ՀԱՅԿԱԿԱՆ ՍՍՌ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԿԱԴԵՄԻԱՅԻ ՏԵՂԵԿԱԳԻՐ
ИЗВЕСТИЯ АКАДЕМИИ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

Բիոլոգիական գիտ. XVIII, № 6, 1965 Биологические науки

К. С. АБРАМЯН, В. Н. РЕЙНГОЛЬД

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СУБМИКРОСКОПИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ЯДЕРНЫХ ОБОЛОЧЕК НЕКОТОРЫХ КЛЕТОК

Ядерная оболочка, ультраструктура которой в наиболее общих чертах и на некоторых объектах изучена довольно подробно, является важным внутриклеточным барьером. Ее функционированием обусловлены такие кардинальные процессы в жизнедеятельности клетки, как взаимоотношения ядра и цитоплазмы, связанные с проницаемостью ее для различных веществ, регуляция клеточного метаболизма и кинетика некоторых биохимических превращений.

Впервые ядерную оболочку изучили при помощи электронного микроскопа Каллан и Томлин [1] на овоцитах Triturus и Xenopus. Они же установили ее двуслойность и наличие пор. В последующие годы другими авторами [2—5] эти данные были дополнены подобными исследованиями на клетках из различных тканей, преимущественно у низших организмов. В отдельных случаях ядерная оболочка была изучена с большими подробностями. Вместе с тем, необходимо отметить, что данные относительно деталей структур не были лишены некоторых противоречий.

Несмотря на существование работ, довольно подробно рассматривающих некоторые вопросы, связанные с характерными чертами ультраструктурной организации ядерной оболочки [6, 7] и широко обобщающих результаты подобных исследований [8], высказывались отдельные сомнения в реальности существования ядерных пор [9, 10]. Наличие последних относилось к результатам возможных проявлений оптических артефактов. Однако благодаря целому ряду дальнейших исследований [11—14], этим сомнениям не осталось места, и изученные детали строения ядерной оболочки оказались в основном схожими с теми, которые описывались в работах предыдущих исследователей. Морфологическая характеристика ядерной оболочки с некоторыми дополнительными сведениями дана в литературе последних лет [15—18].

В настоящей работе излагаются результаты исследований по строению ядерной оболочки клеток культуры почечных тканей зеленой африканской мартышки (Cercopithecus aethiops), клеток слюнных желез личинки Chironomus tentans и глиальных клеток спинального ганглия крысы. Данные объекты подвергались изучению в связи с общей задачей, относящейся к сравнительному анализу ультрамикроструктуры ядра и его взаимоотношений с цитоплазмой с помощью электронномикроскопического метода.

Материал и метод

Первичную культуру трипсинизированной ткани почек африканских зеленых мартышек выращивали на предметных стеклах, вложенных во вращающиеся пробирки при 37°С. Среда состояла из 0,5% гидролизата лактальбумина в растворе Эрла (pH 7,0) с 8% бычьей сыворот.-кой. Монослой формировался обычно на 7 день, после чего предметные стекла с выращенной на них культурой клеток переносили в фиксатор Шьёстранда с добавлением сахарозы для достижения изотоничности и фиксировали в течение 30 мин. при 4°С. Фиксированный на стеклах монослой обезвоживали в спиртах возрастающей крепости по 3 мин. 25° спирт содержал 2% раствор уранилацетата, а абсолютный—1% раствор фосфорновольфрамовой кислоты.

После извлечения слюнные железы личинки Chironomus фиксировались фиксатором Паладе, содержащим 1% раствор четырехокиси осмия на ацетат-вероналовом буфере с pH 7,2, 1,5—2 часа при 4°С. Дегидратацию производили в спиртах возрастающей концентрации. Кусочки заливали в предполимеризованную смесь мономеров н-бутила и метила метакрилатов в пропорции 4 : 1. Для заливки использовали рамки из листового плексигласа [20]. Образец полимеризовался при 68°С в течение 10 час. Использованный способ заливки в рамки из органического стекла позволяет отбирать с помощью светового, фазовоконтрастного или стереоскопического (МБС-2) микроскопов в случае данного объекта и ориентировать надлежащим образом клетки в пирамиде, предназначенные для изучения в электронном микроскопе. После осмотра такой пластинки выделяли отобранные участки и наклеивали каплей предполимера на цилиндрические столбики из плексигласа. Окончательное приклеивание кусочков достигалось полимеризацией в течение 6 час. при 70°С. Применяя указанные методы обработки материала, при заточке блока удавалось на вершине пирамиды поместить одну отобранную клетку с ядром.

