

Л. П. ТРОИЦКАЯ, С. Н. КУЗЬМИНА, И. Б. ЗБАРСКИЙ

## ГРИБОВИДНЫЕ ВЫРОСТЫ ЯДЕРНОЙ ОБОЛОЧКИ

(Представлено академиком С. Е. Севериным 4 V 1971)

Разработанные нами методы получения изолированных ядерных оболочек и ядерных мембран (<sup>1, 2</sup>) позволили установить высокое содержание в них окислительных ферментов (<sup>3</sup>), наличие дыхания (<sup>4</sup>) и окислительного фосфорилирования (<sup>5</sup>). По интенсивности этих процессов ядерные оболочки приближаются к митохондриям (<sup>3-7</sup>).

Известно, что сопряжение фосфорилирования с окислением связывают с присутствием на внутренней мембране митохондрий элементарных (сферических) частиц (<sup>8, 9</sup>), чаще называемых грибовидными выростами. Вместе с тем на ядерных мембранах, несмотря на их детальное электронномикроскопическое изучение (<sup>10, 11</sup>), подобные образования не описаны. Следует, однако, отметить, что при электронной микроскопии изолированных нами ядерных мембран на срезах внутренней мембраны были описаны гранулоподобные образования размером меньше рибосом, характер которых оставался неясным (<sup>2, 6</sup>). С другой стороны, в последние годы отмечалось, что внутренняя ядерная мембрана несколько толще наружной и на своей поверхности, обращенной к ядру, по-видимому, содержит «фиброзный слой», тонкое строение и функции которого также остаются неизвестными (<sup>11</sup>). Действительно, хроматин, прилегающий к внутренней ядерной мембране, затрудняет детальное изучение ее строения.

Удаление основной массы хроматина экстракцией 10% цитратом натрия позволяет лучше рассмотреть структуру ядерной оболочки. Ядра, изолированные из печени крысы в концентрированном растворе сахарозы (<sup>1, 2</sup>), суспендировали в 0,02 М фосфатном буфере рН 7,2. Через 1 мин. добавляли кристаллический цитрат натрия до конечной концентрации 10% и оставляли при комнатной температуре на 30—40 мин. Ядра после этого почти не прокрашивались метиленовым синим и выглядели под световым микроскопом как «ядерные тени». После отмывания 0,02 М фосфатным буфером препараты фиксировали 1% глутаровым альдегидом на 0,02 М фосфатном буфере с последующей фиксацией в 1% четырехокси осмия и заливали в эпон-812. Ультратонкие срезы, полученные на ультратоме ЛКВ, окрашивали по методу Рейнольдса и исследовали в электронном микроскопе JEM-7A при напряжении 80 кв.

На срезах таких препаратов можно видеть, что внутренняя ядерная мембрана несколько толще наружной; со стороны, обращенной к нуклеоплазме, на ней видны многочисленные, довольно равномерно расположенные выступы, толщиной 100—125 Å (рис. 1а, б). После тщательной экстракции цитратом натрия удается получить относительно крупные фрагменты ядерной оболочки, отмытой от хроматина. На срезах этих фрагментов ядерная оболочка представляется вывороченной внутренней мембраной наружу, где и наблюдается ее «фиброзный слой» (рис. 1б).

В ядерных оболочках экстракцией ядер цитратом и окрашенных фосфорновольфрамовой кислотой методом негативного контрастирования (1% фосфорновольфрамовая кислота, нейтрализованная КОН до рН 7,4),

можно различить сферические элементарные частицы (грибовидные выросты), расположенные регулярно (рис. 1а) и близко напоминающие аналогичные образования, описанные в митохондриях (<sup>8</sup>, <sup>9</sup>, <sup>12</sup>).

Эти же образования хорошо различимы на ядерных оболочках, полученных осмотическим разрушением изолированных ядер в 0,02 М фосфатном буфере с последующим центрифугированием в прерывистом градиенте сахарозы, описанным нами ранее (<sup>1</sup>, <sup>2</sup>) (рис. 1з, д).

