

УДК 576.8.094.7

ЦИТОЛОГИЯ

Э. И. ЗАЧКИН, С. А. ОРЛОВА, Б. А. ФИХТЕ

**ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ ФОРМИРОВАНИЯ ПОВЕРХНОСТНОЙ
МЕМБРАНЫ В ИЗОЛИРОВАННЫХ МИКРОКАПЕЛЬКАХ
ЦИТОПЛАЗМЫ *PHYCOMYCES BLAKESLEEANUS***

(Представлено академиком А. А. Базевым 9 VII 1975)

При нарушении целостности клетки, вытекающее из нее содержимое не растворяется в окружающем водном растворе, а образует капли с прочной и эластичной поверхностью раздела (¹⁻⁴). При некоторых условиях на изолированных каплях цитоплазмы образуется полупроницаемая поверхностная мембрана с типичной трехслойной структурой (⁵⁻⁷). Образование таких мембран наблюдали на изолированных каплях цитоплазмы из клеток *Nitella* (⁵) и микросомицетов (^{8, 9}). Необходимым условием для возникновения поверхностной мембраны является присутствие в среде двухвалентных катионов кальция и магния (^{10, 11}). В отдельных случаях возможна полная регенерация изолированных микрокапелек и образование жизнеспособного организма (^{8, 9, 12, 13}).

В данной работе динамику спонтанного формирования поверхностной мембраны изучали на модели изолированных микрокапелек цитоплазмы *Phycomyces blakesleeanus*. Микрокапельки получали путем прокола оболочки в точке роста спорангиофора, предварительно погруженного в водный раствор, содержащий 0,5 мМ KNO₃, 0,5 мМ NaCl, 1 мМ Ca(NO₃)₂, 2 мМ Mg(NO₃)₂, 0,5 М сахарозу (среда I) или в жидкое сусло, стабилизированное по плотности и осмотичности 0,2% агаром Дифко и 0,5 М сахарозой (среда II). В некоторых случаях микрокапельки заключали в агаровые блоки, предохраняющие поверхностные структуры цитоплазмы от механических повреждений в процессе дальнейших манипуляций. Для этого верхнюю часть спорангиофора, помещенного на покровное стекло, заливали каплей расплавленной и затем охлажденной до 45° агаризованной среды I или II. После застывания среды, спорангиофор вместе с агаром перерезали лезвием бритвы. При последующем удалении спорангиофора в агаре формировался канал, который заполняла вытекающая цитоплазма. Затем на препарат наносили еще один слой расплавленной агаризованной среды, закрывающей отверстия канала.

Для получения электронно-микроскопических препаратов микрокапельки различных сроков инкубации (0, 5, 10, 15, 20, 30 сек., 1, 10, 30 мин., 1-2 часа) фиксировали в 1% растворе глютарового альдегида, а затем в 1% растворе четырехоксида осмия. После обезвоживания в спиртах препараты заключали в эпон. Ультратонкие среды, дополнительно окрашенные уранилацетатом и цитратом свинца, просматривали в электронном микроскопе JEM-7a при ускоряющем напряжении 80 кВ.

При перерезании спорангиофоров *Phycomyces blakesleeanus* вытекающая в стабилизирующий раствор цитоплазма образует оформленные капельки с выраженной поверхностью раздела. В каплях присутствуют многочисленные ядра, митохондрии, вакуоли, липидные гранулы и другие характерные для данного организма структуры и органеллы.

Электронно-микроскопические исследования показали, что в течение первых 1-3 сек. инкубации капельки полностью лишены поверхностной

мембраны (стадия гимнопластов). Цитоплазма непосредственно контактирует с окружающей средой, сохраняя четкую поверхность раздела (рис. 1А). Однако при инкубации капелек в регенерирующей среде в течение 10–15 сек. на их поверхности выявляется типичная трехслойная мембрана толщиной 80 Å (рис. 1Б). На этом этапе микрокапельки напоминают обычные протопласты. Скорость формирования мембраны не зависела от типа использованных сред.

На электронно-микроскопических препаратах промежуточных сроков инкубации (4–7 сек) видно, что липидные гранулы, расположенные по периферии капельки, как бы растекаются по ее поверхности (рис. 1В). Характерно, что внешняя зона этих гранул состоит из многочисленных, концентрически закрученных мембран толщиной 40–50 Å; сердцевина представлена гомогенным веществом низкой электронной плотности. По-