Спинальные ганглии у крыс брали под эфирным наркозом и фиксировали в вышеприведенном фиксаторе 2—2,5 часа с pH 7,6 при 4°С. Дальнейшую обработку производили по вышеописанной прописи. Ультратонкие срезы толщиной в 200—300 А приготовляли на ультрамикротоме LKB-4800 стеклянными ножами, контрастировали соединениями свинца [23] и уранилацетатом, просматривали в электронных микроскопах УЭМВ-100 и JEM 5У при ускоряющих напряжениях соответственно в 75 и 80 кв и увеличениях на экране в 15 000, 20 000 и 25 000 х. Дальнейшее увеличение достигалось фотографическим способом.

Результаты исследования

Оболочка ядра клетки культуры почечной ткани зеленой африканской мартышки представлена двумя мембранами одинаковой толщины

по 100 А*. Они замыкают собой перинуклеарное пространство. Расстояние между мембранами варьирует и в среднем составляет 180 А. Таким образом, общая толщина ядерной оболочки у этого объекта оказывается равной 380 А. Однако довольно часто наружная мембрана ядерной оболочки более извилиста и местами отходит на значительное расстояние, превышающее среднюю ширину перинуклеарного пространства. При этом иногда наблюдаются пузырьковидные выпячивания наружной мембраны, очень сходные с пузырьками цитоплазмы, часто располагающимися поблизости от ядра (рис. 1). Нередко на поверхности наружной мембраны, обращенной в сторону цитоплазмы, можно наблюдать прикрепление рибосом (рис. 1, 2).

Местами наружная мембрана переходит во внутреннюю, образуя таким образом, прерывистости, представляющие собой поры. В большинстве случаев поры довольно четко видны и средний диаметр их достигает 480 А. Подсчет количества пор на линейную единицу протяжения ядерной оболочки показал, что число их различно и достигает в одних местах 4 на 1 μ, в других 1, а иногда они отсутствуют на протяжении 5 μ (рис. 1, 3—5).

Так же, как и у некоторых объектов ядерная оболочка образует здесь значительные выступы (рис. 6) и глубокие впячивания (рис. 7), видимые иногда и на тангенциальных срезах с включениями элементов цитоплазмы.

На всех приведенных электронных микрофотографиях видно незначительное различие в плотностях на границе ядерной оболочки с цитоплазмой. Иногда к внутренней мембране тесно примыкает плотным кольцом, делая ее малоразличимой, ядерный материал, состоящий преимущественно из гранул. Средняя ширина этого кольцевого слоя составляет около 1000 А и прерывается на уровне пор (рис. 4, 5).

Одним из отличительных признаков, присущих строению ядра клеток слюнной железы личинки Chironomus, является различие в степени насыщенности структурными элементами пограничных зон ядра и цитоплазмы одного среза. Благодаря этому краевые участки ядра светлее прилегающей цитоплазмы. Эта особенность обеспечивает четкую и детальную картину строения ядерной оболочки на всем ее протяжении. Концентрация структурных элементов ядра с внутренней поверхности ядерной оболочки, имеющая место у предыдущего объекта, здесь не наблюдается, что, по-видимому, объясняется характерными особенностями строения этих ядер.

Поры особенно четко видны при больших увеличениях с высоким разрешением. Средний диаметр их достигает 580 А, а количество на небольшом протяжении значительно и доходит местами до 5 на 1 μ (рис. 8). При этом характер их различен. Одни заполнены диффузным

---

* Все размеры даются с точностью ± 20 А, соответствующей величине разрешающей способности микроскопов.

плотным веществом, а в других оно отсутствует, поэтому в последнем случае они кажутся открытыми.

