

© Коллектив авторов, 2006  
УДК 576.31

*Г.В. Безнусенко, И.С. Сесорова\* и В.В. Банин*

## ЭЛЕКТРОННО-ТОМОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СТРОЕНИЯ КОМПЛЕКСА ГОЛЬДЖИ В ТКАНЕВОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК

Отдел морфологии (зав. — чл.-кор. РАН проф. В.В. Банин) Российского государственного медицинского университета, Москва; кафедра биологии и экологии (зав. — проф. В.Г. Шевчук) Шуйского государственного педагогического университета

Исследование комплекса Гольджи (КГ) в культивируемых (NRK) клетках с помощью усовершенствованного метода подготовки образцов для электронной томографии (ЭТ) позволило выявить детали строения КГ. Использование количественной ЭТ не выявило большого количества пузырьков вокруг КГ, но с большим постоянством визуализировало соединения между цистернами. Показано, что везикулярно-тубулярные кластеры, через которые осуществляется выход из эндоплазматической сети, состоят из двух доменов: варикозных тубул с редкими СОPII пузырьками и сплетений гладких тубул. Полученные данные не свидетельствуют в пользу моделей транспорта, в которых пузырьки рассматриваются в качестве основных или необходимых мембранных переносчиков. Напротив, важную роль в обеспечении переноса на участках секреторного пути должны играть непрерывные тубулярные коммуникации.

**Ключевые слова:** комплекс Гольджи, внутриклеточный транспорт, модели транспорта, электронная томография.

Клетки синтезируют различные макромолекулы как для секреции во внеклеточную среду, так и для внутриклеточных процессов. Белки, синтезированные на рибосомах гранулярной эндоплазматической сети (ЭС) и предназначенные для секреции, прежде чем достигнуть плазмолеммы проходят сложный путь через различные внутриклеточные структуры. Этот антероградный путь, начинающийся на рибосомах ЭС, получил название секреторного [1, 2]. Если ЭС является местом синтеза и обеспечивает поступление молекул (белков и липидов) в последующие компартменты мембранной системы клетки, то комплекс Гольджи (КГ) обеспечивает посттрансляционную модификацию (преимущественно — гликозилирование), сортировку и последующую «рассылку» по различным направлениям. Регуляция и механизмы транспорта на этом участке сложны и являются предметом активного изучения и дискуссий среди исследователей — специалистов в области клеточной и молекулярной биологии.

В настоящее время рассматриваются несколько моделей транспорта молекул через стопки цистерн КГ [8]. «Везикулярная» гипотеза предполагает, что секретируемые белки транспортируются между стабильно существующими цистернами КГ с помощью небольших пузырьков (везикул) в обоих направлениях — в антероградном и ретроградном. Ретроградный транспорт (рециклирование) обеспечивает, в частности, возврат резидентных ферментов в соответствующую цистерну КГ. Вторая значимая модель — «прогрессии и созревания» цистерн, во главу угла ставит перемещение по стопке самих цистерн с их содержимым (карго) и участие пузырьков только в возврате ферментов в вышележащие цистерны. Модели, обсуждаемые в последние годы, принимают во внимание существование непрерывных соединений между структурами КГ, а также возможность «прогрессии и созревания» не всей цистерны, а некоторого мембранного домена, содержащего транспортируемый белок.

Первые две, наиболее популярные, модели имеют существенные недостатки. «Везикулярная» модель, предложенная M.G.Farquhar и G.E.Palade [3], кажется, на первый взгляд, простой и хорошо доказанной. Тем не менее, с точки зрения везикулярной гипотезы, сложно объяснить отсутствие в пузырьках многих известных транспортируемых молекул (альбумина, проинсулина, вирусных белков и др.), а также понять, как осуществляется транспорт больших молекулярных комплексов, например, проколлагена, размеры которого в 5 раз превышают средний размер пузырька (около 60 нм). Не менее сложно представить себе, как пузырек может найти нужный ему компартмент для «стыковки» и слияния. Основные исследования, послужившие доказательством «везикулярной» гипотезы, были выполнены *in vitro* и биохимическими методами. Однако разработанные в последнее время морфофункциональные подходы позволяют усомниться в доказанности везикулярного транспорта, как основного пути.

