

Л. Е. БАКЕЕВА, В. П. СКУЛАЧЕВ, А. А. ЯСАЙТИС

ИЗМЕНЕНИЕ МОРФОЛОГИИ МИТОХОНДРИЙ ПОД ВЛИЯНИЕМ ТРАНСМЕМБРАННОГО ГРАДИЕНТА pH

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 20 IX 1971)

Результаты электронномикроскопических исследований последних лет свидетельствуют о выраженной изменчивости морфологических и ультраструктурных параметров изолированных митохондрий при изменении функционального состояния этих органелл (^{1, 2}). Данные измерений неспецифического светорассеяния суспензии митохондрий, плотности и объема матрикса на срезах митохондрий (³⁻¹⁰) с достаточной убедительностью показывают, что набухание митохондрий сопровождается увеличением объема матрикса и общего объема митохондрий, выпрямлением гребней в митохондриях сердца, а в случае митохондрий печени — уменьшением числа гребней вплоть до полного их исчезновения в результате прогрессирующего набухания митохондриального матрикса. Максимальное набухание наблюдается при инкубации митохондрий в присутствии источника энергии, проникающего катиона и проникающей слабой кислоты. Исключение проникающего катиона резко уменьшает степень набухания. Минимальный объем матрикса и, соответственно, наименьшая степень набухания обнаруживается в условиях деэнергизации, когда энергетических ресурсов нет, либо они не могут быть использованы вследствие ингибирования цепей переноса электронов и энергии или разобщения окислительного фосфорилирования.

Изменения степени набухания связаны, по всей вероятности, с перераспределением ионов и соответствующего количества осмотических эквивалентов воды между вне- и внутримитохондриальными пространствами, разделяемыми осмотическим барьером внутренней мембраны митохондрий.

Особый интерес представляют морфологические перестройки внутренней мембраны, наблюдаемые в условиях энергизации митохондрий в присутствии фосфата или других проникающих слабых кислот (³⁻⁵). Гребни митохондрий при этом приобретают волнистые очертания и в большинстве своем представлены трубками, заполненными матриксом. Причины появления такого рода искривлений плоскости мембраны и образования трубчатых гребней остаются неясными. Вряд ли они могут быть сведены к воздействию сил осмотического или онкотического давления.

Электронномикроскопические исследования, результаты которых суммированы в настоящей работе, показали, что появление извитых и трубчатых гребней может быть вызвано возникновением градиента pH между вне- и внутримитохондриальными пространствами.

Как видно из представленных электронномикроскопических снимков, перенесение митохондрий сердца быка из среды суспендирования с pH 7,5 (рис. 1а) в среду инкубации с pH 9,0 (рис. 1б) или с pH 6,0 (рис. 1б) сопровождается появлением волнообразных и трубчатых гребней, характерных для митохондрий, энергизованных в присутствии фосфата (³⁻⁵). Для развития эффектов достаточно 30 сек. Эффект полностью предотвращается разобщителями — переносчиками ионов H⁺, такими как тетрахлортрифторметилбензимидазол (рис. 1г). Аналогичным действием обладал также трифторметоксикарбонилданилфенилгидразон.

Тот факт, что разобщители-протонофоры, резко ускоряющие выравнивание градиента pH между вне- и внутримитохондриальной средой (¹¹), снимают конфигурационные изменения, вызванные помещением митохонд-