Расстояние между двумя мембранами, образующими перинуклеарное пространство, в известных пределах довольно постоянное и достигает 180 А. Наружная мембрана ядерной оболочки несколько толще внутренней (рис. 8) и они соответственно равны 80 и 100 А. Таким образом, общая толщина ядерной оболочки составляет 360 А. К наружной мембране оболочки ядра также прикрепляются рибосомы, но они встречаются редкими единичными скоплениями и выявляются не всегда четко, благодаря их близким размерам с наружной мембраной оболочки ядра. Обычно ядерная оболочка данного объекта не образует глубоких выпячиваний в цитоплазму за некоторыми исключениями (рис. 9).

Оболочка ядра глиальной клетки спинального ганглия крысы обнаруживает как черты сходства, так и некоторые различия с описанными примерами. Различия наблюдаются также в плотностях распределения веществ на границе ядра и цитоплазмы. Но здесь нуклеоплазма плотнее цитоплазмы и, хотя не имеется такого четкого кольца ядерного материала, примыкающего изнутри к ядерной оболочке, как в случае первого объекта, все же наблюдается некоторая концентрация структурных компонентов ядра. Мембраны, составляющие ядерную оболочку, тоньше, чем у предыдущих объектов—по 60 А каждая. А расстояние между ними, составляющее перинуклеарное пространство, значительно превышает таковое у предыдущих объектов и оказывается равным 250 А. Местами незначительно расширяясь, перинуклеарное пространство не принимает такого характера, как у первого объекта. Поры встречаются значительно реже и не так четко выражены. К оболочке также снаружи прикрепляются рибосомы и они отчетливо видны, т. к. диаметр их значительно превышает толщину наружной мембраны ядерной оболочки (рис. 10).

Обсуждение результатов

Подводя итоги вышеизложенному, можно подтвердить двуслойность ядерной оболочки, подобно тому, как это явствовало из результатов работ предыдущих исследователей. Описанные в литературе некоторые данные о четырехслойности ядерной оболочки [18] кажутся недостаточно убедительными. Небольшие расхождения с другими исследователями [17], возникающие у нас в определении величины пор и толщины мембран ядерной оболочки, вероятно, можно объяснить тем, что при измерениях мы пользовались большими увеличениями, что при наличии высокого разрешения должно было дать возможность более точного определения размеров структур.

Пузырьковидные выпячивания наружной мембраны ядерной оболочки, наблюдаемые в некоторых случаях, возможно, указывают на ее родство с системой пузырьков и трубочек эндоплазматического ретикулюма.

