

Б. А. ФИХТЕ, Э. И. ЗАЙЧКИН

ВЫЯВЛЕНИЕ ЭЛЕМЕНТАРНЫХ ЧАСТИЦ НА ВНУТРЕННЕЙ МЕМБРАНЕ МИТОХОНДРИЙ МЕТОДОМ КРИОСКАЛЫВАНИЯ

(Представлено академиком Г. М. Франком 17 XI 1971)

Современные представления о дискретном расположении компонентов электроннотранспортной системы митохондрий основаны на структурно-морфологических^(5, 11, 14) и биохимических^(1, 3, 10, 13) предположениях. Важным вкладом в эти представления было открытие Фернандес-Мораном⁽⁴⁾ элементарных повторяющихся единиц, анатомически связанных с внутренней митохондриальной мембраной. В дальнейшем элементарные частицы были обнаружены и другими исследователями^(12, 15, 16).

Однако, несмотря на большое число специальных электронномикроскопических исследований, истинная ультраструктурная организация и функциональная морфология этих частиц продолжает оставаться неясной, а сам факт их существования подвергается сомнению. Обусловлено это отчасти тем, что метод негативного контрастирования, используемый для электронномикроскопического выявления этих частиц, оказался не столь «безартефактным», как это представлялось раньше. Как установлено в настоящее время, вещества, применяемые для негативного контрастирования (фосфорновольфрамовая кислота, уранилацетат), не являются химически инертными, а способны активно взаимодействовать с мембранами, вызывая структурные и энзиматические повреждения⁽⁹⁾. Еще более активно взаимодействуют с мембранами позитивные красители и химические фиксаторы, чем, по-видимому, и следует объяснить неудачные попытки выявления элементарных частиц методами позитивного контрастирования⁽¹⁶⁾. Все это, а также принципиальная непригодность методов химического контрастирования для изучения функциональной морфологии мембран уже давно вызывают необходимость в разработке новых (безартефактных) методов электронномикроскопической визуализации биологических ультраструктур.

В поисках такого метода в последнее время обратились к технике замораживания — травления (freeze — etching)⁽⁸⁾, основанной на физической низкотемпературной фиксации биологических объектов. Метод замораживания — травления был успешно использован и для изучения ультраструктуры митохондрий^(2, 6, 7, 17).

В настоящем исследовании для изучения ультраструктурной организации митохондрий клеток *Endomyces magnusii* была использована разработанная нами новая модификация метода замораживания — травления. Эта модификация, названная криоскалыванием, позволяет проводить сверхскоростное замораживание биологических объектов (скорость охлаждения порядка 1000°/сек). При этих условиях процессы кристаллизации внутриклеточной воды эффективно блокируются и необходимость предварительной обработки объекта «антизамораживающими» жидкостями (при обычной технике замораживания — травления воду замещают глицерином) полностью исключается. Кроме того, поскольку резка заменена механическим сколом, становится возможной одновременная репликация обеих комплементарных частей препарированного объекта.

Для осуществления сверхбыстрого замораживания и скола использовали разработанное нами приспособление к вакуумно-напылительной

установке (¹⁸). Скол замороженного образца проводили при вакууме не ниже $3 \cdot 10^{-6}$ мм рт. ст. и температуре объекта не выше -130° . После кратковременного травления обнаженные поверхности оттеняли платино-углеродной смесью и покрывали углеродной пленкой. Остальные операции (снятие реплик, очистка от биологических остатков, монтаж на предметные сетки) проводили по обычной методике. Готовые реплики исследовали в электронном микроскопе JEM-7A.

Как видно из рис. 1, метод криоскальвания позволяет выявить различные структуры митохондрий (наружную и внутреннюю мембраны, матрикс кристы). Вид этих структур соответствует их изображениям на ультратонких срезах. На внутренней мембране четко выявляются ряды элементарных частиц, имеющих форму цилиндрических тел со сферически закругленными свободными концами. Указанные частицы лучше выявляются после предварительного травления (рис. 1Б). Диаметр частиц составляет около 100 Å; высота — 150 Å. Линейная плотность частиц составляет в среднем 100 на 1 μ. По своей форме описанные частицы несколько отличаются от элементарных частиц, наблюдаемых в негативном контрасте. У них, в частности, нет характерных дистальных «грибовидных» утолщений. Отсутствие у элементарных частиц «грибовидных» утолщений отмечали и другие авторы (¹⁷), использовавшие метод замораживания — травления для изучения ультраструктуры изолированных митохондрий животных клеток. Необходимо, однако, отметить, что обычный метод замораживания — травления с применением антифриза дает в целом неудовлетворительное изображение элементарных частиц (^{6, 7, 17}).

Таким образом, выявление элементарных частиц практически безартефактным методом криоскальвания следует рассматривать как важное доказательство реальности их существования в интактных митохондриях. Вместе с тем, наблюдаемые особенности строения этих частиц (по сравнению с их изображением в негативном контрасте) указывают на весьма существенные структурные изменения, претерпеваемые элементарной частицей, особенно ее дистальной частью, под влиянием контрастирующих веществ.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
Академии наук СССР
Пушино-на-Оке

Поступило
7 X 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ P. Blair, T. Oda et al., *Biochemistry*, 2, 756 (1963). ² D. Branton, H. Moor, *J. Ultrastruct. Res.*, 11, 401 (1964). ³ F. Crane, J. Stiles et al., In: *Regulatory Functions of Biological Membranes*, Elsevier, 1968. ⁴ H. Fernández-Moran, *Circulation*, 26, 1039 (1962). ⁵ H. Fernández-Moran, T. Oda et al., *J. Cell Biol.*, 22, 63 (1964). ⁶ C. Hackenbroock, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 61, 598 (1968). ⁷ E. Keihani, J. Kriz, *C. R.*, 268, 1643 (1969). ⁸ H. Moor, *Intern. Rev. Cytol.*, 25, 391 (1969). ⁹ U. Muscatello, V. Garriero-Bobyleva, *J. Ultrastruct. Res.*, 31, 337 (1970). ¹⁰ F. Palmieri, M. Klingenberg, *Europ. J. Biochem.*, 1, 439 (1967). ¹¹ D. Parsons, *Science*, 140, 685 (1963). ¹² D. Parsons, *J. Cell Biol.*, 16, 620 (1963). ¹³ D. Parsons, G. Williams, B. Chance, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 137, 643 (1966). ¹⁴ F. Sjöstrand, L. Barajas, *J. Ultrastruct. Res.*, 32, 293 (1970). ¹⁵ D. Smith, *J. Cell Biol.*, 19, 135 (1963). ¹⁶ W. Stoeckenius, *J. Cell Biol.*, 17, 443 (1963). ¹⁷ J. Wrigglesworth, L. Packer, D. Branton, *Biochim. et biophys. acta*, 205, 125 (1970). ¹⁸ Э. И. Заичкин, Б. А. Фихте, Лаб. дело, № 12 (1971).



Рис. 1. Поперечный срез клетки *Endomyces magnusii*. А — видны наружная и внутренняя мембраны митохондрий и прикрепленные к кристам (к, А) элементарные частицы (э.ч.), 60 000×; вверху 200 000×. а, б — вид поперечного среза митохондрий до травления (а), 95 000×; после травления (б), 110 000×