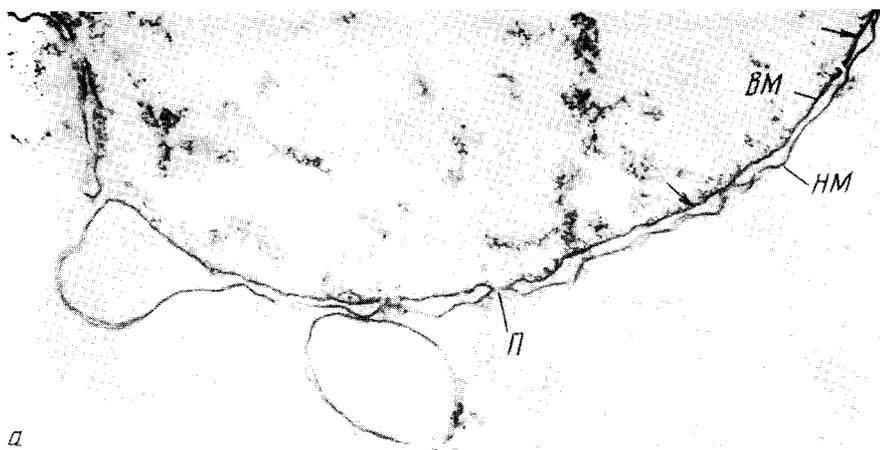
Клеточные ядра, изолированные из печени и использовавшиеся для получения ядерных оболочек, согласно электронной микроскопии и ферментативным тестам были свободны от митохондрий и других цитоплазматических загрязнений (<sup>2</sup>, <sup>3</sup>, <sup>6</sup>). Однако, учитывая, что препараты ядерных мембран могли содержать небольшую примесь хроматина или рибонуклеопротеидных гранул, происходящих из изолированных ядер, мы исследовали действие на изолированные ядерные оболочки рибонуклеазы и дезоксирибонуклеазы в условиях, нарушающих структуру соответственно рибосом и хроматина.

Препараты ядерных оболочек, содержащие 700—800 мкг белка, инкубировали в объеме 1 мл с РНКазой (Merck) в 0,02 М фосфатном буфере рН 7,2 при 0° в течение 5 мин. и 17 час., используя при этом от 4 до 100 мкг РНКазы на пробу и при комнатной температуре с 16 мкг РНКазы 5 мин. при 20°.

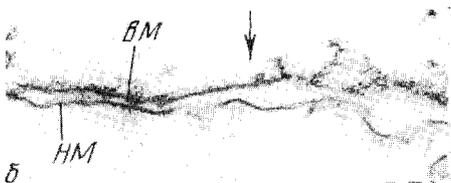
Обработку ДНКазой также проводили при 0° и при 20°, в разные интервалы времени, с разными количествами фермента: 4 мкг на пробу, 5 мин. при 0°; 100 мкг на пробу, 17 час. при 0° и 16 мкг на пробу, 5 мин. при 20°. Обработка этими ферментами совершенно не влияла на встречаемость, частоту, расположение в форму грибовидных образований. Напротив, после обработки ДНКазой (0,3 мг на пробу, содержащую 0,7—0,8 мг белка в течение 60 мин. при 20°) рН 6,5 они выявлялись несколько четче (рис. 1е, ж, з). Параллельно изучалось действие на изолированные ядерные оболочки пепсина (L. Light) (0,3 мг/мл в 0,1 N HCl в течение 20 мин. при комнатной температуре). Эта обработка вызывала общее нарушение структуры мембран, что не давало возможности наблюдать ее детали.

Ориентировочные промеры грибовидных выростов ядерной оболочки печени крысы показывают, что диаметр сферической части колеблется от 50 до 90 Å, составляя в среднем около 70 Å, толщина стебелька от 20 до 40 Å, в среднем около 30 Å и длина стебелька 30—60 Å, в среднем около 45 Å. Эти размеры несколько меньше, чем в митохондриях сердечной мышцы, но близки к наблюдавшимся в митохондриях печени (<sup>12</sup>). Следует отметить также, что выступы внутренней ядерной мембраны, выявляемые на срезах (рис. 1а, б), очень напоминают аналогичные структуры, описанные на кристах митохондрий нейронов воиной моли и рассматриваемые как соответствующие структуры, обнаруживаемые негативным контрастированием (<sup>13</sup>).