Гипотеза «прогрессии и созревания» цистерн также не может быть принята безоговорочно. Недавние исследования не выявили в пузырьках повышенного содержания ферментов гликозилирования, что следовало бы ожидать, поскольку ферменты КГ должны рециклировать именно в составе окаймленных (СОPI) пузырьков [8]. Данная модель не может также объяснить возврат ферментов *trans*-цистерн (например, сиалилтрансферазы), поскольку на этой цистерне вообще не образуются СОPI пузырьки [5]. Таким образом, несмотря на множество работ, посвященных моделям транспорта белков и липидов через КГ, до сих пор так и не сложилось единого мнения о механизме транспорта веществ и мембран через эту органеллу.

КГ состоит из трех основных типов мембранных структур: плоских цистерн, имеющих в своем составе неперфорированную и перфорированную части,

\*E-mail: irina-s3@yandex.ru

трубочек (тубул) различного диаметра и пузырьков. Нужно отметить также, что площадь поверхности тубул КГ и ассоциированных с ними перфорированных зон эквивалентна площади поверхности цистерн [5]. Существование такого большого, динамически изменяющегося, домена КГ предполагает, что он должен играть важную роль в процессе транспорта. В последнее время были опубликованы ряд работ, выполненных с использованием электронной томографии. Эти работы доказывают факт образования тубулярных соединений между цистернами КГ в активно транспортирующих клетках [5, 6, 11]. Однако описанные выше соединения не были найдены в условиях блокады транспорта [11].

Различия в исходной гипотезе и чрезвычайная динамичность КГ могут объяснить множество противоречий, которые встречаются в литературе при описании структуры КГ. Так, например, *cis*-цистерна описывается как неперфорированная [5] или перфорированная структура [9, 10]. В реконструкциях M.S.Ladinsky и соавт. [5] около КГ отсутствуют везикулярно-тубулярные кластеры, которые, как полагают, служат местом выхода секретируемых белков из ЭС и являются некоторым промежуточным компартментом на пути от ЭС в КГ. Еще более противоречивыми выглядят данные о множестве свободных пузырьков, ассоциированных с КГ [5, 7], в то время как другие авторы указывают на крайне малое их количество [9, 11]. Неясным остается описание последней цистерны и ее взаимоотношение с вышележащими цистернами и *trans*-сетью КГ [5]. Устранение этих противоречий и детальный анализ структуры КГ являются необходимой основой для построения любой модели функционирования этой сложной органеллы. Цель настоящей работы, используя один из современных и высокоразрешающих методов — электронно-микроскопической томографии, устранить некоторые из существующих неясностей.

**Материал и методы.** В работе использованы химические реактивы фирмы Sigma, Chemical Co (St. Louis, MO, США). Для стандартизации эксперимента исследование проводили на хорошо известной клеточной линии NRK (normal rat kidney cells). Через 24–30 ч после того, как клетки были посажены на стекло, обработанное 5% раствором фибронектина, они были фиксированы 2,5% раствором глутарового альдегида на буфере в течение 1 ч при комнатной температуре. Наш опыт показывает, что одним из лучших буферов для электронной томографии является HEPES 0,15–0,2M. В этом случае не обнаруживаются различия в ультраструктуре КГ, которые обычно наблюдаются при сравнении химической и физической фиксации. После фиксации использовали осмирование с применением редуцированной четырехоксида осмия (смесь равных объемов 2% OsO<sub>4</sub> и 3% ферроцианида калия на 0,1M какодилатном буфере, pH 7,2, в течение 1 ч). Далее для улучшения контрастности мембран была использована обработка клеток 0,5% раствором тиакарбондигидрида в течение 5 мин и после интенсивной отмывки буфером, вторичная инкубация в 1% редуцированном OsO<sub>4</sub>. Для выявления белковых покрытий на мембранных структурах использовали обработку 0,05% раствором уранилацетата в течение 12 ч. Далее образцы подвергали стандартной процедуре обезвоживания, заключения в эпон и полимеризации 48 ч при 60°C. После полимеризации заливочной смолы изготавливали срезы толщиной 200 нм, которые укладывали на бленды, покры-

тые формварово-угольной подложкой. Для сопоставления полученных изображений срезы обрабатывали раствором коллоидного золота, с диаметром частиц 10 нм, на дистиллированной воде (1:25). Плотность мечения в среднем не должна превышать 1–2 гранулы на 100 нм<sup>2</sup>. Гранулы золота служили маркерами одного и того же участка среза для сопоставления и ориентации изображений при последующей компьютерной обработке. После окраски и высушивания сетку помещали в держатель гониометра микроскопа — LEO-912 (Zeiss, Германия) — устройства, которое позволяет изменять наклон образца. Центрирование оси вращения осуществляли после предварительного облучения среза 3–5 мин дефокусированным пучком электронов без диафрагмы, чтобы обеспечить равномерное выжигание недополимеризованной смолы. В этом случае срез в процессе длительного облучения при заборе изображений остается одинаковой толщины. После «отжига» среза диафрагму устанавливали на обычное место.

