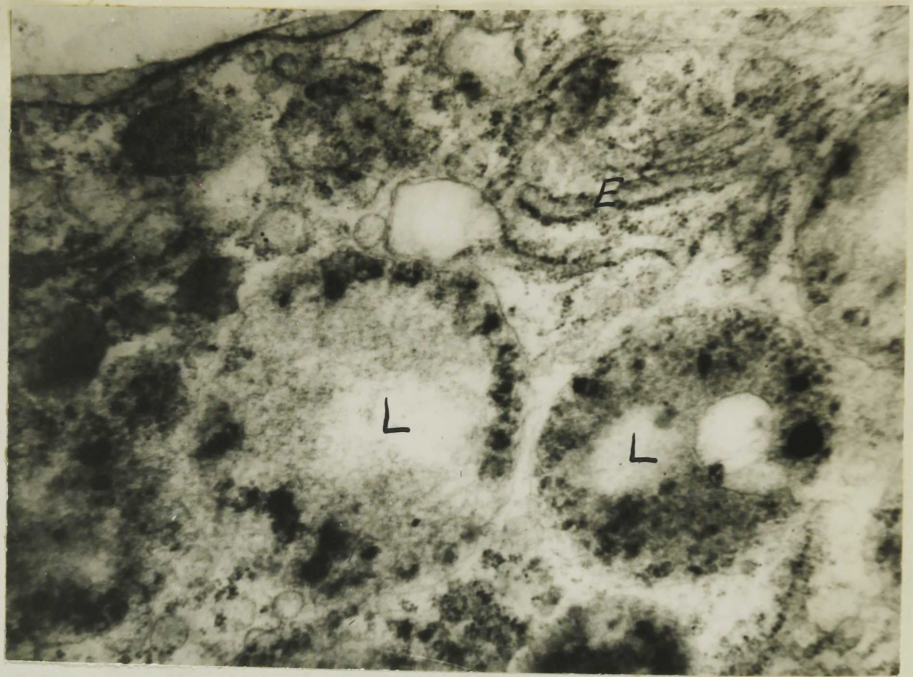
Juba tunniajalise katse jooksul laguneb Golgi aparatuur. Üheski rakus ei õnnestunud enam vaadelda jukstanukleaarset diktüosoomide võrgustikku. Selle asemel leidub tsütoplasmas hajusalt üksikuid diktüosoomide (joon., 15, 17, 18), mis on mõõtmetelt tunduvalt vähenenud ($\sim 150m\mu$) võrreldes kontrollkultuuris kasvavate

rakkudega. Ka sellised kolmest-neljast laienenud tsisternist koosnevad diktüosoomid on ümbritsetud väikeste vesiikulitega (katkendlik nool joon., 15, 17).

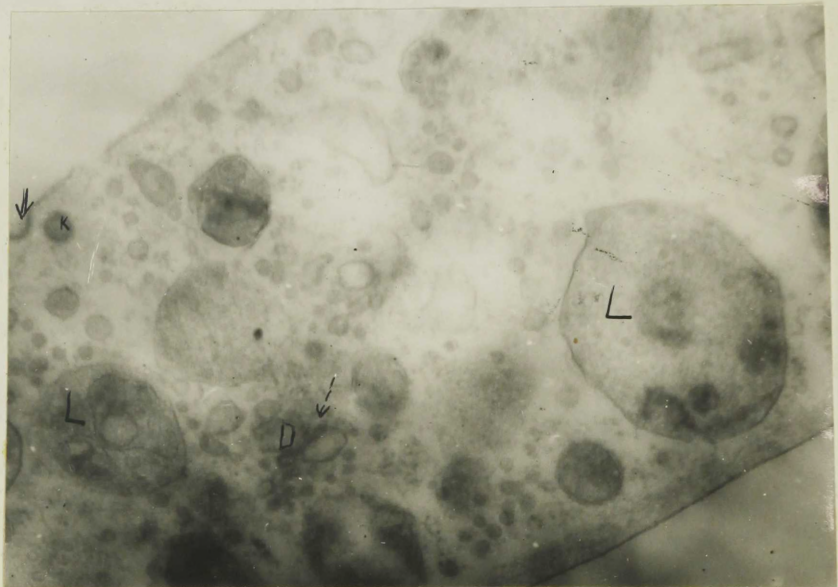


Joon.15. Fibroblast pärast ühetunnilist mõjutamist koahitsiiniga. D - diktüosoomid, M - mitokondrid, F - filamentid. Ühekordne nool viitab kaetud vesiikulitele, katkendlik nool väikestele vesiikulitele diktüosoomide naabruses. Elektronmikroskoop. S.35600x.

Endoplasmaatilise retiikulumi kanalite ja tsisternide hulk on enamuses rakkudes tugevasti redutseerunud. Säilinud tsisternide sisu on tihenenud (joon., 16). Tsisternidega otse-otse kontaktis ja vabalt kõikjal tsütoplasmas esineb arvukalt vesiikuleid ja suuremaid vakuole (80 - 120m μ). Väikesed vesiikulid, mis kontrollis arvukamalt ümbritsesid vaid diktüosoomi on nüüd elektrontihedad. Arvukalt esineb tsütoplasmas ka kaetud vesiikuleid (ühelikordne nool joon., 15, 17). Esineb plasmamembraani sopiseid, mis oma diameetri ja pinna poolest sarnanevad kaetud vesiikulitele (kahekordne nool joon., 17). Põhimaatriksis on suurenenud vabade ribosoomide ja filamentide hulk. Filamentid on jämedamad ($\sim 80\text{\AA}$) kui kontrollrakkudes ja moodustavad ti-

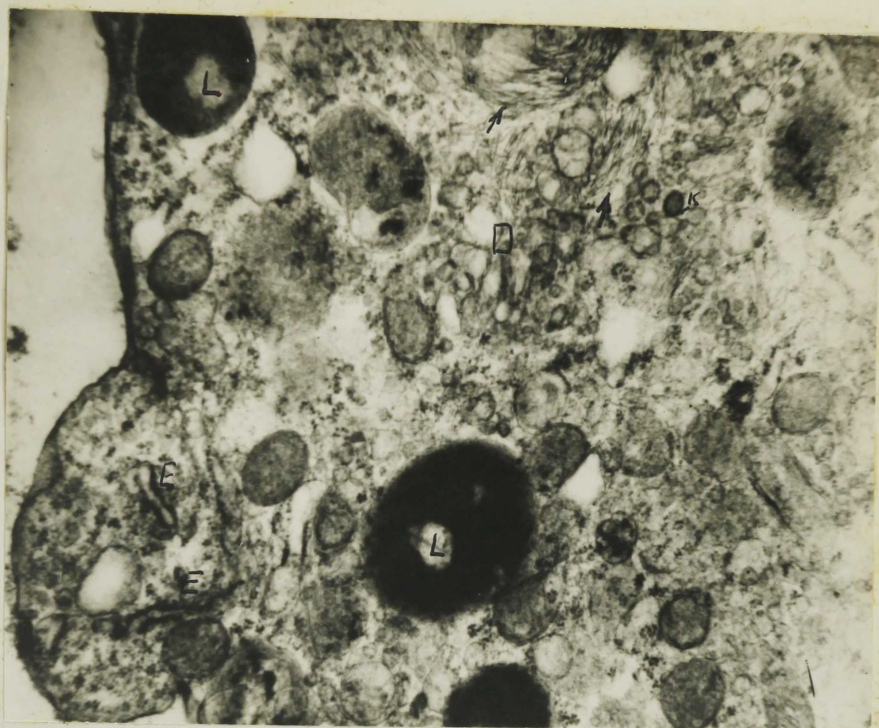


Joon.16. Endoplasmaatilise retiikulumi tsisternid ja lüsoosomid fibroblastis pärast ühetunnilist mõjutamist kolhitsiiniga. L - lüsoosomid, E - granulaarne endoplasmaatiline retiikulum, M - mitokondrid. Elektronmikroskoop. S. 38000x.



Joon.17. Fibroblast pärast ühetunnilist mõjutamist kolhitsiiniga. D - diktüsoomid, L - lüsoosomid, K - kaetud vesiikulid (ühekordne nool). Kahekordne nool viitab plasmamembraani sopisele, katkendlik nool väikestele vesiikulitele diktüsoomi juures. Elektronmikroskoop. S. 35600x.

hedaid kimpe või spiraliseeruvaid päsmakesi (nool. joon. 18).

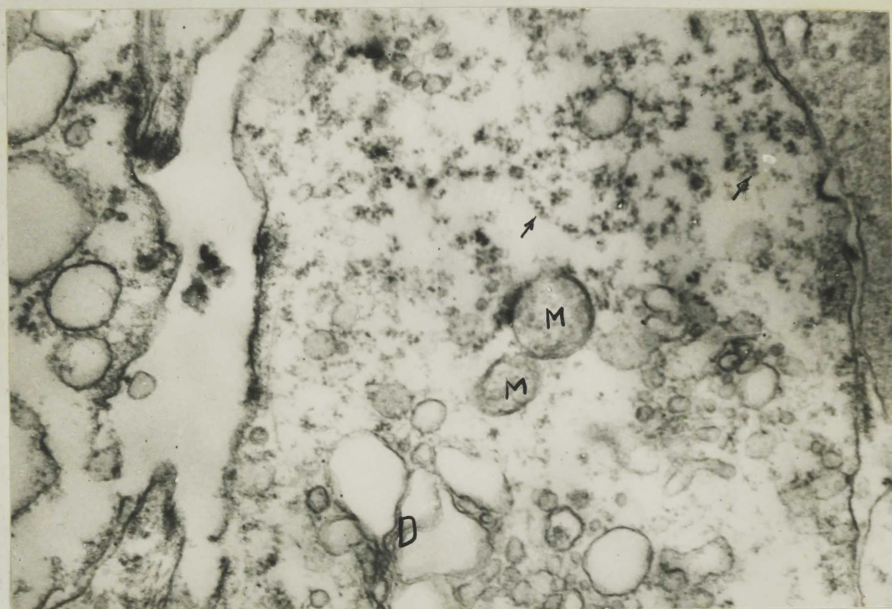


Joon.18. Filamentide kimbud (nool) fibroblastis pärast ühetunnist mõjutamist kolhitsiiniga. L - lüsoosomid, E - granulaarne endoplasmaatiline retiikulum, D - diktüosoom, K - kaetud vesiikulid. Elektronmikroskoop. S. 35800x.