рий в кислую или щелочную среду, заслуживает специального рассмотрения. Указанное наблюдение свидетельствует о том, что именно градиент рН на митохондриальной мембране, а не сама по себе кислая или щелочная среда, **должен** быть ответственным за появление изогнутых и трубчатых гребней в данных условиях эксперимента. Специальные измерения протонной проводимости митохондриальных мембран показали, что 30-секундная инкубация митохондрий в смеси, рН которой отличается от внутримитохондриального рН, оказывается недостаточной для выравнивания концентраций ионов H^+ по ту и другую сторону мембраны. Градиент рН исчезает лишь спустя несколько минут. Разбавители многократно сокращают время, необходимое для снятия градиента рН (¹¹). Известно, что энергизация митохондрий сопровождается возникновением электрохимического потенциала ионов H^+ («протондвижущей силы», п.д.с.) на внутренней митохондриальной мембране (¹²). П.д.с. складывается из разности электрических потенциалов ($\Delta\psi$) и градиента рН (ΔpH) между вне- и внутримитохондриальными пространствами. Градиент рН в энергизованных митохондриях направлен таким образом, что в матриксе среда оказывается более щелочной, чем в окружающем митохондрии растворе. Можно было бы предположить, что помещение митохондрий в кислую среду энергизует АТФ-синтетазную систему (внутри митохондрий рН 7,5, снаружи 6,0). В этом случае наблюдавшиеся морфологические изменения могли бы быть следствием энергизации мембраны. Такое объяснение не подходит для опытов, где изменение морфологии митохондрий вызывали инкубацией при рН 9,0. В этом случае п.д.с. оказывалась направленной в противоположную сторону по сравнению с тем, что имеет место при энергизации митохондрий. Следовательно, энергизация ферментных систем не может рассматриваться как обязательное условие возникновения трубчатых гребней. Наличие градиента рН оказывается достаточным для отмеченного изменения морфологии митохондрий.

Одно из возможных объяснений эффекта градиента рН могло бы состоять в следующем. Различная концентрация ионов H^+ по ту и другую стороны внутренней мембраны митохондрий должна иметь следствием различную ионизацию химических группировок, расположенных на двух сторонах мембраны. Различия степени ионизации, и, следовательно, сил электростатического взаимодействия между поверхностными компонентами противоположных сторон мембраны могут привести к искривлению плоскости мембраны и образованию изогнутых и трубчатых гребней.

Возможно, что те же причины лежат в основе аналогичных морфологических изменений, возникающих при энергизации митохондрий. В этом случае, однако, предстоит выяснить роль проникающих слабых кислот, присутствие которых считается необходимым для получения трубчатых гребней в энергизованных митохондриях.

Авторы выражают глубокую благодарность Ю. С. Ченцову за полезное обсуждение результатов и В. В. Круглякову за техническую помощь.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
30 VIII 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ D. E. Green, H. Baum, *Energy and the Mitochondrion*, N. Y.—London, 1970.
- ² E. F. Korman, A. D. E. Addink et al., *J. Bioenergetics*, **1**, 9 (1970). ³ J. T. Penniston, R. A. Harris et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **59**, 624 (1968).
- ⁴ R. A. Harris, J. T. Penniston et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **59**, 830 (1968).
- ⁵ D. E. Green, J. Asai et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, **125**, 684 (1968). ⁶ C. R. Hackenbrock, *J. Cell Biol.*, **30**, 269 (1966). ⁷ C. R. Hackenbrock, *J. Cell Biol.*, **37**, 345 (1968). ⁸ G. R. Hunter, G. P. Brierley, *Biochim. et biophys. acta*, **180**, 68 (1969). ⁹ C. R. Hunter, Y. Kamishima, G. P. Brierley, *Biochim. et biophys. acta*, **180**, 81 (1969). ¹⁰ K. Utsumi, L. Packer, *Arch. Biochem. and Biophys.*, **121**, 633 (1967). ¹¹ P. Mitchell, J. Moyle, *Biochem. J.*, **104**, 588 (1967).
- ¹² P. Mitchell, *Mitochondria. Structure and Function*, London—N. Y., 1969, p. 219.
- ¹³ L. E. Bakeeva, L. L. Grinius et al., *Biochim. et biophys. acta*, **216**, 13 (1970).
- ¹⁴ А. А. Ясайтис, В. В. Чистяков, В. П. Скулачев, В сборн. Механизмы дыхания, фотосинтеза и фиксации азота, «Наука», 1967, стр. 55.