Для количественной характеристики пор необходимо иметь танген-

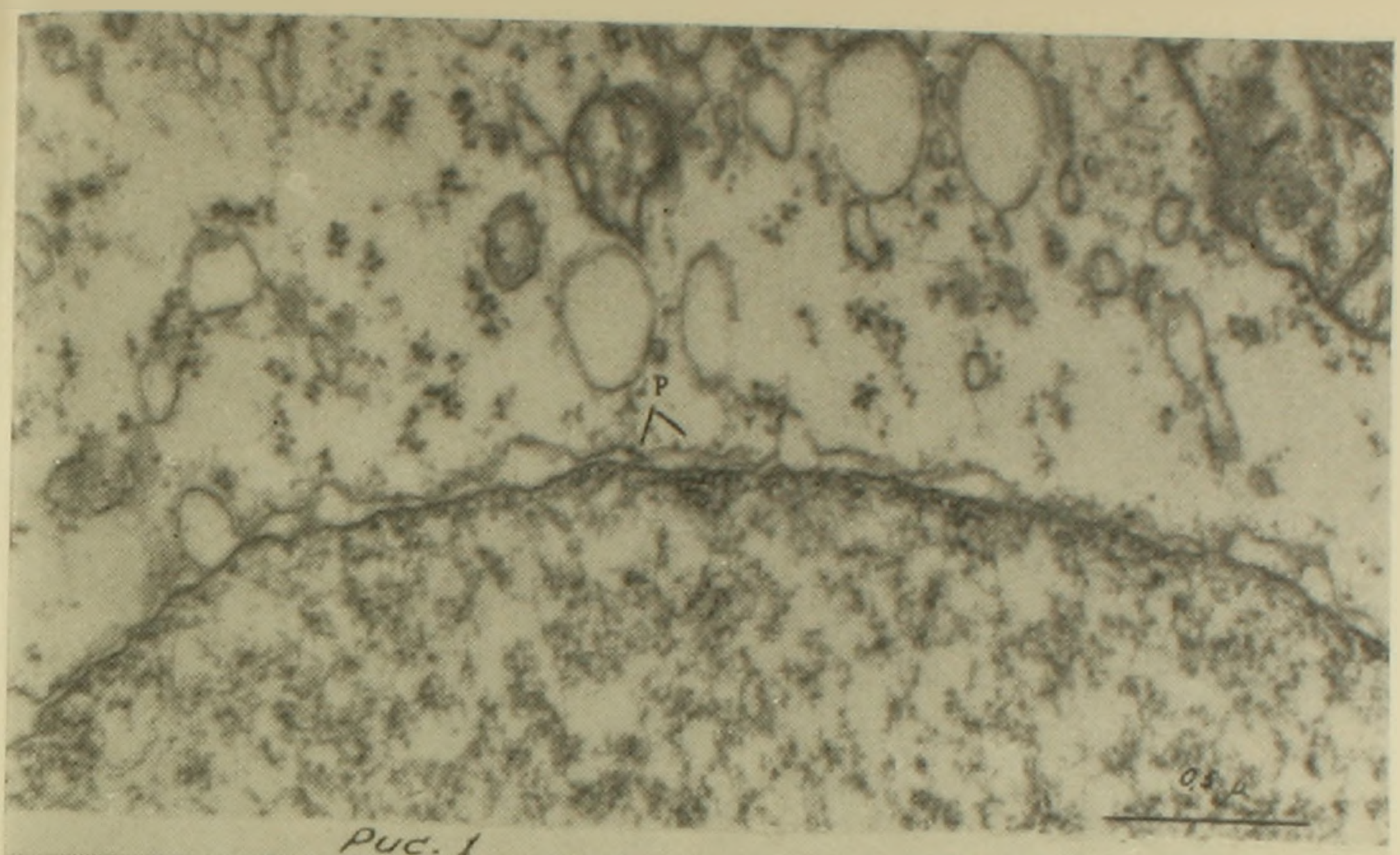

Рис. 1

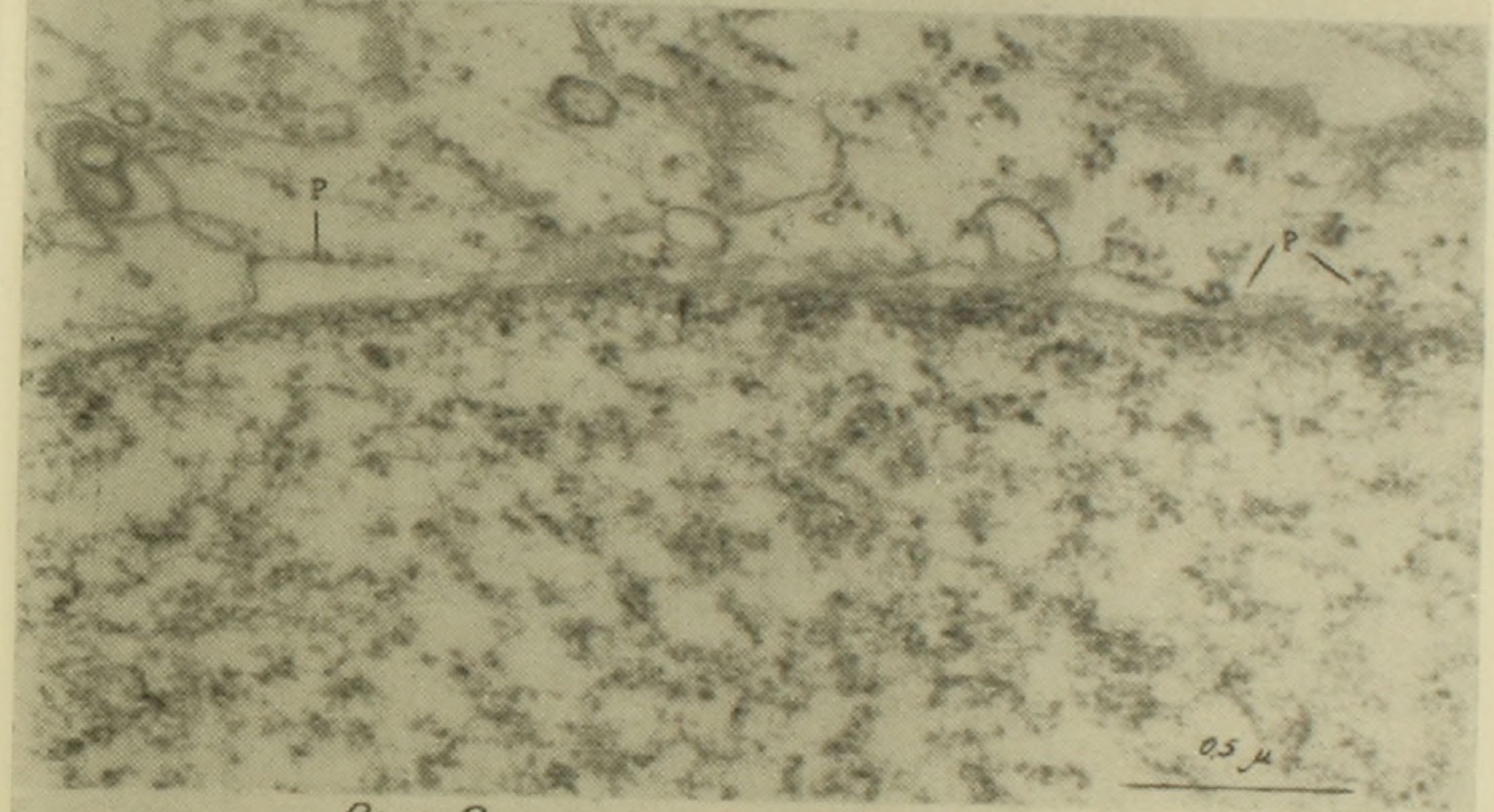

Рис. 2