Mitokondrid on kontrolliga võrreldes märgatavalt tihenenud, mistõttu kristad on maatriksis raskesti eristatavad. Kohati on mitokondrite välismembraan katkendlik. Katsetingimustes üleelavate rakkude tuuma ultrastruktuur ei ole ühe tunni jooksul muutunud. Küll aga väärub märkimist tuumakatte välismembraani fragmentatsioon.

Sügavad muutused leiavad aset kolhitsiini toimel lüsoosomide struktuuris. Katserakkudes ei leidu lüsoosomide moodustumise esimesi astmeid, kus endoplasmaatilise retiikulumi tsisternid segregeerivad tsütoplasmast üksikuid regioone. Suhteliselt arvukalt esineb aga astmeid, kus lammutamata tsütoplasma komponendid on ümbritsetud ühekordse membraaniga (joon. 17). Selliste

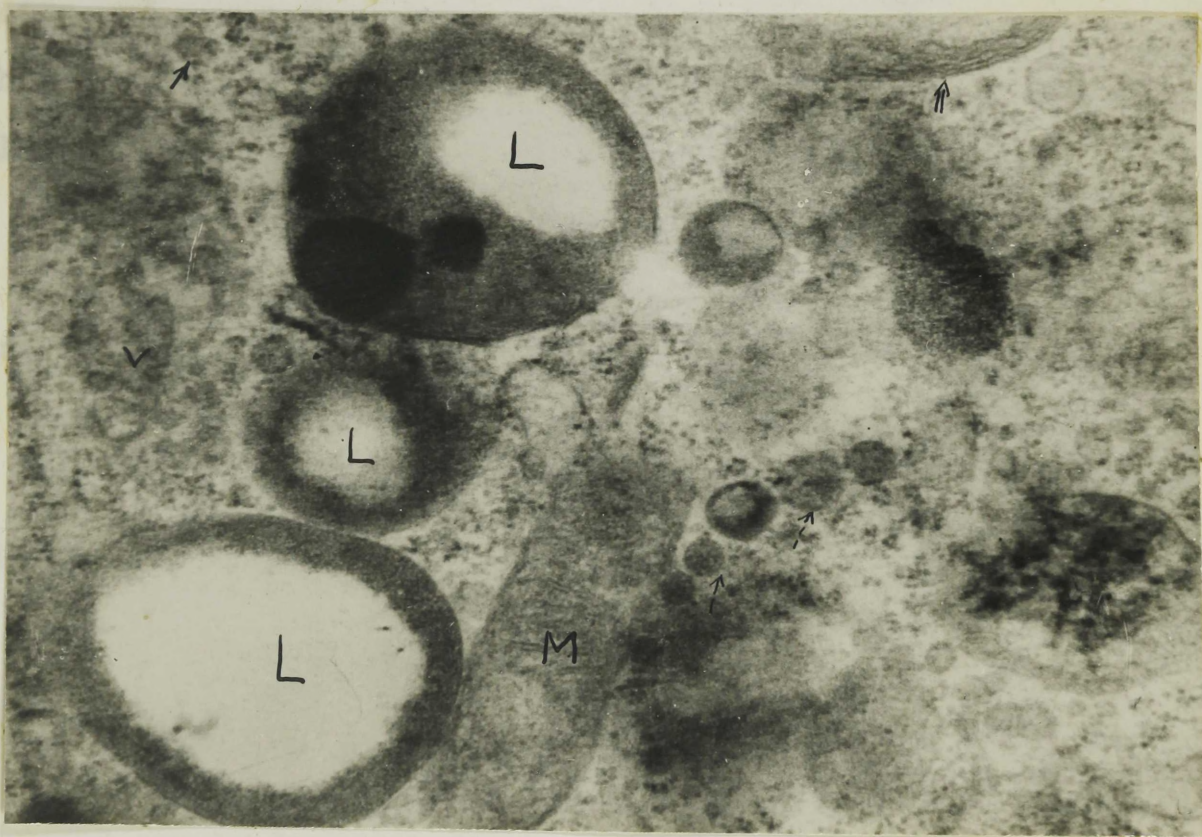
moodustiste matriks on märksa tihedam kui kontrollis. Rõhutada tuleb siinjuures asjaolu, et ei antud ega ka hilisemates formeerumisastmetes ei leidu lüsoosoomide matriksis väikeseid ve-siikuleid. Sealjuures väljakujunenud lüsoosoomide matriks on tsentraalselt hõredam või hoopis tühi (joon.16,18). Lüsoosoomide pinnal esineb elektrontiheda aine pilvekesi (joon.16). Kõigi kirjeldatud lüsoosoomide suurus ei erine kontrollist.



Joon.19. Fibroblast pärast kolmetunnilist mõjutamist kolhitsiiniga. D - diktüosoom, M - mitokondrid. Nool viitab spiraalsetele polüsoomidele. Elektronmikroskoop. S. 34000x.

Pärast kolmetunnilist mõjutamist kolhitsiiniga on fibroblastide ehitus veelgi rohkem muutunud. Kõige iseloomulikumaks jooneks on membraanide vähesus tsütoplasmas. Golgi aparaadist ja endoplasmaatilisest retiikulumist on säilinud vaid üksikuid fragmente (joon.19). Vabad ribosoomid paigutuvad kohati spiraalselt (nool joon.19), kohati aga ringikujuliselt, meenutades endoplasmaatilisest retiikulumist pärinevaid vakuole kontroll-kultuuri rakkudes (ühekordne nool joon.20). Väikeste tihedate

vesiikulite hulk on paljudes rakkudes vähenenud. Tähelepanuväärne on aga väikeste vesiikulite grupeerumine teatud tsütoplasma osadesse (joon.20). Uudsete moodustistena torkavad sil-



Joon.20. Fibroblast pärast kolmetunnilist mõjutamist kolhitsiiniga. L - lüüsoomid, M - mitokondrid, V - väikeste tihedate vesiikulite kogum. Ühekordne nool viitab ringikujuliselt paigutunud ribosoomidele, katkendlik nool suurematele elektrontihedatele vesiikulitele, kahekordne nool degenerereeruvale mitokondrile. Elektronmikroskoop. S. 48000x.

ma suuremad tihedad vesiikulid (kuni $0,1\mu$). Arvestades nende üleminekuvorme väikestest vesiikulitest võib oletada, et viimased on omavahel kokkusulanud (katkendlik nool joon. 20). Mitokondrid on endiselt tiheda maatriksiga. Seejuures leidub mito-

kondreid omapäraste degeneratiivsete tunnustega. Vaadeldavate figuuride põhjal võib oletada mitokondrist maatriksi väljavoolamist ja membraanelementide kokkusulamist. Sellise protsessi lõppfaasis eristame tihedalt üksteise kõrval asetsevate membraanide kogumikku (kahekordne nool joon.,20), mille ühel küljel on homogeenne ribosoomide-vaba mass ilma ümbritseva membraanita. Veelgi on suurenenud tsütoplasmas olevate filamentide hulk.

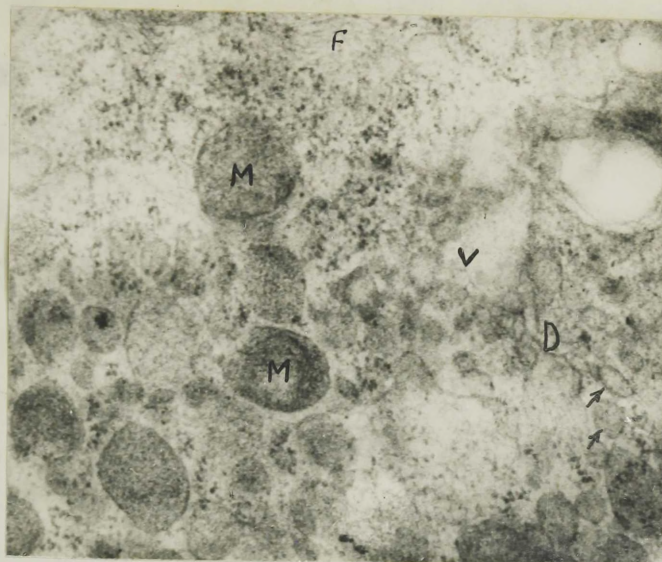
Kolmetunnise katseaja järel on lüsoosoomide maatriksis suured heledad alad. Maatriks on säilinud vaid lüsoosoomide pinnal (joon.20). Üheski lüsoosoomis vaadeldaval perioodil ei õnnestunud leida Golgi vesiikuleid.

Paljude rakkude tuumad on muutunud sopiliseks, kusjuures tuumakatte välismembraanist on säilinud vaid üksikuid fragmente.