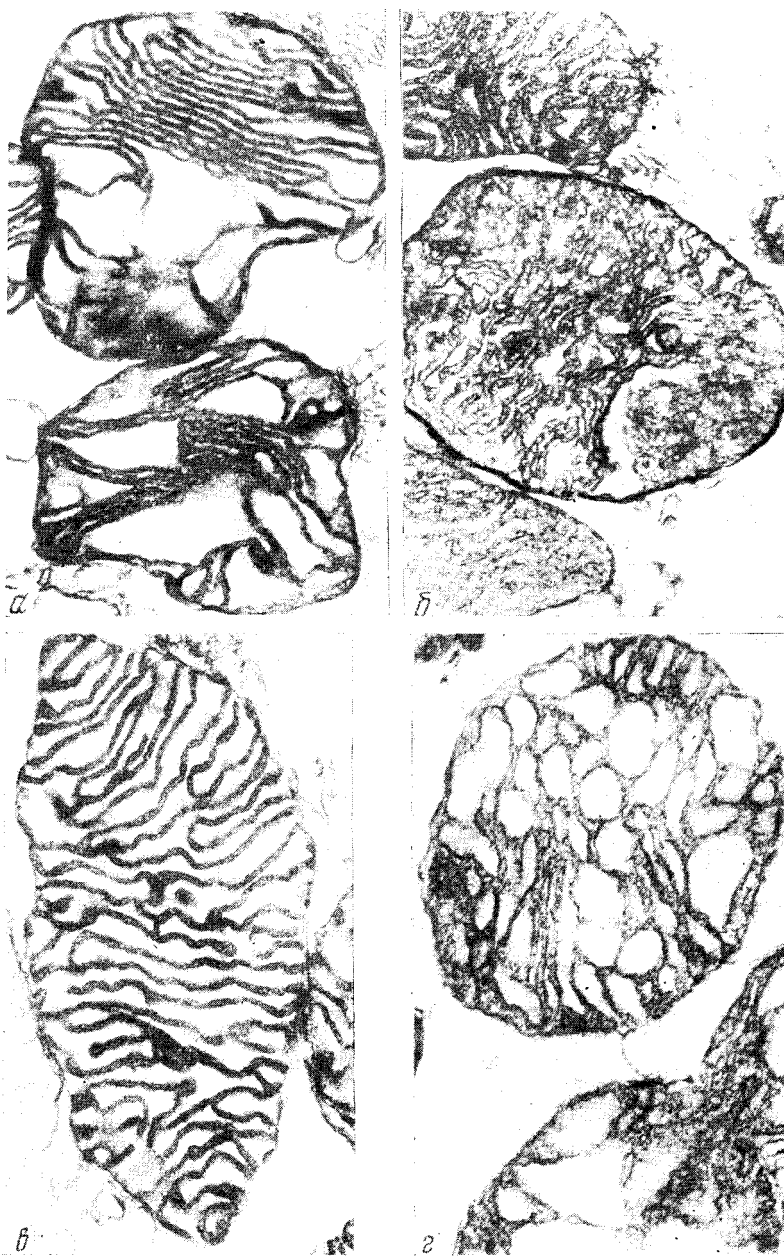


Рис. 1. Действие градиента pH на морфологию митохондрий сердца быка. Фракцию тяжелых митохондрий сердца быка, полученную по методу ⁽¹²⁾, дважды промывали 0,25 *M* сахарозой, суспендировали и хранили до опыта при 0° в 0,25 *M* сахарозе, дополненной 50 мМ *трис*-HCl, pH 7,5 (а, в) или 50 мМ *трис*-ацетатом pH 7,5 (б, г). Инкубацию митохондрий (4 мг белка на 1 мл) проводили в течение 30 сек. при комнатной температуре в средах того же состава, дополненных 1 мкг антимицина А на 1 мл (все варианты) и $2 \cdot 10^{-5}$ *M* тетраэтортрафторметилбензимидазолом (вариант г). pH среды инкубации 7,5 (а), 6,0 (б и г), 9,0 (в). Реакцию прекращали добавлением 25% раствора глутаральдегида соответствующего pH до конечной концентрации 5%. Образцы дофиксировали и доокрашивали OsO_4 и уранил-ацетатом, заливали в эпон. Микроскопическое исследование проводили на электронном микроскопе Хитачи-11U, как в ⁽¹³⁾. 60 000 ×