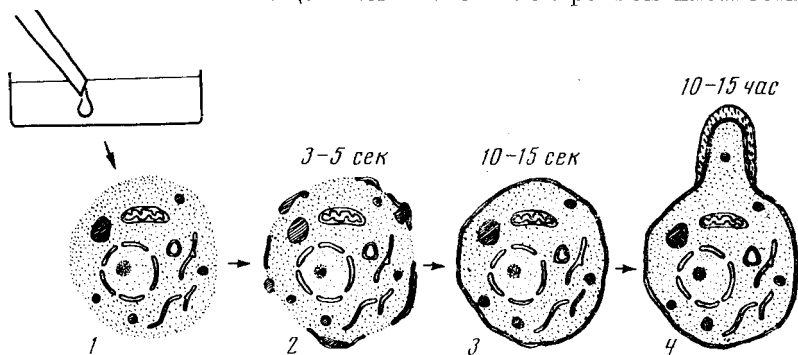


Рис. 2. Схема формирования поверхностной мембраны в изолированных микрокапельках цитоплазмы *Physcomyces blakesleeana* (липидные гранулы заштрихованы). 1 — гимнопласт, 2 — образование липидного слоя, 3 — протопласт, 4 — полная регенерация и рост гиф

следнее особенно четко видно на препаратах, окрашенных рутением красным. По мере растекания, липидные гранулы полностью превращаются в мембранные образования. На таких участках поверхность капельки покрыта тонкой пленкой, состоящей из нескольких мембран. Внешняя зона липидных гранул, расположенных в глубине цитоплазмы, имеет упорядоченную структуру с гексагональной упаковкой.

Дальнейшая инкубация микрокапелек до 2 час. на минимальной среде приводит к деструкции цитоплазмы, проявляющейся в интенсивной агрегации рибосом, нарушении целостности ядерных и митохондриальных мембран. Однако сама поверхностная мембрана остается без видимых изменений. Лучшая сохранность цитоплазмы в этот период наблюдается при инкубации изолированных капелек на среде II.

На препаратах микрокапелек, фиксированных после 5 сек инкубации только глютаровым альдегидом без дофиксации четырехокисью осмия и последующем обезвреживании в ацетоне поверхностная мембрана не выявляется, а липидные гранулы кажутся «вымытыми». Это, возможно, указывает на то, что вновь образованная мембрана полностью лишена или содержит лишь минимальное количество белковых компонентов (¹⁴).

Условия появления поверхностной мембраны свидетельствуют о спонтанном характере ее формирования. Первоначально на поверхности капли формируется мембрана, состоящая главным образом из липидов. На это указывает тот факт, что капельки 4–7 сек. инкубации были покрыты тонкой пленкой, образующейся в результате растекания по поверхности капли липидных гранул. Эта пленка состоит из нескольких мембран, по своим размерам соответствующих искусственным липидным мембранам.

Окончательное завершение формирования поверхностной мембраны происходит, по-видимому, путем последующего встраивания белковых ком-