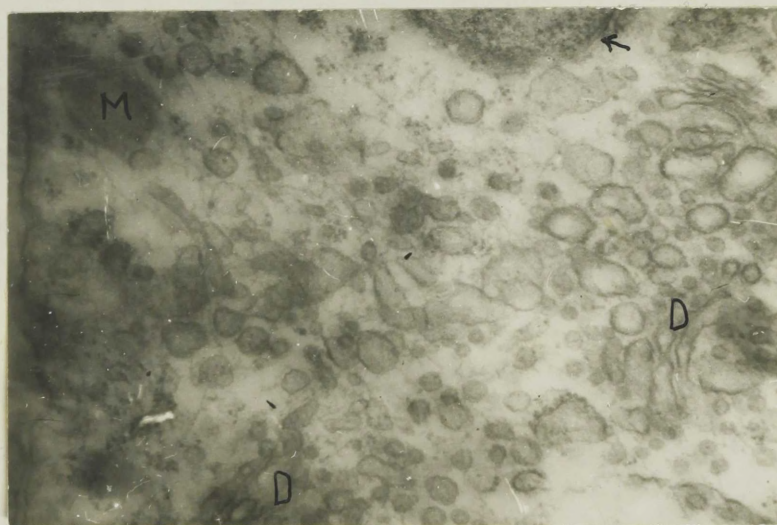
5.2.3. K a t s e f i b r o b l a s t i d e t a a s t u m i n e k o l h i t s i i n i v a b a s s ö ö t m e s .

Fibroblastide ultrastruktuuri muutusi jälgiti normaalses söötmes pärast kolmetunnilist mõjutamist kolhitsiiniga. Kontrollkultuuri fibroblastidele iseloomulik struktuur oli enamuses katserakkudes taastunud kahekümnenelja tunni jooksul. Taastumise jälgimiseks võtsime vaatluse alla rakkude iseärasused esimeste tundide jooksul.

Juba ühe tunni järel pärast söötme vahetamist esineb tsütoplasmas diktüosoomidele tüüpilisi tsisternide kogumikke, mis on ümbritsetud väikeste vesiikulitega (joon. 21). Diktüosoomide naabruses vesiikulite vahel leidub üksikuid ebakorrapäraste piirjoontega vakuole ($0,1 - 0,3\mu$). Nii tsisternide kui ka vakuoolide membraaniga on kontaktis väikesed vesiikulid. Viimas-



Joon.21. Fibroblasti ultrastruktuur pärast ühetunnilist viibimist kolhitsiinivabas söötmes. D - diktüosoomid, M - mitokondrid, V - vakuolid, F - filamendid. Nool viitab ribosoomidele vesikulite pinnal. Elektronmikroskoop. S. 38000x.



Joon.22. Diktüosoomide võrgustik fibroblasti tsütoplasmas pärast kolmetunnilist viibimist kolhitsiinivabas söötmes. T - tuum, M - mitokondrid, D - diktüosoomid. Nool viitab tuumakatte välismembraani väljasopistusele. Elektronmikroskoop. S. 35600x.

te koostises on toimunud muutused. Lisaks väikestele tihedatele vesiikulitele, milliseid kirjeldasime katsefibroblastides, võib tähele panna nende üleminekuid suurte ja heledate põikesteni, seda eriti diktüosoomitsooni perifeerias. Selliste põikeste pinnal on eristatavad üksikud ribosoomid (nool joon.21). Seniste katseandmete vähesuse tõttu ei ole selge, kas vaadeldavad diktüosoomid on täielikult uudismoodustised või esines nende tsentrites kolhitsiini mõju all säilunud Golgi aparraadi fragmente.

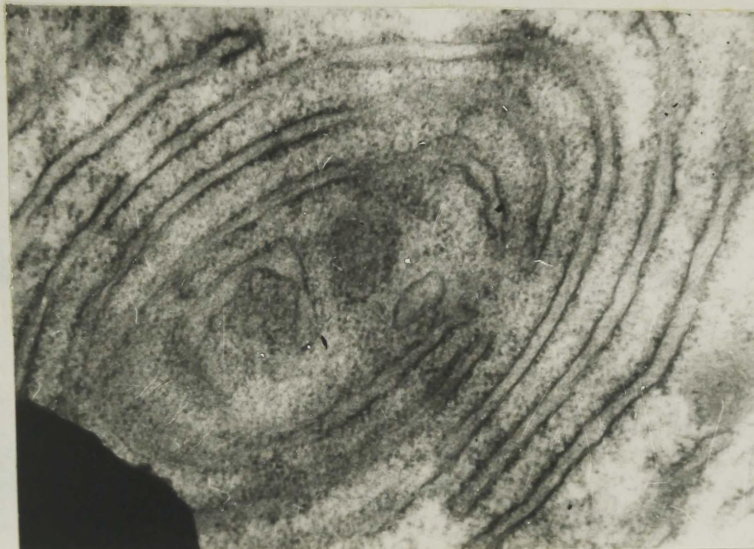
Rakkudes, mis on viibinud normaalses söötmes kolm tundi, on diktüosoomid seostunud tuuma naabruses võrgustikuks (joon.22). Enamus väikeseid vesiikuleid on omavahel seostunud tuubuliteks. Vaadeldaval perioodil esineb tsütoplasmas mitmesuguseid vaheastmeid väikestest vesiikulitest kuni endoplasmaatilise retiikulumi põikeste ja tuumakatte välismembraani väljasopistusteni (nool joon.22).



Joon.23. Endoplasmaatilise retiikulumi elemendid (E) ja vabad polüsoomid (nool) fibroblasti tsütoplasmas pärast ühetunnilist viibimist kolhitsiinivabas söötmes. Elektronmikroskoop. S. 45000x.

Endoplasmaatilise retiikulumi areng algab esialgsete vaatluste põhjal ringi- ja ovaalikujuuliselt paigutunud ribosoomidest. Sellistest varieeruva diameetriga ribosoomikoondistest esineb üleminekuastmeid vakuoolide ja tsisternideni (joon.23). Vaheast-

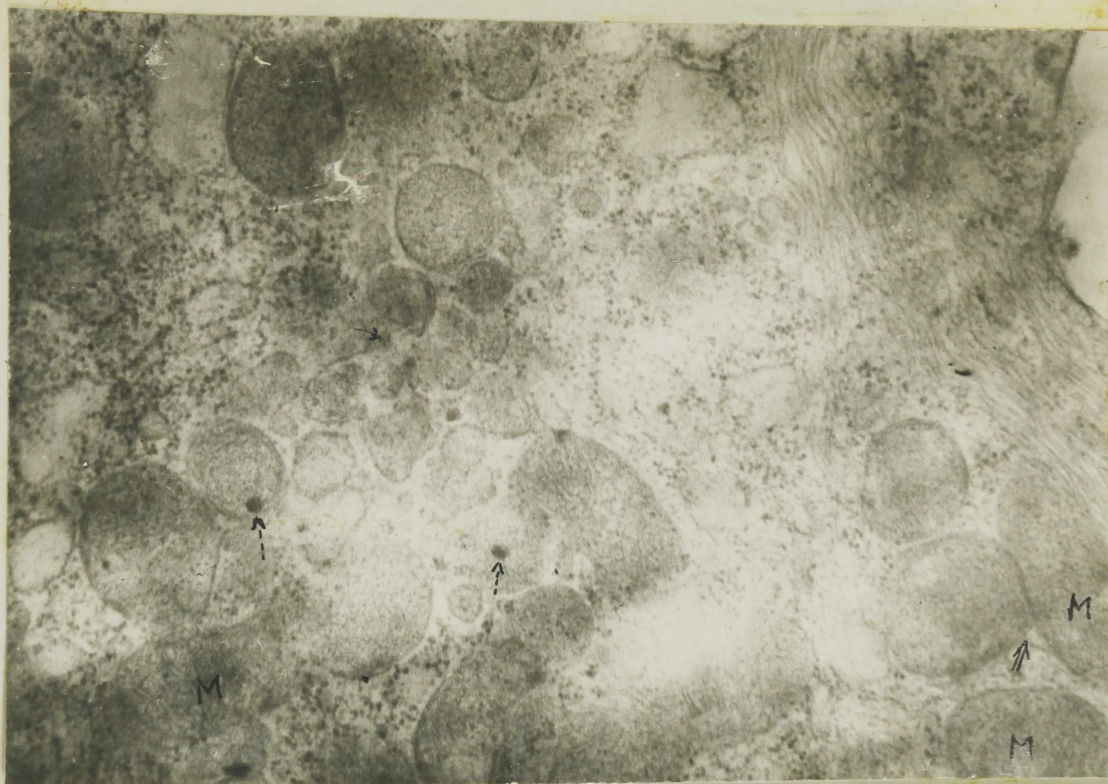
metel on membraan sageli katkendlik ja nõrga kontrastiga. Kolme tunni jooksul on paljudes rakkudes kujunenud kontrollkultuuri fibroblastidele iseloomulikud endoplasmaatilise retiikulumi elemendid. Retiikulumi tsisternid paigutuvad seejuures kohati



Joon.24. Kotsentriliselt paigutunud endoplasmaatilise retiikulumi tsisternid pärast kolmetunnilist viibimist kolhitsiinivabas söötmes. Elektronmikroskoop. S. 35600x.

kotsentriliste ringidena (joon.24). Tsisternid asetsevad enam-vähem võrdsete vahemaade järel ($\sim 150\text{m}\mu$). Ribosoomid levivad tiheidalt nii tsisternide vahel kui ka membraanide pindadel. Membraaniga ümbritsetud õõned on peensõmeraliselt elektrontihedad.