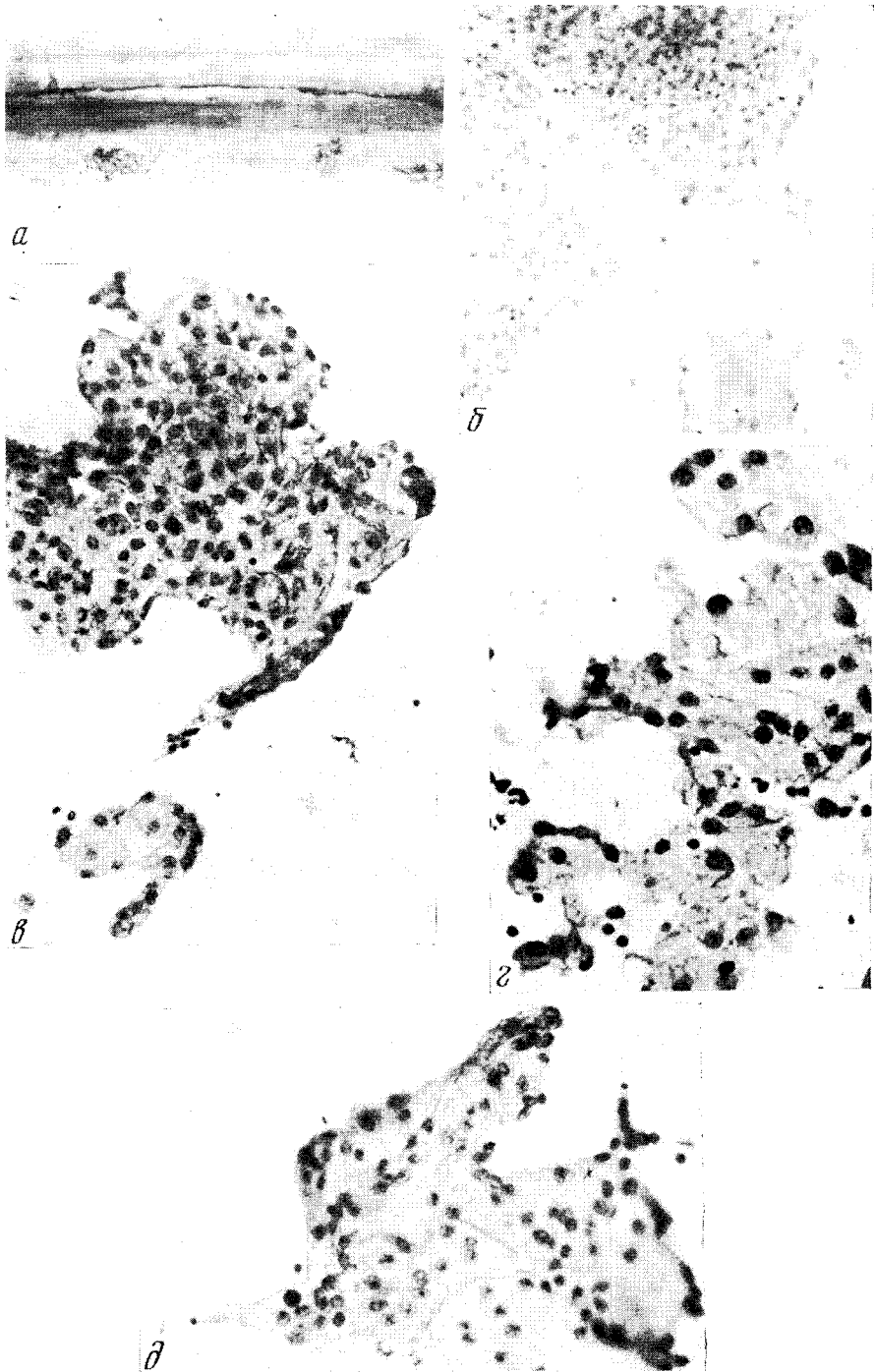


Рис. 1. *a* — участок туловища сагитты *Sagitta bipunctata*. Тотальный препарат. Ок. 10 ×, об. 8 ×. *б* — участок туловища сагитты на вторые сутки культивирования в диффузионной камере. Тотальный препарат. Ок. 10 ×, об. 20 ×. *в* — колонии соединительных клеток на 7 сутки культивирования. Тотальный препарат. Ок. 10 ×, об. 40 ×. *г* — пласт покровного эпителия на 10 сутки культивирования в диффузионной камере. Тотальный препарат. Ок. 10 ×, об. 40 ×. *д* — колония эпителиальных клеток эндотермального происхождения. Тотальный препарат. Ок. 10 ×, об. 40 ×