На основе критериев хорошей морфологической сохранности структур и метода случайных чисел, отбирали вертикальные срезы КГ с использованием системы поиска программы «AnalySis». После выбора структуры начинали забор изображений от +70° до –70° угла наклона гониометра через каждый градус. Благодаря этому достигается высокое разрешение на томограмме, так как уровень разрешения зависит от толщины среза (чем тоньше срез, тем лучше разрешение), угла между проекциями (чем меньше угол, тем больше разрешение) и увеличения (чем больше увеличение, тем лучше разрешение) [4]. Всю серию забранных изображений (141 изображение) пересылали в другой компьютер, содержащий программу для томографии «IMOD» [5]. Компьютер, используя гранулы золота в качестве реперных точек, выстраивал изображения точно по одной оси, после чего высчитывал оптическую плотность для каждой единицы объема структуры, т.е. для каждого «вокселя». Результат вычисления компьютером мог быть представлен в виде серийных (цифровых) срезов толщиной 2–3 нм, следовательно, формальное разрешение составило 4–6 нм. Однако возможность анализа серийных срезов вдоль всех трех осей (XYZ) позволила повысить уровень разрешения до 2–3 нм. Далее, получив серийные срезы, мы использовали их для построения трехмерной модели всей структуры с помощью программы «IMOD».

**Результаты исследования.** Были проанализированы 10 томограмм центрально расположенного КГ в интактных клетках линии NRK. Вращение моделей (рис. 1, 2) показывает, что большинство (7 из 10) стопок КГ имели в своем составе лишь небольшое количество свободных, ни с чем не связанных пузырьков, диаметром 50–60 нм (в среднем 2–4 пузырька на 200-нанометровом срезе стопки). Большинство (около 70%) круглых профилей имели продолжение в тубулярные структуры или представляли собой мембранные почки (buds), т.е. имели в своем составе шейку, соединяющую круглый профиль с цистерной. Лишь в одной из десяти стопок КГ было найдено относительно много (6) свободных пузырьков. В двух стопках свободных пузырьков вообще не было обнаружено.

Тубулярные структуры, соединяющие цистерны одного или разных уровней, наблюдались в девяти проанализированных томограммах КГ. Однако количество соединений в них варьировало в широких пределах (от 1 до 6). Важно заметить, что КГ с относительно большим количеством соединений были лишены пузырьков или их количество не превышало

двух. Наоборот, в одном КГ с большим количеством пузырьков нами не было обнаружено соединений между цистернами. Вероятно, их образование и количество определялись уровнем интенсивности транспорта в анализируемом КГ. Наибольшее количество тубулярных соединений между цистернами (в среднем, от 2 до 4 на 200-нанометровом срезе стопки) наблюдалось в средней (медиальной) части КГ (см. рис. 1, а, б), на расстоянии 300–400 нм от края цистерны. Соединения имели диаметр 10–20 нм и длину около 10–15 нм и располагались в непосредственной близости от внутренних перфораций цистерн (рис. 3, в–е).

Первая цистерна в большинстве стопок была перфорированной (см. рис. 3, б). Между первой перфорированной *cis*-цистерной и медиальными цистернами также были выявлены тонкие тубулярные соединения (см. рис. 3, в) или тесное прилегание соседних мембран (плотные контакты), однако они присутствовали лишь в четырех из десяти проанализированных томограмм.

Везикулярно-тубулярные кластеры, непосредственно прилежащие к *cis*-цистерне, были найдены в 7 томограммах (см. рис. 1, 2). Нам удалось выявить тонкие (диаметром около 10 нм) непосредственные соединения кластеров с *cis*-цистерной, а также зоны плотных мембранных контактов между ними. В составе везикулярно-тубулярных кластеров отчетливо выделялись 2 зоны: гладкая и покрытая каймой СОРІІ. Гладкие тубулы формировали подобие сплетения, а СОРІІ покрытие наблюдалось на мембранных почках мини-цистерн (варикозных тубулах) и на изолированных (обычно 2–3) пузырьках, соединенных с другими структурными элементами кластера тонким мостиком. СОРІ окаймленных профилей в составе кластеров обнаружено не было, а кайма такого типа наблюдалась на уровне *cis*-цистерны, на краях и в зонах перфораций прилежащих к ней медиальных цистерн. В зоне *cis*-цистерны наблюдались участки совместной локализации СОРІІ и СОРІ каймы (см. рис. 2, а), на одной и той же мембранной структуре.