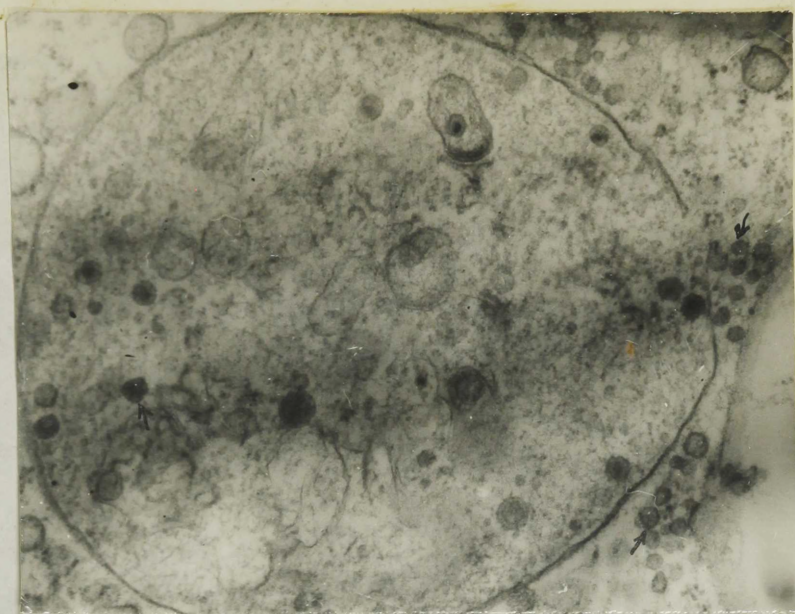
Suuremad tihedad vesiikulid, milliseid jälgisime fibroblastides kolmetunnilise mõjutamise järel kolhitsiiniga, on koondunud ühe tunni jooksul normaalses söötmes gruppidesse (joon.25). Nende diameeter varieerub $0,2 - 0,3\text{m}\mu$. Oma ehituselt on paljud sellised struktuurid võrreldavad kirjanduses tuntud mikrokehadega. Kirjeldatavad sfäärulid on ümbritsetud ainsa membraaniga ja evivad tihedat sisu. Nendega on kontaktis mitmesugused väikesed vesiikulid (ühekordne nool joon.25). Sfäärulid omakorda on kohati ühenduses mitokondritega (kahekordne nool joon.25). Sugulusele mitokondrite ja sfäärulite vahel viitavad ka intra-



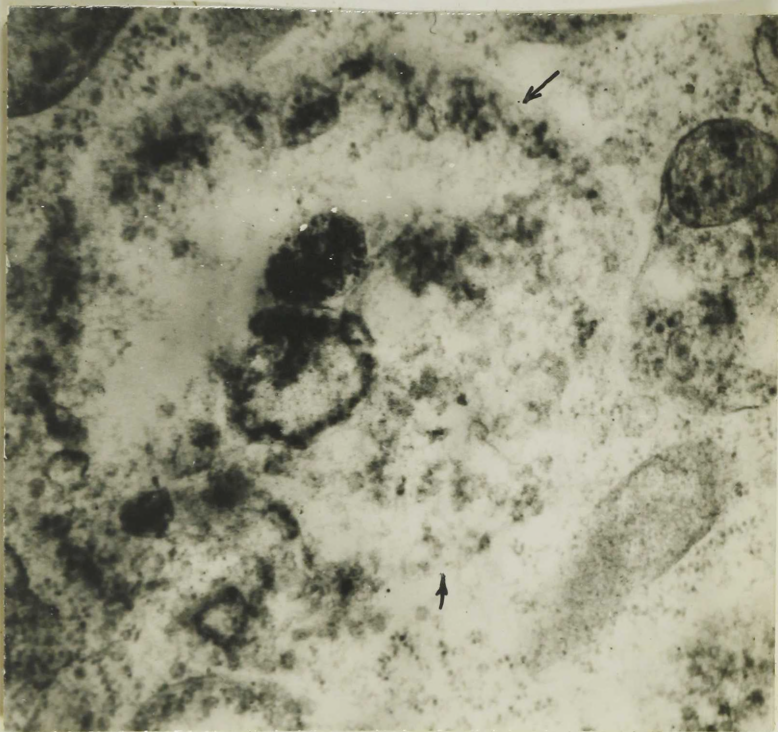
Joon.25. Gruppidesse koondunud tihedad vesiikulid fibroblasti tsütoplasmas pärast ühetunnilist viibimist kolhitsiini vabas söötmes. Ühekordne nool viitab väikeste vesiikulite ühendusele sfäärulitega, kahekordne nool viitab sfäärulite ühendusele mitokondritega, katkendlik nool viitab intramitokondriaalsetele graanulitele. F - filamentid, M - mitokondrid. Elektronmikroskoop. S. 45000x.

mitokondriaalsed graanulid viimaste maatriksis (katkendlik nool joon.25).

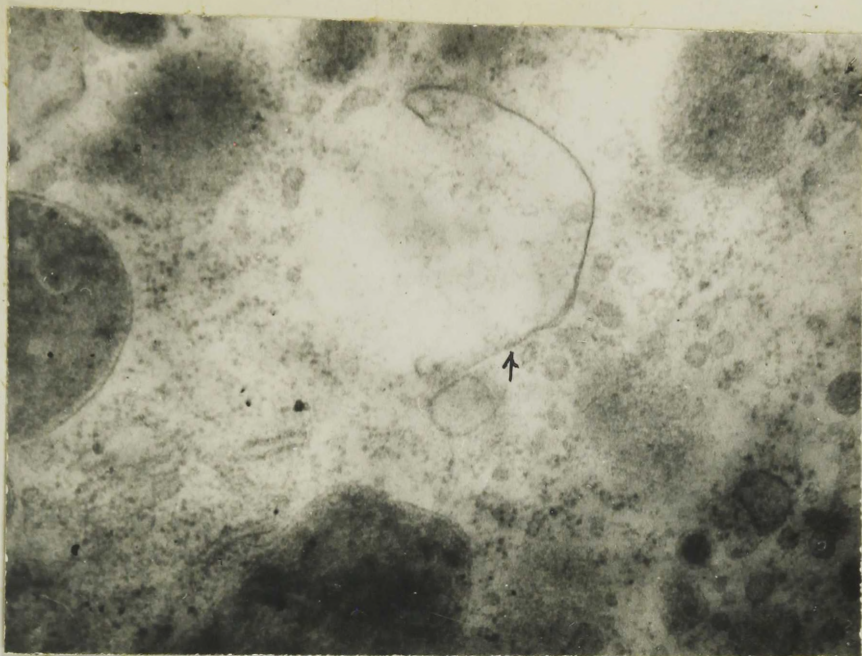
Normaalse söötme taastamisel ilmuvad autofaagilise vakuooli ümber ja samuti maatriksis esimesed Golgi vesiikulid juba poole tunni jooksul (nool joon.26). Autofaagilise vakuooli ühinemisel Golgi vesiikulitega kaasneb sinna sattunud tsütoplasma komponentide intensiivne lagunemine (nool joon.27). Golgi vesiikulid ilmuvad ka formeerunud lüsoosoomide naabrusesse. Viimaste maatriksis täheldatud tsentraalne hele tsoon kahaneb oma mõõt-



Joon.26. Pärast poole tunnilist viibimist normaalses söötmes ilmuvad autofaagilise vakuoli sisse ja tema vahetusse naabrusesse Golgi vesiikulid (nool). Elektronmikroskoop. S. 38000x.



Joon.27. Golgi vesiikulite ühinemisel autofaagilise vakuooliga toimub viimases intensiivne tsütoplasma komponentide lagunemine. Elektronmikroskoop. S. 45000x.



Joon.28. Formeerunud lüsoosomid ja moodustuv autofaagiline kolle (nool) fibroblasti tsütoplasmas pärast ühetunnilist viibimist kolhitsiinivabas söötmes. Elektronmikroskoop. S. 35600x.

metelt kuni kaob täiesti esimeste tundide jooksul (joon.28). Tsütoplasmas on vaadeldavad katkendliku membraaniga autofaagilised vakuolid (nool joon.28), mis iseloomustavad lüsoosomide moodustumise varajasi astmeid kontrollkultuurides.

Filamentide kimbud tsütoplasmas kaovad. Ühetunnilise taastumisaaja järel esineb filamentide vahel hulgaliselt ribosome. Kolme tunni jooksul filamentide hulk on kahanenud. Golgi tsoonis moodustavad nad diktüosoomide vahel õrna võrgustiku.

6. A R U T E L U

Mikrokinovõtetega on kindlaks tehtud, et koekultuuris kasvavate rakkude tsütoplasma komponendid on pidevas saltatoorses liikumises (W e n d t , 1964; F r e e d , 1965; Б и с т р о в и др., 1966). Käesoleva töö seisukohalt on erilise väärtusega hiljuti saadud andmed, et kolhitsiini mõjul selline liikumine tsütoplasmas katkeb (F r e e d et al., 1968; В а с и л ь е в, 1969). Kolhitsiini mõju on seega ühesugune nii raku interfääsile kui ka mitoosile, kus nimetatud alkaloid takistab kromosoomide liikumist poolustele. Võib väita, et kolhitsiini toimel lakkab raku kineetiline aktiivsus. Siinkohal kerkib küsimus, mis kannab tsütoplasmas seda aktiivsust? Kui rida töid oletab mikrotuubulite osavõttu rakukomponentide liikumises, siis meil uuritud fibroblastides mikrotuubulid sageli puudusid. Jääb üle otsida mikrotuubulite sugulaslikke elemente rakus, mis täidaksid sama funktsiooni kui mikrotuubulidki. Kui arvesse võtta mikrotuubulite ehitust ja päritolu käsitlevaid uurimusi, siis tuleksid sugulaslike elementidena arvesse tsütoplasmas esinevad filamendid. Mõnede hüpoteeside kohaselt on ju mikrotuubulid samuti filamentide agregaadid (R o b b i n s and G o n a t a s , 1964; S t e p h e n s , 1968). Kana fibroblastide tsütoplasmas esinesid koekultuuri latentsuse faasis peened filamendid ($\sim 50\text{\AA}$), mis Golgi tsoonis moodustasid võrgustiku. Tao-

line filamentide organisatsioon hävis kolhitsiini toimel. Seejuures filamendid katserakkudes ei kadunud, kuid nad olid jämedamad kui kontrollis ($\sim 80\text{\AA}$) ja paigutusid tihedate kimpudena. Arvestades peente filamentide organiseeritust kontrollrakkudes, selle lagunemist katses ja taastumist kolhitsiinivabas söötmes, on tõenäoline, et nad vastutavad fibroblastide kineetilise aktiivsuse eest koekultuuri latentsuse faasis.