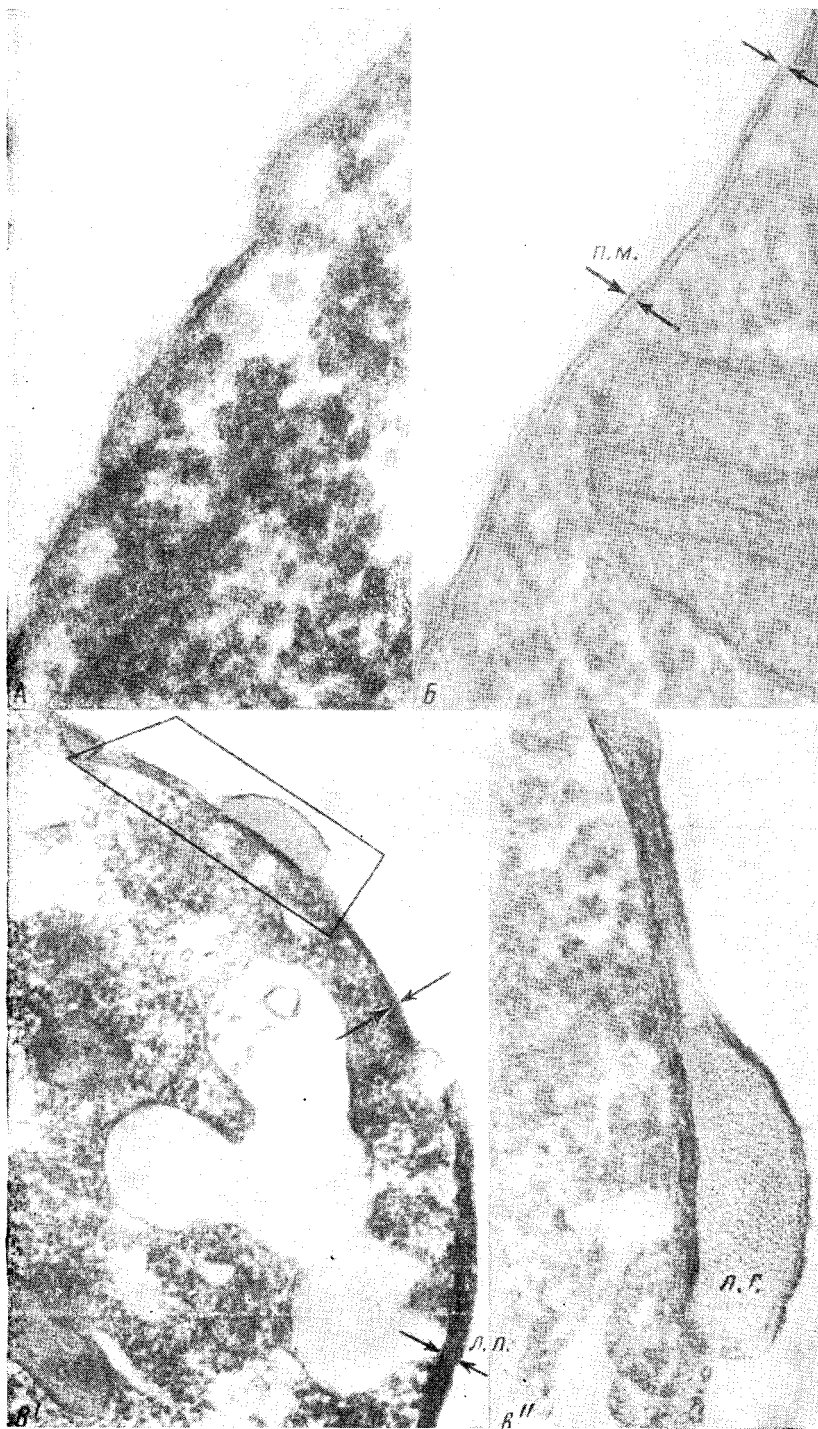


Рис. 1. Ультратонкие срезы изолированных капелек цитоплазмы *Physocystis blakesleeana* различных сроков инкубации. А — время инкубации 0–2 сек. Поверхностная мембрана не выявляется. 150000×; Б — время инкубации 10–15 сек. на поверхности капельки цитоплазмы видна трехслойная мембрана (п.м.); В — время инкубации 4–5 сек. На поверхности капельки видна липидная пленка (л.п.) из нескольких мембран (В' — 45000×; В'' — ув. 140000×)

нонентов, присутствующих в цитоплазме капельки, в предварительно образованную липидную матрицу. Схематически процесс формирования поверхностной мембраны представлен на рис. 2.

Возможность двухэтапного формирования поверхностной мембраны была отмечена также Иноуэ с сотрудниками (¹⁵) на модели капелек из цитоплазмы клеток *Nitella*. Несколько иной механизм морфогенеза поверхностной мембраны был нами ранее описан для микрокапелек цитоплазмы *Phyosarum polycerphalum* (⁹). В этом случае поверхностная мембрана формируется из предшествующих в цитоплазме мембран везикулярных телец, путем их слияния друг с другом.

Наличие различных путей и механизмов формирования поверхностных мембран заслуживает большого внимания при изучении процессов морфогенеза и дифференциации биологических мембран. С этой точки зрения, описанная модель изолированных микрокапелек *Phycomyces blakesleeanae* представляется особенно перспективной. Она может оказаться также весьма ценной для изучения некоторых аспектов вегетативной гибридизации, геномной интеграции и структурной совместимости изолированных оргanelл у микроорганизмов.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
Академии наук СССР
Пушино Московской обл.

Поступило
30 VI 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ L. Jost, *Protoplasma*, v. 7, 1 (1969). ² K. Linsbauer, *Protoplasma*, v. 5, 563 (1929). ³ S. Strugger, *Protoplasma*, v. 7, 23 (1929). ⁴ K. Umrath, *Protoplasma*, v. 24, 92 (1935). ⁵ N. Kamiya, K. Kuroda, *Proc. Japan. Acad.*, v. 33, 149 (1957). ⁶ J. Inoue, Y. Ishima et al., *Proc. Japan. Acad.*, v. 47, 549 (1971). ⁷ Р. К. Салеев, В. И. Чернышев, Матер. IX Всесоюз. конфер. по электрон. микроскоп., Тбилиси, М., 1973, стр. 515. ⁸ K. Wohejarth-Bottermann, W. Stockert, *Wilhelm Roux Arch.*, v. 164, 321, (1970). ⁹ Э. И. Заичкин, С. А. Орлова, Б. А. Фухте, Тез. докл. V съезда Всесоюз. микробиол. общ. (Ереван), Секция: Рост и развитие микроорг., Ереван, 1975, стр. 46. ¹⁰ T. Takenaka, J. Inoue et al., *Proc. Japan. Acad.*, v. 47, 554 (1971). ¹¹ T. Takenaka, T. Yoshioka, H. Horie, *Proc. Japan. Acad.*, v. 49, 286 (1973). ¹² Э. И. Заичкин, Б. А. Фухте, Матер. IX Всесоюз. конфер. по электрон. микроскоп., Тбилиси, М., 1973, стр. 517. ¹³ A. Weide, *Arch. Exp. Zellforsch.*, B. 23, 299 (1939). ¹⁴ В. Л. Боровягин, С. С. Вапронь, Сб.: Биофизика живой клетки, т. 4, Пушино, 1973, стр. 67. ¹⁵ J. Inoue, T. Ueda, Y. Kobatake, *Biochim. et biophys. acta*, v. 298, 653 (1973).