Выраженность *trans*-сети КГ широко варьировала. Развитые *trans*-сети наблюдались только в двух стопках КГ (см. рис. 1) и представляли собой или причудливо свернутую в виде клубочка перфорированную цистерну, или сложноорганизованный домен, соединенный обычно с предпоследней цистерной. В остальных 8 стопках место последней (*trans*) цистерны часто занимала цистерна с большими перфорациями и мембранными почками, покрытыми клатриновой каймой (см. рис. 3, б–5), или цистерна ЭС.

Обсуждение полученных данных. Анализ трехмерной организации КГ в интактных культивируемых NRK-клетках, проведенный с использованием электронной томографии и последующей трехмерной реконструкцией, показал наличие непрерывных соединений между цистернами различных уровней в большинстве стопок КГ и крайне малое число свободных пузырьков. Последнее обстоятельство практически исключает возможность функционирования пузырьков в качестве мембранных переносчиков через КГ. Мы полагаем это серьезным

аргументом, противоречащим постулатам и «везикулярной» гипотезы, и модели «прогрессии и созревания» цистерн, предусматривающей ретроградный транспорт пузырьков, переносящих ферменты гликозилирования. Единичные пузырьки, даже при самой большой скорости их образования и слияния, не могут обеспечить функцию транспорта в полном объеме. Кроме того, как было показано ранее [8, 11], при интенсивном транспорте количество пузырьков уменьшается, а число тубулярных соединений, напротив, увеличивается. Значительное количество тубулярных связей даже в интактных клетках, с относительно спокойным статусом, позволяет предполагать их участие в anterogradном и/или ретроградном транспорте и, возможно, в реорганизации структуры органеллы.

В известной нам литературе удалось найти лишь противоречивые сведения о некоей тубулярной сети с окаймленными почками [5, 7]. Большинство авторов описывают промежуточный компартмент в виде скопления СОРІІ- и СОРІ-пузырьков. Используемая нами оригинальная схема препарирования образцов дает возможность получить одновременно высокую контрастность липидного бислоя мембран и выявить специфическую белковую кайму (покрытие). Сочетание этих условий необходимо для детального анализа трехмерной организации самих везикулярно-тубулярных кластеров. Наличие буквально единичных (1–2) СОРІІ-пузырьков делает маловероятной гипотезу «везикулярного» транспорта на этом участке. Однако близость кластеров к КГ и их тубулярные коммуникации с перфорированной первой цистерной стопки подтверждают заключение о существовании непрерывности, связанности (постоянной или динамичной) мембранных компартментов на этом участке секреторного пути.

Таким образом, представленный материал позволяет сделать некоторые важные заключения. Во-первых, описанный выше усовершенствованный метод подготовки образцов для электронной томографии выявляет более тонкие детали соединений между компартментами секреторного пути. Во-вторых, результаты томографии не свидетельствуют о наличии большого количества пузырьков вокруг КГ, но с большим постоянством выявляют соединения между цистернами. В-третьих, в данном сообщении впервые показано, что везикулярно-тубулярные кластеры, через которые осуществляется выход продуктов из ЭС, состоят из двух различающихся доменов: варикозных тубул с редкими пузырьками, часто СОРІІ, и гладкого тубулярного сплетения.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Банин В.В. Куда ведет «путь Гольджи»? (к 100-летию открытия комплекса Гольджи). Морфология, 1999, т. 115, вып. 3, с. 90–97.
2. Миронов А.А., Комиссарчик Я.Ю., Миронов А.А. (мл.) и др. Современные представления о структуре и функции пластинчатого комплекса. К столетию открытия Камилло Гольджи. Цитология, 1998, № 40, с. 483–496.
3. Farquhar M.G. and Palade G.E. The Golgi apparatus (complex) — (1954–1981) — from artifact to center stage. J. Cell Biol., 1981, v. 91, p. 77–103.