Morfoloogiliste vaatluste põhjal ei ole võimalik selgitada filamentide muutumise olemust kolhitsiini toimel. Võib viidata vaid biokeemilistele töödele, mille järgi kolhitsiinil on omadus moodustada kompleks mikrotoubulite valkudega (B o r i s y and T a y l o r , 1967a,b; S h e l a n s k i and T a y l o r , 1967; C r e a s e y and C h o u , 1968). Selline kolhitsiini kompleks on aga suhteliselt ebapüsiv ja laguneb otsekohe kolhitsiini kontsentratsiooni vähenemisel keskkonnas (T i l n e y , 1968). Viimased andmed resoneeruvad meie tulemustega kolhitsiini mõju suhteliselt kiirest lakkamisest normaalse söötme taastamisel katsekultuuris. Taastumisprotsesside esialgset kiirust ei saa seletada sünteesiprotsesside taastumisega, vaid pigem valmissünteesitud ainete kokkuviimisega kineesi taastumisel rakus. Ülaltoodud interpretatsioon peenikeste filamentide primaarsest kahjustumisest koekultuuri fibroblastides, analoogiliselt mikrotoubulitele kirjanduse andmetel, vajab edaspidiseid uurimusi. Tulevikus on tarvis jälgida koekultuure ka sellistes faasides, kus toimub rakkude mitootiline jagunemine. Kui mikrotoubulite esinemise korral tsütoplasmas vaadeldavad muutused on praeguste tulemustega sarnased, siis oleme lisanud kaaluka tõendi oletusele mikrotoubulite ja filamentide dünaamilisest tasakaalust rakus (S a n d b o r n

et al. 1966).

Kolhitsiini toimel sugenevad muutused teiste organoidide ehituses esimeste katsetundide jooksul on hästi põhjendatavad liikumise katkemisega rakus. Nagu kirjandusest teada, pidurdavad sünteesiprotsessid rakus vaid pikema katseaja jooksul (S t u b b l e f i e l d et al. 1967). Samal ajal Golgi aparadi ja endoplasmaatilise retiikulumi tsisternid vähenevad oma mõõtmetelt ning kohati ei ole üldse enam jälgitavad. Tule-tame meelde, et nimetatud membraansüsteemid, eriti aga endo-plasmaatiline retiikulum, on kirjanduse andmetel väga labiil-sed moodustised (K a v a n a u , 1963; H o p t e p , 1963), mille dünaamikat on õnnestunud demonstreerida ka mikrokinovõte-tega (B u c k l e y , 1965). Oma katsetulemuste põhjal võime väita, et selliste süsteemide füsioloogiliseks regeneratsioo-niks on vaja membraanide (või üldse ainete) pidevat lisandu-mist. Selles osas köidavad tähelepanu väikesed vesiikulid, mis kontrollrakkudes on morfoloogiliselt tihedalt seotud käsitle-vate membraansüsteemidega. Ühetunnilise katseaja jooksul väi-kesed vesiikulid levivad üle kogu tsütoplasma, membraansüsteemide taastumise ajal nende arv aga järsult suureneb. On põh-just oletada, et formeeruv membraan moodustab esialgu väike-seid vesiikuleid (G r i f f o n , 1968). Taoliste vesiikulite intensiivse moodustumisega kaasneb meie katsetes helikoidsete polüsoomide ringikujuline (ultraõhukestes lõikudes) paigutus, mida on tähele pandud membraanide moodustumisel ka intaktsetes embrüonaalsetes kudedes (L e e s o n and L e e s o n , 1965). Peab alla kriipsutama asjaolule, et väikesed vesiikulid on tsü-toloogilise kirjanduse kaudu tuntud kõikides rakkudes, mis veel kordselt viitab nende võimalikule osale membraanide moodustu-

misel. Veelgi enam, samad vesiikulid võivad sisaldada mitmesuguseid substantse, nagu happelisi hüdrolaase (N o v i k o f f 1963; К я р н е р , 1970), polüsahhariide (N o r t h c o t e , 1968) ja rida eksogeenseid materjale (T r u m p , 1961; M a u n s b a c h , 1966). Seega võib tegemist olla väikeste vesiikulite näol raku elementaarse transportsüsteemiga, mis tagab teistele organoididele nende funktsioneerimiseks vajalikud ained või varustab nad membraaniga. Õige adressaadi leidmise kindlustab aga ümbritseva membraani organisatsiooni spetsiifika (D i n g l e , 1968), kuid võib-olla ka muud regulatsiooni-mehhanismid.

Alljärgnevalt vaatame kuidas mõjutab tsütoplasma staatika lüsoosoomide arengut, mille üksikud etapid on suhteliselt paremini tuntud kui teistel organoididel. Katserakkudes leidsime arvukalt autofaagilisi vakuole, kus lammutamata tsütoplasma komponendiä on ümbritsetud membraaniga. Edasist arengut lüsoosoomideks kolhitsiini manulusel ei toimu. Seega leiab kinnitust seisukoht, et lüsoosoomide moodustumisel esinevad kõrvuti heterofagosoomidega ka autofagosoomid (E r i c s s o n , 1969; К я р н е р , 1970). Erilist huvi äratav tähelepanek, et kolhitsiin ei mõjuta autofagosoomi membraani moodustumist kollet ümbritsevatest endoplasmaatilise retiikulumi tsisternidest (vt. К я р н е р , 1970). Segregeeritud tsütoplasma komponentide lammutamine algab aga alles taastumisperioodil, kui autofagosoom ühineb väikeste vesiikulitega (võrdluseks primaarsed lüsoosoomid N o v i k o f f , 1963). Veelkordselt tõestub, nüüd juba meie katsete põhjal, väikeste vesiikulite osa ainete transpordis. Katseaja jooksul lüsoosoomide maatriks hõreneb. Taastumise perioodil, kui lüsoosoomid ühinevad väikeste vesiiku-

litega, nende maatriks tiheneb uuesti. Meil ei ole otseseid tõendeid juurdelisatavate substantside iseloomu kohta, kuid toetudes K o e n i g i (1962a,b) töödele, võib oletada, et maatriks moodustub peale valkude ka polüsahhariididest. Seejuures ei esinenud meie katsetes polüsahhariidide hulga vähenemist valgusmikroskoopia tasemel. Lüsosoomide maatriksi hõrenemine võib seega seotud olla ka polüsahhariidide transpordi häirumisest, mitte aga sünteesiprotsesside lakkamisest. Arvestada tuleb sellega, et peeneid muutusi ainete intratsellulaarses lokalisatsioonis valgusmikroskoobiga ei ole võimalik detekteerida.

Seoses lüsosoomidega peatume lühidalt ka "kaetud vesiikulite" probleemil. Nimetatud struktuuridele omistatakse osa valgupinotsütoosis (R o t h and P o r t e r , 1963, 1964; F a w c e t t , 1964). Meie katserakkudes ei õnnestunud jälgida "kaetud vesiikulite" seoseid lüsosoomidega, nagu see on omane kontrollrakkudele (vt. K r j a n e p , 1970).

Mitokondrite mõõtmed kolhitsiini toimel vähenesid ja maatriks tihenes, kusjuures pikemaajalisel katsel (3 tundi) paljud mitokondrid degenererusid. Taastumiskäigus avastasime mitokondrite intensiivsele formeerumisele viitavaid figuure. Siinjuures oli võimalus jälgida väikeste vesiikulite osavõttu ka sellest protsessist. Omavahelise ühinemise resultaadina moodustusid tihedad sfäärilised kehad ($0,2-0,3\mu$), mis omakorda ühinesid olemasolevate mitokondritega. Meie praegustest materjalidest ei selgunud, kas kirjeldatud tihedad sfäärulid võivad ka iseseisvalt mitokondriteks muutuda, või toimub alati seostumine varem eksisteerinud mitokondritega. Sfäärilised kehad oma morfoloogialt sarnanevad kirjanduses tuntud mikrokehadega. Kui meie poolt tulevikus läbiviidavad tsütokeemilised reaktsioonid sa-

mastavad vaadeldavad struktuurid mikrokehadega, siis ei saa kõrvale heita R o u i l l e r ja B e r n a r d i (1956) kunagist hüpoteesi viimaste osast mitokondrite regeneratsioonil.

Meie uurimistulemustest ilmnes, et vähediferentseerunud monoplasmaatilised fibroblastid on kolhitsiini suhtes tundlikumad kui diferentseerunud fibroblastid. Diplasmaatilisuse astme fibroblastide diferentseerumise morfoloogilise kriteeriumina (L i n d n e r , 1962) on suhteliselt ebamäärane. Paremad ei ole ka rakkude diferentseerumisastme määramiseks võimalused elektronmikroskoopilisel tasemel. Et täpsemalt hinnata fibroblastide tundlikkust kolhitsiinile sõltuvalt diferentseerumisastmest, on vajalikud autoradiograafilised uurimused rakkudevahelise aine sünteesi intensiivsusest.

Esitatud arutelus tõstatasime rida küsimusi, millele ei ole võimalik praeguste andmete tasemel vastata. Kindel on aga see, et kolhitsiini kasutamine aitab kaasa paljude tsütoloogiliste probleemide lahendamisele.

K O K K U V Ö T E

Töös uuriti kolhitsiini (5 μ /ml) mõju kana embrüode "nahk-
-lihaskoe" esmaskultuuride fibroblastidele. Paralleelselt vii-
di läbi elusate rakkude jälgimine faaskontrastmikroskoobiga
ja ultraõhukeste lõikude uurimine elektronmikroskoobiga. Töös
seati üles kaks küsimust:

1. Missugused muutused toimuvad kana fibroblastides kolhitsii-
ni toimele?
2. Kuidas rakud taastuvad kolhitsiinivabas söötmes pärast mõ-
jutamist?