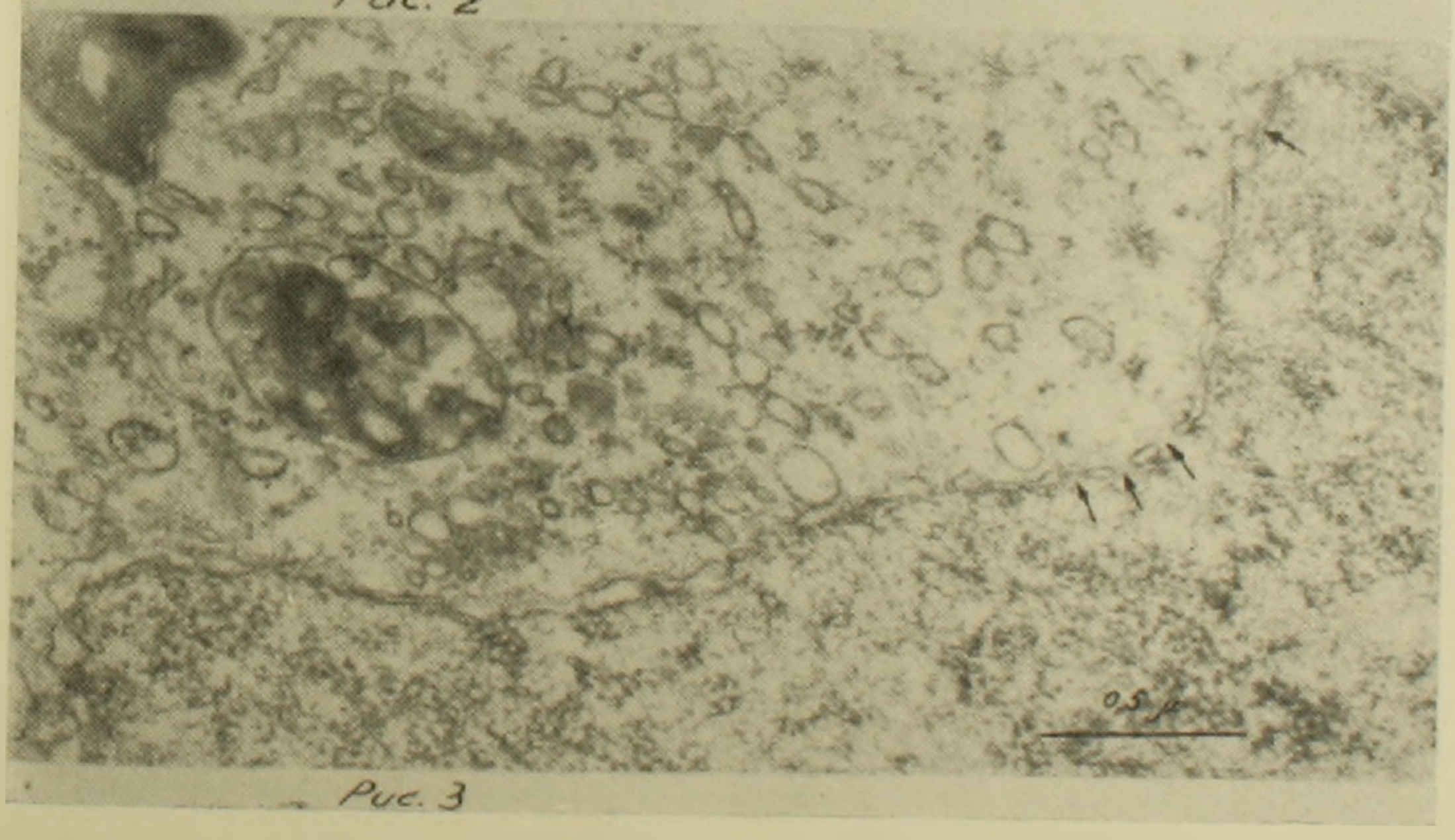

Рис. 3

Рис. 1—3. Отдельные участки клеток культуры почечной ткани зеленой африканской мартышки.

Рис. 1—2. Виды пузырьковидные выпячивания наружной мембраны с прикрепленными на ней рибосомами (Р). Поры отсутствуют.

Рис. 3. Участок с отчетливо видимыми порами (указаны стрелкой).