4. Koster A.J., Grimm R., Typke D. et al. Perspectives of molecular and cellular electron tomography. *J. Struct. Biol.*, 1997, v. 120, p. 276–308.
5. Ladinsky M.S., Mastronarde D.N., McIntosh J.R. et al. Golgi structure in three dimensions: functional insights from the normal rat kidney cell. *J. Cell Biol.*, 1999, v. 44, p. 1135–1149.
6. Ladinsky M.S., Wu C.C., McIntosh S. et al. Structure of the Golgi and distribution of reporter molecules at 20 degrees C reveals the complexity of the exit compartments. *Mol. Biol. Cell*, 2002, v. 3, p. 2810–2825.
7. Marsh B.J., Mastronarde D.N., Buttle K.F. et al. Organellar relationships in the Golgi region of the pancreatic beta cell line, HIT-T15, visualized by high resolution electron tomography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, v. 98, p. 2399–2406.
8. Mironov A.A., Beznousenko G.V., Polishchuk R.S. and Trucco A. Intra-Golgi transport. A way to a new paradigm? *BBA-Mol. Cell Res.*, 2005, v. 1744, p. 340–350.
9. Rambourg A. and Clermont Y. Three-dimensional electron microscopy: structure of the Golgi apparatus. *Eur. J. Cell Biol.*, 1990, v. 51, p. 189–200.
10. Rambourg A. and Clermont Y. Three-dimensional structure of the Golgi apparatus in mammalian cells. In: *The Golgi apparatus*. Basel, Switzerland, Birkhauser Verlag, 1997, p. 37–61.
11. Trucco A., Polishchuk R.S., Martella O. et al. Secretory traffic triggers the formation of tubular continuities across Golgi sub-compartments. *Nat. Cell Biol.*, 2004, v. 6, p. 1071–1081.

Поступила в редакцию 22.12.2005 г.

## ELECTRON-TOMOGRAPHIC ANALYSIS OF GOLGI COMPLEX STRUCTURE IN CELLS GROWING IN CULTURE

*G.V. Beznousenko, I.S. Sesorova and V.V. Banin*

Study of the Golgi complex (GC) in cultured NRK cells using improved method of sample preparation for electron tomography (ET) enabled to detect more fine details of GC structure. With the application of quantitative ET, no numerous vesicles were detected around GC, while most of stacks constantly contained intercisternal connections. It was demonstrated that vesicular-tubular clusters, which serve as the exit sites from endoplasmic reticulum, were composed of two domains: varicose tubules with sparse COPII-coated vesicles and a network of smooth tubules. The data obtained argue against the models of transport, which consider the vesicles as the main or necessary membranous carriers. On the contrary, continuous tubular connections seem to play an important role in traffic joining secretory pathway regions.

**Key words:** *Golgi complex, intracellular traffic, models of traffic, electron tomography.*

Department of Morphology, Russian State Medical University, Moscow, Department of Biology and Ecology, Shuya State Pedagogical University.

© О.Р. Шангина, Р.Т. Нигматуллин, 2006  
УДК 611.018:612.014.482

*О.Р. Шангина\* и Р.Т. Нигматуллин\*\**

## ВЛИЯНИЕ РАДИАЦИОННОЙ СТЕРИЛИЗАЦИИ НА СТРУКТУРУ И СВОЙСТВА БИОМАТЕРИАЛОВ

Лаборатория биоматериалов (зав. — канд. биол. наук О.Р. Шангина) Всероссийского центра глазной и пластической хирургии, г. Уфа

Цель исследования — изучение структурных изменений соединительнотканых биоматериалов при различных сочетаниях их радиационной стерилизации, физико-химической обработки и консервации. С помощью комплекса гистологических методов (поляризационная микроскопия неокрашенных срезов, окраска по ван Гизону, растровая электронная микроскопия) был проведен анализ структурных изменений сухожилий и дермы, прошедших различную физико-химическую обработку и подвергнутых радиационной стерилизации различными видами (гамма-излучение и поток быстрых электронов) и дозами 1,5, 2,5 и 4 Мрад облучения. Выявлена зависимость структурных изменений в биоматериалах от фиброархитектоники самой ткани, физико-химической обработки, а также вида и дозы радиационного излучения. Сухожилия подвергают отчетливо выраженным изменениям при всех исследованных режимах и дозах радиации. Дерма обладает наиболее высокой устойчивостью к радиационному воздействию.

**Ключевые слова:** *трупные ткани, фиброархитектоника, радиационная стерилизация.*

Донорские ткани служат исходным материалом в производстве биоматериалов, используемых для аллогенных пересадок. Из них наиболее широко используются кости, хрящи, дерма, сухожилия, фасции и т. д. Соответственно должны предъявляться специальные требования к биологической безопасности донорских тканей, так как они известны своей способностью пе-

редавать различные микроорганизмы, вирусы [6]. Для достижения безопасности трупных тканей используют метод радиационной стерилизации, который считается самым эффективным [7]. Его высокая бактерицидная активность и большая проникающая способность делают этот метод наиболее перспективным по сравнению с другими. В то же время, радиационная стерили-

\*E-mail: alloOlga@mail.ru

\*\*E-mail: nigmatullin@mail.ru