Selgus, et tsütoplasmas lagunes peenikeste filamentide
($\sim 50\text{Å}$) võrgustik. Selle asemel vaadeldi veidi jämedamate ($\sim 80\text{Å}$)
filamentide kimpusid. Suured membraansüsteemid (Golgi aparaat
ja endoplasmaatiline retiikulum) vähenesid mõõtmetelt, väike-
sed vesiikulid (40-60m μ) levisid hajutatult või gruppina
üle kogu tsütoplasma. Mitokondrid tihenesid ja osa nendest la-
gunes kolmetunnilise katse jooksul. Kui kontrollrakkudes koh-
tasime kõikides arenguastmetes olevaid lüsoosome, siis katse-
rakkudes nende moodustumise esimesi astmeid ei leitud. Lüso-
soomide maatriks tsentraalselt hõrenes.

Pärast kolmetunnilist mõjutamist kolhitsiiniga, viidi
koekultuurid normaalsesse söötmesse ning vaadeldi esimeste
tundide jooksul raku organoidide taastumist. Näeme diktüosoo-

mide, endoplasmaatilise retiikulumi ja lüsoosoomide moodustumist, aga samuti väikeste vesiikulite arvu suurenemist tsütoplasmas. Kaovad jämedate filamentide kimbud. Gruppidena esineb tsütoplasmas tihedaid sfääruleid ($0,2-0,3\mu$), milledest osa on kontaktis mitokondritega. Ööpäeva möödumisel pärast söötme vahetamist on raku struktuurid sedavõrd taastunud, et on raske vahet teha kontrollkultuuri rakkude ja katserakkude vahel.

Töö arutelus püstitatakse rida hüpoteese kolhitsiini mõjul sugenevate muutuste võimalikust mehhanismist rakus.

О ВЛИЯНИИ КОЛХИЦИНА НА ФИБРОБЛАСТЫ ПЕРВИЧНЫХ ТКАНЕВЫХ КУЛЬТУР

Резюме

В работе изучалось влияние колхицина (5 μ /мл) на фибробласты первичных тканевых культур эмбрионов курицы. Проводились исследования живых клеток с помощью фазово-контрастного микроскопа и ультратонких срезов с помощью электронного микроскопа. В работе было затронуто два вопроса:

1. Какие изменения происходят в интерфазных фибробластах под влиянием колхицина?
2. Как восстанавливаются клетки после влияния колхицина в нормальной среде?

Выяснилось, что сеть тонких ^(~50Å) филаментов в цитоплазме разрушалась под влиянием колхицина. В цитоплазме возникали пучки более толстых филаментов (~80 Å). Крупные системы мембран (аппарат Гольджи, эндоплазматическая сеть) уменьшались в размерах, мелкие пузырьки (40-60 м μ) распространялись рассеянно или группами по всей цитоплазме. Митохондрии уплотнились и частично разрушались после трехчасового опыта. В подопытных клетках мы не обнаруживали первых стадий развития лизосом. Плотность матрикса лизосом центрально изменялась.

После трехчасового опыта тканевые культуры поместили в нормальную среду и следили за восстановлением клеточных орга-

ноидов в течение первых часов. Уже через полчаса наблюдалось увеличение цистерн гиктиосом и эндоплазматической сети. В цитоплазме возрастало количество мелких пузырьков одновременно с интенсивным возникновением последних. Обнаруживалось дальнейшее развитие аутофагосом в лизосомах, а также уплотнение матрикса предшествующих лизосом. Пучки толстых филаментов исчезали. Наблюдались очаги скопления плотных сферум (0,2 - 0,3 м), часть которых находилась в контакте с митохондриями. После суток пребывания подопытных клеток в нормальной среде их структура не отличалась от контрольных клеток.

В данной работе мы выдвигаем гипотезу о возможных механизмах воздействия колхицина на клеточную структуру.

K I R J A N D U S

- A m o r o s o , E . 1935. Colchicine and tumor growth. *Nature*, 135, 266-268.
- B a r b e n , H . and C u l d a n , H . 1943. The effects of cold and colchicine on mitosis in the newt. *Proc.Roy. Soc.London*, 131, 258-271.
- B e n n e t t , H . S . and L u f t , J . H . 1959. S-collidine as a basis for buffering fixatives. *J.Biophys.Biochem.Cytol.*, 6, 113-114.
- B o r i s y , G . G . and T a y l o r , E . W . 1967a. The mechanism of action of colchicine. Binding of colchicine-H to cellular protein. *J.Cell Biol.*, 34, 525-533.
- B o r i s y , G . G . and T a y l o r , E . W . 1967b. The mechanism of action of colchicine. Colchicine binding to sea urchin eggs and the mitotic apparatus. *J.Cell Biol.*, 34, 535-548.
- B r i n k l e y , B . R . 1965. Ultrastructure studies of the mitotic apparatus and the related structures during colcemid inhibition and reversal in Chinese hamster cells in vitro. *J.Cell Biol.*, 27, 14A.
- B r i n k l e y , B . R . , S t u b b l e f i e l d , E . and H s u , T . C . 1967. The effects of colcemid inhibition and

- reversal on the fine structure of the mitotic apparatus of Chinese hamster cells in vitro. *J.Ultrastruct.Res.*, 19, 1-18.
- B r o u n g a r t , D . and O t t , G . 1942. A cytological study of the effect of colchicine on *Drosophila melanogaster*. *Jour.Hered.*, 33, 163-165.
- B r o w n , W . O . and S e e d , L . 1945. Effect of colchicine on human tissue. *Amer.J.Clin.Path.*, 15, 183-195.
- B r u e s , A . M . 1942. The fate of colchicine in the body. *J.Clin.Invest.*, 21, 646-647.
- B r u e s , A . and J a c k s o n , E . 1937. Nuclear abnormalities resulting from inhibition of mitosis by colchicine. *Amer.J.Cancer*, 30, 504-511.
- B u c k l e y , J . K . 1965. Phase contrast observations on the endoplasmic reticulum of living cells in culture. *Protoplasma*, 59, 569-588.
- B u r e a u , V . et V i l t e r , V . 1939. Action de la colchicine étudiée sur les cellules épithéliales de l'Axolotl. *C.R.Soc.Biol.Paris*, 132, 553-558.
- C l e a r k i n , P . A . 1937. Effect of colchicine on normal and neoplastic tissues in mice. *J.Path. and Bact.*, 44, 469-476.
- C o h e n , A . , C o o k , J . and R o e , E . 1940. Colchicine and related compounds. *Jour.Chem.Soc.London*, 194, 194-197.
- C r e a s e y , W . A . and C h o u , T . C . 1968. The binding of colchicine by sarcoma 180 cells. *Biochem.Pharmacol.* 17, 477-480.
- D a l e s , S . 1963. Association between the spindle apparatus and reovirus. *Proc.Nat.Acad.Sci.*, 50, 268-275.

- D a u n w a l d e r , M . and W h a l e y , W . C . 1965. A new stage in cell plate formation and observation on pyromycine and colchicine treatments. *J.Cell Biol.*, 27, 24A.
- D e r m e n , H . 1938. A cytological analysis of polyploidy induced by colchicine and by extremes temperature. *Jour.Hered.*, 29, 210-229.
- D e r m e n , H . 1940. Colchicine, polyploidy and technique. *Bot.Rev.*, 6, 599-635.
- d e T h e , G . 1964. Cytoplasmic microtubules in different animal cells. *J.Cell Biol.*, 23, 265-275.
- D i n g l e , J . T . 1968. Vacuoles, vesicles and lysosomes. *Brit.Med.Bull.*, 24, 113-116.
- D i v a n , B . A . 1966. A study of the effects of colchicine on the process of morphogenesis and induction in chick embryos. *J.Embryol.Exp.Morph.*, 16, 245-257.
- D i x o n , W . E . 1905. A manuel of pharmacology. London.
- D i x o n , W . E . and M a l d e n , W . 1908. Colchicine with special reference to its mode of action and effect on bone-marrow. *J.Physiol.*, 37, 50-76.
- D o u t r e , L . and B i r a b e n , J . 1947. Pharmacodynamic activity of colchicine as a medicament for cancer. Action on cytoplasmic cyclosis. *Jour.Med.Bordeaux*, 124, 463-465.
- D u s t i n , A . 1934a. Contribution à l'étude des poisons caryoclasiques sur les tumeurs animales. *Bull.Acad. Roy.Méd.Belg.*, 14, 487-502.
- D u s t i n A . P . 1934b. Action de la colchicine sur le sarcome greffé type Crocker, de la souris. *Bull.Acad. Roy.Méd.Belg.*, 14, 472-486.

- D u s t i n , A . , H a v a s , L . et L i t s , F . 1937.
Action de la colchicine sur les divisions cellulaires
chez les végétaux. C.R.Assots.Anat., 32, 170-176.
- D u s t i n , P . 1947. Some new aspects of mitosis poisoning.
Nature, 159, 794-797.
- D u s t i n , P . 1949. Mitotic poisoning at metaphase and -SH
proteins. Exp.Cell Res., 1(Suppl.), 153-155.
- E i g s t i , O . 1938. A cytological study of colchicine effects
in the induction of polyploidy in plants. Proc.Nat.
Acad.Sci., 24, 56-63.
- E i g s t i , O . and D u s t i n , P . 1949. Colchicine biblio-
graphi. Lloydia, 12, 185-207.
- E i g s t i , O . and D u s t i n , P . 1955. Colchicine in
agriculture, medicine, biology and chemistry. Iowa
State College Press, Ames.
- E i g s t i , O . , D u s t i n , P . and G a y - W i n n , N .
1949. On the discovery of the action of colchicine on
mitosis in 1889. Science, 110, 692.
- E r i c s s o n , J . L . E . 1969. Studies on induced cellular
autophagy. 1. Electron microscopy of cells with in vivo
labelled lysosomes. Exp.Cell Res., 55, 95-106.
- F a w c e t t , D . W . 1964. Local spezialization of the plasma-
lemma in micropinacytosis vesicles of erythroblasts.
Anat.Rec., 148, 370.
- F e o d o r k o , M . E . and H i r s c h , J . G . 1968. Ultra-
structure of human leukocytes after simultaneous fixa-
tion with glutaraldehyde and osmium tetroxide and
"postfixation" in uranyl acetate. J.Cell Biol., 38,
615-627.