Детальные исследования, проведенные на митохондриях (<sup>8</sup>, <sup>9</sup>, <sup>12</sup>), и, с другой стороны, обнаружение в ядерных оболочках печени крысы интенсивного окислительного фосфорилирования (<sup>5</sup>, <sup>6</sup>) позволяют рассматривать обнаруженные нами грибовидные выросты ядерной оболочки как морфологическое выражение сопряжения окисления и фосфорилирования. Весьма существенно установить, имеются ли такие же структуры на ядерных мембранах других клеток. Наличие «фиброзного слоя» на внутренней ядерной мембране многих клеток (<sup>11</sup>), а также присутствие ферментов окисления и окислительное фосфорилирование в ядрах тимуса и значительно более высокая концентрация окислительных ферментов в ядерной фракции, обогащенной мембранами (<sup>14</sup>, <sup>15</sup>), позволяют полагать, что как грибовидные выросты, так и окислительное фосфорилирование являются общим свойством ядерной оболочки. Некоторые косвенные данные, приведенные в настоящей работе, свидетельствуют в пользу



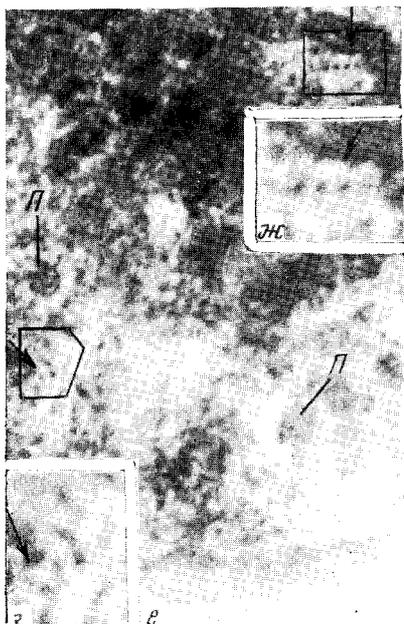
а



б

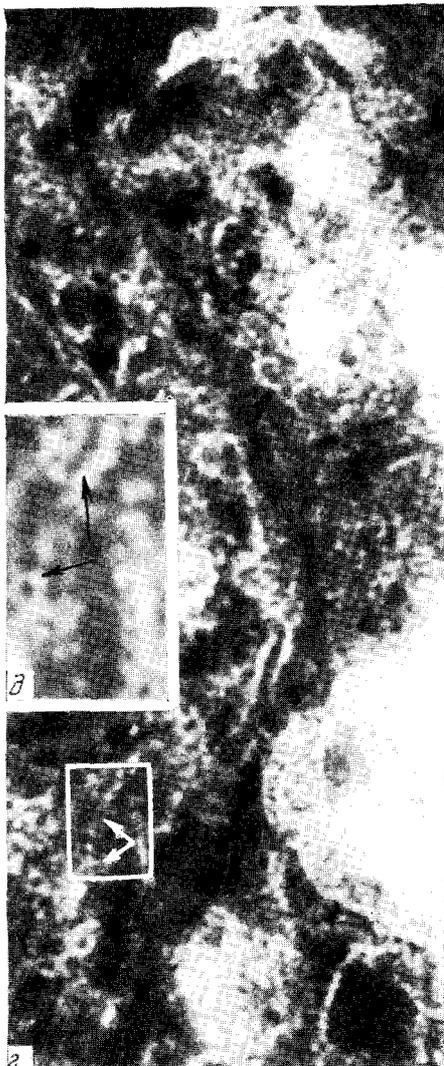


в



г

г



д

д

Рис. 1. а — участок ядра печени крысы после тщательной экстракции 10% цитратом натрия, 20 000 X. б — участок вывернутой ядерной оболочки печени крысы. Фиксация 1% глутаральдегидом с дофиксацией 1% четырехокисью осмия, эпоп-812, 40 000 X. в, г — изолированные ядерные оболочки печени крысы. Негативный контраст 1% ФВК (в — 340 000 X, г — 300 000 X). д — увеличенный участок рис. 1г (очерчено), 700 000 X. е — изолированные ядерные оболочки печени крысы после обработки ДНКазой. Негативный контраст 1% ФВК, 250 000 X. ж, з — увеличенные участки рис. 1е (очерчены), 450 000 X. Грибовидные выросты отмечены стрелками; п — поры; в.м. — внутренняя ядерная мембрана; н.м. — наружная ядерная мембрана



Рис. 1. Нейроны в двигательной коре головного мозга кролика после 3-минутного действия звука. Окраска по Эйнарсону. Ок. 10×, об. 60× (масляная иммерсия)