- F i r k e t , H . 1965. Cell division. In: "Cells and Tissue in Culture". Acad.Press, N.-Y. and Lond., 1, 201-238.
- F o r s h e i t , A . B . and H a y a s h i , T . 1967. The effect of colchicine on contractile proteins. Biochem.Biophys.Acta, 147, 546-551.
- F r e e d , J . J . 1965. Microtubules and saltatory movements of cytoplasmic elements in cultured cells. J.Cell Biol., 27, 29A.
- F r e e d , J . J . , B h i s e y , A . N . and L e b o - w i t z , M . M . 1968. The relation of microtubules and microfilaments to the motility of cultured cells. J.Cell Biol., 39, 47A.
- F r e e h m a n , G . J . 1960. Inhibition of neutrophil mobilization by colchicine.Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 104, 284-285.
- G a l l , J . G . 1966a. Microtubule fine structure. J.Cell Biol., 31, 32A.
- G a l l , J . G . 1966b. Microtubule fine structure. J.Cell Biol., 31, 639-643.
- G a u l d e n , M . and C a r l s o n , J . G . 1951. Cytological effects of colchicine on the grasshopper neuroblast in vitro with special references to the origin of the spindle. Exp.Cell Res., 2, 416-433.
- G o d m a n , G . G . 1955. The effect of colchicine on striated muscle in tissue culture. Exp.Cell Res., 8, 488-499.
- G r e e n , P . B . 1962.Mechanism for plant cellular morphogenesis. Science, 138, 1404-1405.
- G r i f f o n , J . E . 1968. Rapid formation of membranes after laser irradiation of Physarum polycephalum. J. Cell Biol., 39, 148A.

- H o l t , S . J . 1959. Factors governing the validity of staining methods for enzymes, and their bearing upon the Gomori acid phosphatase technique. *Exp.Cell Res.*, 7 (Suppl.), 1-27.
- H s u , T . C . 1965. Genetic cytology. In: "Cells and Tissue in Culture". Acad.Press. N.-Y. and Lond., 1, 397-461.
- I n o u é , S . 1952. The effect of colchicine on the microscopic structure of the mitotic spindle. *Exp.Cell Res.*, 2(Suppl.), 305-318.
- I k e d a , M . and W a t a n a b e , Y . 1965. Studies on proteinbound sulfhydryl groups in synchronous cell division of *Tetrahymena pyriformis*. *Exp.Cell Res.*, 39, 584-590.
- J o k e l a i n e n , P . T . 1968. The effect of colchicine on the kinetochores and mitotic apparatus in the rat. *J.Cell Biol.*, 39, 68A.
- K a v a n a u , J . L . 1963. Structure and functions of biological membranes. *Nature*, 198, 525-530.
- K l a u s , S . N . 1968. The effect of colchicine on mosaic patterns in cultured cells. *J.Cell Biol.*, 36, 399-401.
- K l e i n f e l d , R . G . and S i s k e n , J . E . 1966. Morphological and kinetical aspects of mitotic arrest by and recovery from colcemid. *J.Cell Biol.*, 31, 369-379.
- K o e n i g , H . 1962a. Histological distribution of brain gangliosides: lysosomes as glycoprotein granules. *Nature*, 195, 782-784.
- K o e n i g , H . 1962b. Presence of gangliosides in glycolipoprotein granules. *J.Histochem.Cytochem.*, 10, 686-687.

- K o s t o f f , D . 1938. Irregulation in the mitosis and polyploidy induced by colchicine and acenaphtene. C.R. Acad.Sci. USSR, 19, 197-199.
- K r i s h a n , A . 1968. Fine structure of the kinetochores in vinblastine sulfate treated cells. J.Ultrastruct.Res., 23, 134-143.
- K r i s h a n , A . , H u t c h i n s , P . , R a m a - R a o , G . K . and H s u , D . 1968. Action of vinblastine sulfate on mammalian cells in culture. J.Cell Biol., 39, 149A.
- L e d b e t t e r , M . C . and P o r t e r , K . R . 1963. A "microtubule" in plant fine cell structure. J.Cell Biol., 29, 239-252.
- L e e s o n , C . R . and L e e s o n , T . S . 1965. An unusual arrangement of ribosomes in mesenchymal cells. J.Cell Biol., 34, 324-328.
- L i n d n e r , D . 1962. Zur Diplasmazität der Fibroblasten des lockeren Bindegewebs. Z.Mikrosk.-Anat.Forsch., 69, 82-87.
- L i t s , F . 1933. Contribution à l'étude des réactions cellulaires provoquées par la colchicine. C.R.Soc.Biol. Paris, 115, 1421-1423.
- L u d f o r d , R . J . 1936. The action of toxic substances upon the division of normal and malignant cells in vitro and in vivo. Arc.Exp.Zellforsch. und Mikr.Anat., 18, 411-441.
- L u d f o r d , R . J . 1953. Chemically induced derangement of cell division. Jour.Roy.Microscop.Soc., 73, 1-23.
- M a l a w i s t a , S . E . 1968. Colchicine: a common mechanism for its anti-inflammatory and anti-mitotic effects. Arthritis and Rheum., 11, 191-197.

- M a l a w i s t a , S . E . and B e n s c h , K . G . 1967.
Human polymorphonuclear leukocytes: demonstration of
microtubules and effect of colchicine. Science, 456,
521-522.
- M a u n s b a c h , A . B . 1966. Absorption of ferritin by rat
kidney proximal tubule cells. Electron microscopic
observations of the initial uptake phase in cells of
microperfused single proximal tubules. J.Ultrastruct.
Res., 16, 1-12.
- M a z i a , D . 1954. SH and growth. In:"Proc. Sympos. on glu-
tathione", N-Y., 209-228.
- M a z i a , D . and D a n , K . 1952. The isolation and bio-
chemical characterization of mitotic apparatus of di-
viding cells. Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A., 38,826-838.
- M e r c h a n t , D . J . 1960. Handbook of cell and organ in
culture. Burgess, Mimeapolis.
- M o l l e n h a u e r , H . H . 1967. Plastic embedding mixtu-
res for use in electron microscopy. Stain Techn., 39,
111-114.
- N a t h a n i e l , E . J . H . , F r i e d m a n , N . B . and
R y c h u n , K . 1968. Electron microscopic observations on
cells of Harding-Passey melanoma follwing colchicine
administration. Cancer Res., 28, 1031-1040.
- N e b e l , B . R . 1937. Cytological observations on colchicine
Biol.Bull.Wood's Hole, 73, 351-352.
- N e b e l , B . and R u t t l e , M . 1938. The cytological
and genetical significance of colchicine. Jour. Hered.
29,3-9.
- N o r t h c o t e , M . A . 1968. Structure and function of
plant-cell membranes. Brit.Med.Bull., 24, 107-112.

- Novikoff, A. B. 1963. Lysosomes in the physiology and pathology of cells. In: "Lysosomes". Ciba Found. Symp., London, 36-74.
- Olpin, J. L. 1965. Isolation and characterization of a microtubular component from the ruminant *Oligotrich* protozoa. *J. Cell Biol.*, 27, 76A.
- Padawer, J. 1968. Paramitotic effects of colchicine: further studies of the mast cell assay. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 127, 194-199.
- Paul, J. 1960. Cell and tissue culture. Livingstone LTD, Edinburgh and London.
- Peterson, E. and Murray, M. 1966. Serial observations in tissue culture on neurotoxic effects of colchicine. *Anat. Rec.*, 154, 401-418.
- Porichard, J. et Bouchard - Madrolle, C. 1964. Action comparée des goudrons de tabac et de diverses substances antimitotiques sur le développement des œufs de Tuniciers. 2. *Ciona intestinalis*. *Arch. Zool. Exptl. et Gen. Notes et Rev.*, 104, 23-27.
- Porter, K. R. and Brunl, C. 1965. The fine structure of the parenchymal cell of the normal liver. *Amer. J. Path.*, 46, 691-755.
- Puck, T. T., Marcus, P. J. and Cieciura, S. J. 1956. Clonal growth of mammalian cells in vitro. Growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a "freeder" layer. *J. Exp. Med.*, 103, 273.
- Rerabek, J. und Rerabek, 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, 208-212.
- Robbins, E. and Gonatas, N. K. 1964. Histochemical and ultrastructural studies on HeLa cell cultures exposed to spindle inhibitors with reference to the interphase cell. *J.Histochem.Cytochem.*, 12, 704-711.
- Robbins, E. and Gonatas, N. K. 1964a. Ultrastructure of the mammalian cell during the mitotic cycle. *J.Cell Biol.*, 21, 429-463.
- Rodkiewicz, B. and Mikulska, E. 1967. Ultrastructure of ovule cells and embryo sac of lily treated with colchicine. *Bull.Acad.Polon.Sci.*, 15, 561-563.
- Roth, T. F. and Porter, K. R. 1963. Membrane differentiation for protein uptake. *Fed.Proc.*, 22, 178.
- Roth, T. F. and Porter, K. R. 1964. Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti* L. *J.Cell Biol.*, 20, 313-332.
- Roth, L. E., Jenkins, R. A., Thomas, R. J., Allenspach, A. L. and Wilson, H. J. 1965. Fine structure of the mitotic apparatus. *J.Cell Biol.*, 27, 125A.
- Rouiller, C. and Bernhard, W. 1956. "Microbodies" and the problem of mitochondrial regeneration in liver cells. *J.Biophys.Biochem.Cytol.*, 2(Suppl.), 355-360.
- Sakai, H. and Dan, K. 1959. Studies on sulfhydryl

- groups during cell division of sea urchin egg. *Exp. Cell Res.*, 16, 24-42.
- S a n d b o r n , E . B . , S z e b e r e n y i , A . and M e s s i e r , P . - E . 1966. Filaments, microtubules and membranes. *Electron Microscopy*, 2, 409-410.
- S a w i c k i , W . and K i e l e r , J . 1968. The use of N-deacetyl-N-methylcolchicine (colcemid) for determination of the replication time non-malignant cells cultivated in vitro. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 72, 1-12.
- S e e d , L . , S l a u g h t e r , D . P . and L i m a r z i , L . R . 1940. Effect of colchicine on human carcinoma. *Surgery*, 2, 679-709.
- S h a r p , G . 1909. Colchicum studied historically. *Pharm. Jour. and Pharmacist, Lond.*, 83, 5-6.
- S h e l a n s k i , M . L . and T a y l o r , E . W . 1967. Isolation of a protein subunit from microtubule. *J. Cell Biol.*, 34, 549-554.
- S i n g e r , M . , F l i n k e r , D . and S i d m a n , R . L . 1956. Nerve destruction by colchicine resulting in suppression of limb regeneration in adult *Triturus*. *J. Exp. Zool.*, 131, 267-299.
- S l a u t t e r b a c k , D . B . 1963. Cytoplasmic microtubules. 1. Hydra. *J. Cell Biol.*, 18, 367-388.
- S o r o k i n , S . 1962. Centrioles and the formation of rudimentary cilia by fibroblasts and smooth muscle cells. *J. Cell Biol.*, 15, 367-377.
- S t e p h e n s , R . E . 1968. Reassociation of microtubule protein. *J. Mol. Biol.*, 33, 517-519.

- Stubblefield, E. 1965. Centriole differentiation in cells in culture: formation of basal bodies and cilia in Chinese hamster fibroblast following colcemid treatment. *J. Cell Biol.*, 27, 101A.
- Stubblefield, E. and Brinkley, B. 1967. Architecture and function of the mammalian centriole. In: "Formation and fate cell organelles", N.-Y. and Lond., 175-218.
- Stubblefield, E., Klevecz, R. and Deavan, L. 1967. Synchronized mammalian cell cultures. 1. Cell replication cycle and macromolecular synthesis following brief colcemid arrest of mitosis. *J. Cell Physiol.*, 69, 345-353.
- Timney, L. G. 1965. Microtubules in the Heliozoan *Actinosphaerium nucleofilum* and their relation to axopod formation and motion. *J. Cell Biol.*, 27, 107A.
- Timney, L. G. 1968. Studies on the microtubules in Heliozoa. 4. The effect of colchicine on the formation on maintenance of the axopodia and the redevelopment of pattern in *Actinosphaerium nucleofilum* (Barrett). *J. Cell Biol.*, 3, 549-562.
- Timney, L. G. and Gibbins, J. R. 1968. Differential effects of antimitotic agents on the stability and behavior of cytoplasmic and ciliary microtubules. *Protoplasma*, 65, 167-179.
- Trowell, O. A. 1960. The cytotoxic action of mitotic poisons on lymphocytes in vitro. *Biochem. Pharmacol.*, 5, 53-63.
- Trump, B. F. 1961. An electron microscope study of the uptake, transport and storage of colloidal materials by the cells of the vertebrate nephron. *J. Ultrastruct*

Res., 5, 291-310.

Tööstusettevõtete elektriseadmete tehnilise eksploatatsiooni
ja ohutu teenendamise eeskirjad. 1963. Tallinn.

TRÜ Meditsiini Teadusliku Uurimise Kesklaboratooriumi biokeemia-
sektori ohutustehnika eeskirjad. 1967. Tartu.

W a n k a , F . 1968. Ultrastructural changes during normal
and colchicine-inhibited cell division of *Chlorella*.
Protoplasma, 66, 105-130.

W e n d t , E . 1961. Die Wirkung von Röntgenstrahlen auf das
Zentroplasma und die Cytosomen von Gewebenculturzel-
len. *Z.Zellforsch.*, 53, 172-184.

W h i t e , J . G . 1968. Effects of colchicine and Vinca alka-
loids on human platelets. 1. Influence on platelet
microtubules and contractile function. *Amer.J.Path.*,
53, 281-291.

W i l s o n , G . O . 1962. Studies on the effects of colchi-
cine on cytoplasm and cytoplasmic inclusions in vitro.
Anat.Rec., 142, 333.

W i r k u s , E . R . and M e e n a k s h i , G . 1968. Ultra-
structural study of the cytological effects of colc-
hicine on the meristematic cells of the root tip of
Allium cepa. *J.Cell Biol.*, 39, 182A.

W i s n i e w s k i , H . , S h e l a n s k i , M . L . and
T e r r y , R . , D . 1968. Effects of mitotic spindle inhibi-
tors on neurotubules and neurofilaments in anterior
horn cells. *J.Cell Biol.*, 38, 224-229.

А л о в И.А. и А с п и з М.Е. 1966. Значение сульфгидриль-
ных групп белка в процессе митотического деления
клетки. ДАН СССР, 166, 965-967.

- А л о в, И.А., Брауде А.И. и Аспиз М.Е. 1969. Основы функциональной морфологии клетки. "Медицина", Москва.
- А н д ж а п а р и д з е О.Г., Гаврилов В.И., Семенов Б.Ф. и Степанов А.Г. 1960. Культура тканей в вирусологических исследованиях. Медгиз, М.
- Б ы с т р о в В.Д., Пигаревский В.Е. и Жилова Г.П. 1966. Изучение взаимодействия вируса и клетки методом низкочастотной микрокиносъемки. Уч. записки ТГУ. Труды по тканевой биологии, I, 141-146.
- В а с и л ь е в Ю.М., Гельштейн В.И., Гельфант И.М., Иванова Ю.О., Домина Л.В., Комм, С.Г., Самойлов В.И. и Ровенский Ю.А., 1969. Межклеточное взаимодействие в культурах. Доклад на симпозиуме по культуре клеток, Ленинград.
- В е р о м а н С.А., 1967. О морфологии и тканевой принадлежности клеток первичных трипсинизированных культур почки. Арх. АЭГ, 53: 19-26.
- В р е д н ы е в е щ е с т в а в п р о м ы ш л е н н о с т и, 1963. Госхимиздат, Л.
- Г о л ь д и н Л.С., 1963. Основы гистологической техники электронной микроскопии. Медгиз, М.
- З а в а р з и н А.А. 1953. О номенклатуре клеточных форм фибробластического ряда. Изб. труды, 2, М.-Л., 219-232.
- З а л к и н д С.Я., 1966. Митотический аппарат и клеточные органоиды при митозе. В кн.: "Руководство по цитологии", "Наука", 2 : 211-217.
- З у е в а А.П., Палкина И.А. и Аспиз М.Е. 1969. Изменение содержания сульфгидрильных групп белка в процессе дробления яиц вьюна. Цитология, II : 1581-1583.

- К я р н е р Ю.К. 1963. О светомикроскопической организации цитоплазмы фибробластов, растущих в однослойных тканевых культурах. Уч. записки ТГУ, Труды по медицине, 8 : 320-325.
- К я р н е р Ю.К. 1967а. Идентификация и характеристика лизосом в клетках тканевых культур. Дисс. уч. степ. канд. биол. наук, Тарту.
- К я р н е р Ю.К. 1967в. Цитологические особенности клеток первичных однослойных тканевых культур. Уч.записки ТГУ, Труды по тканевой биол., I : 4-15.
- К я р н е р Ю.К. 1969. Образование аутолизосом в фибробластах первичных тканевых культур. Тезисы докладов 7 ВКЭМ, Киев, стр.10.
- К я р н е р Ю.К. 1970. Связь лизосом с эндоплазматической сетью и с аппаратом Гольджи в культивированных куриных фибробластах. Цитология (в печати).
- О с н о в н ы е п р а в и л а б е з о п а с н о с т и в х и м и ч е с к о й л а б о р а т о р и и. 1965. Техника безопасности и производственная санитария, Сборник постановлений, правил и инструкций. Химия, М., 703.
- П о р т е р, К. 1963. Основное вещество цитоплазмы по данным электронной микроскопии. В сб.: "Функциональная морфология клетки", Изд. иностр. лит., М., стр. 86-112.
- П и л ь д в е р е К.Ю., 1963. О росте и превращении, так называемой, "ложно-мышечной" ткани в однослойной трипсинозированной культуре. Арх. АЭГ, 45 : 20-28.
- Р о у с А., В у д У. и Д у н к а н Д. 1957. Современное состояние лабораторных вирусологических исследований в диагностике полиомиелита с особым упоминанием метода тканевых культур. В сб.: Полиомиелит. Медгиз, М., 201-224.

Санитарные правила при работе с
эпоксидными смолами. Справочник по
технике безопасности и производственной санитарии.
Судостроение, Л., 592-614.

Сидоров Б.И., Соколов Н.Н., Вакуленко
И.А., Огсродникова А.П. 1965. Блокада
веретена и гипополиплоидный рост при колхициновом ми-
тозе. В сб.: Полиплоидия и селекция. Изд. Наука.
стр. 109-122.

Тонин И.Б. 1966. Микротрубочки - новый компонент клетки.
Арх. АЭТ, 51 : 3-21.