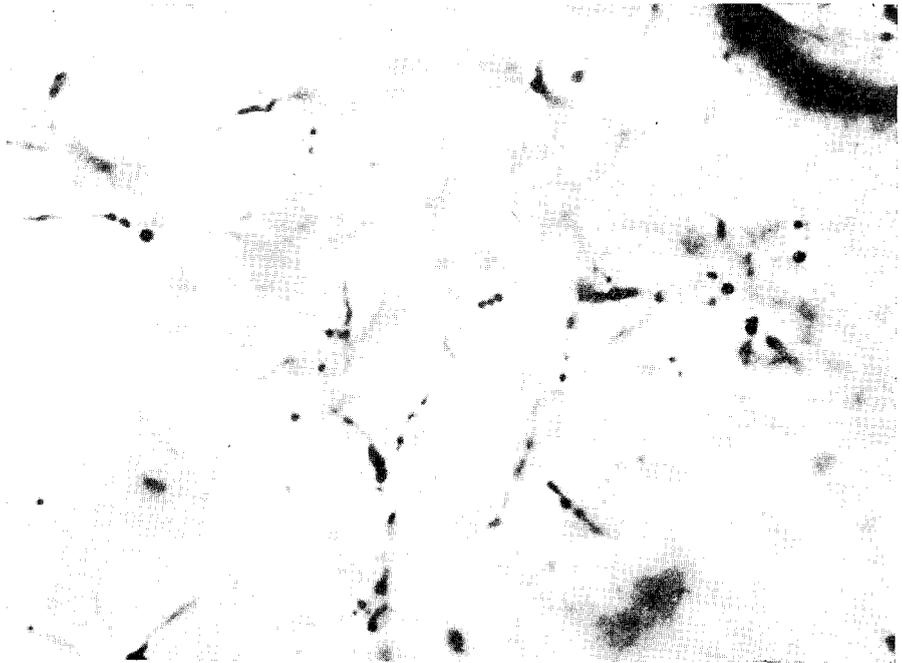


Рис. 1. Дегенерирующие нервные волокна в дорсальных отделах контралатерального хвостатого ядра после экстирпации коры слуховой зоны Ер. Наута — Гигакс, Об. 40×, ок. 15×

того, что найденные образования связаны с внутренней мембраной клеточного ядра.

Эти вопросы, а также выяснение того, с какими факторами окисления или окислительного фосфорилирования связаны обнаруженные грибовидные образования, являются предметом наших дальнейших исследований.

Институт биологии развития  
Академии наук СССР  
Москва

Поступило  
4 V 1971

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> И. Б. Збарский, К. А. Перевощикова, Л. Н. Делекторская, ДАН, 177, 445 (1967). <sup>2</sup> К. А. Перевощикова, Л. Н. Делекторская и др., Цитология, 10, 573 (1968). <sup>3</sup> И. Б. Збарский, А. А. Покровский и др., ДАН, 181, 993 (1968). <sup>4</sup> С. Н. Кузьмина, Н. К. Монахов и др., ДАН, 191, 215 (1970). <sup>5</sup> Т. В. Бульдьева, С. Н. Кузьмина, И. Б. Збарский, ДАН, 202, № 2 (1971). <sup>6</sup> И. Б. Збарский, Усп. совр. биол., 67, 323 (1969). <sup>7</sup> И. Б. Збарский, В кн. Клеточное ядро. Морфология, биохимия, физиология, «Наука», 1972. <sup>8</sup> H. Fernandez-Morán, T. Oda et al., J. Cell Biol., 22, 63 (1964). <sup>9</sup> Э. Рэкер, Биоэнергетические механизмы, М., 1967. <sup>10</sup> J. G. Gall, In: Protoplasmatologia, 5, № 2, 4 (1964). <sup>11</sup> B. J. Stevens, J. André, In: Handbook of Molecular Cytology, North-Holland, 1969, p. 837. <sup>12</sup> E. A. Munn, Ibid., p. 875. <sup>13</sup> D. Ahhurst, J. Cell Biol., 24, 497 (1965). <sup>14</sup> T. E. Conover, Arch. Biochem. and Biophys., 136, 551 (1970). <sup>15</sup> I. Betel, В кн. Клеточное ядро. Морфология, физиология, биохимия, «Наука», 1972.