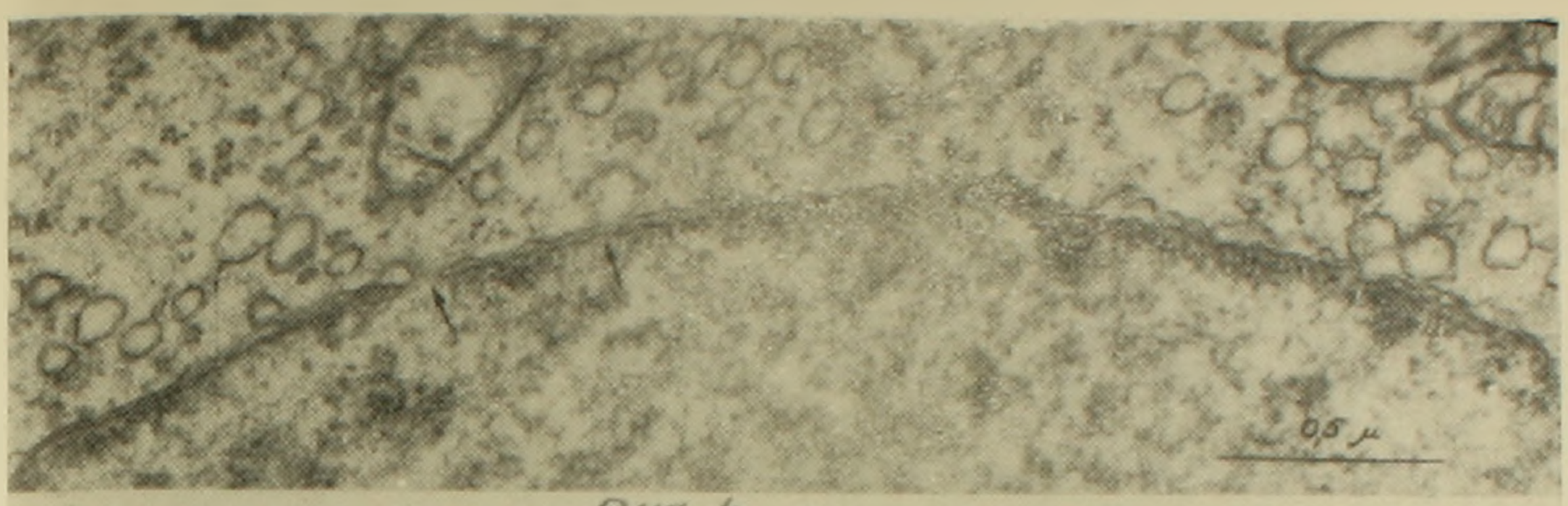

Рис. 4

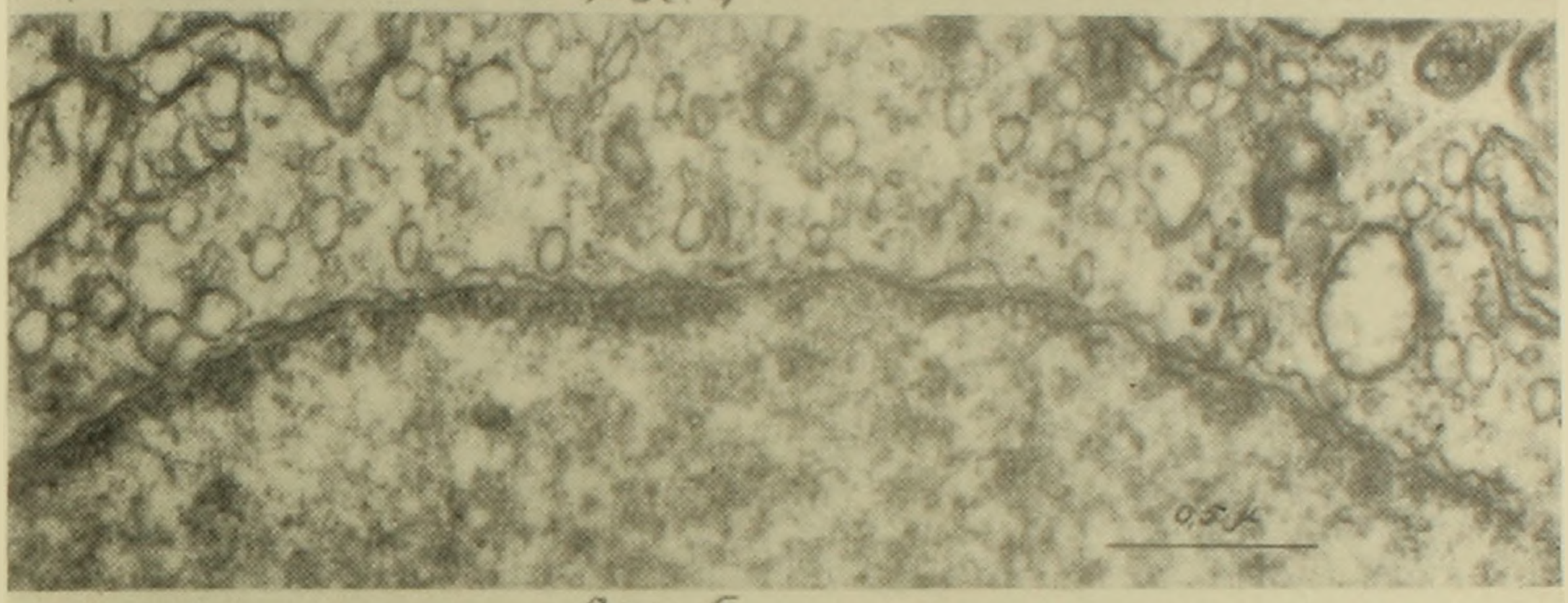

Рис. 5

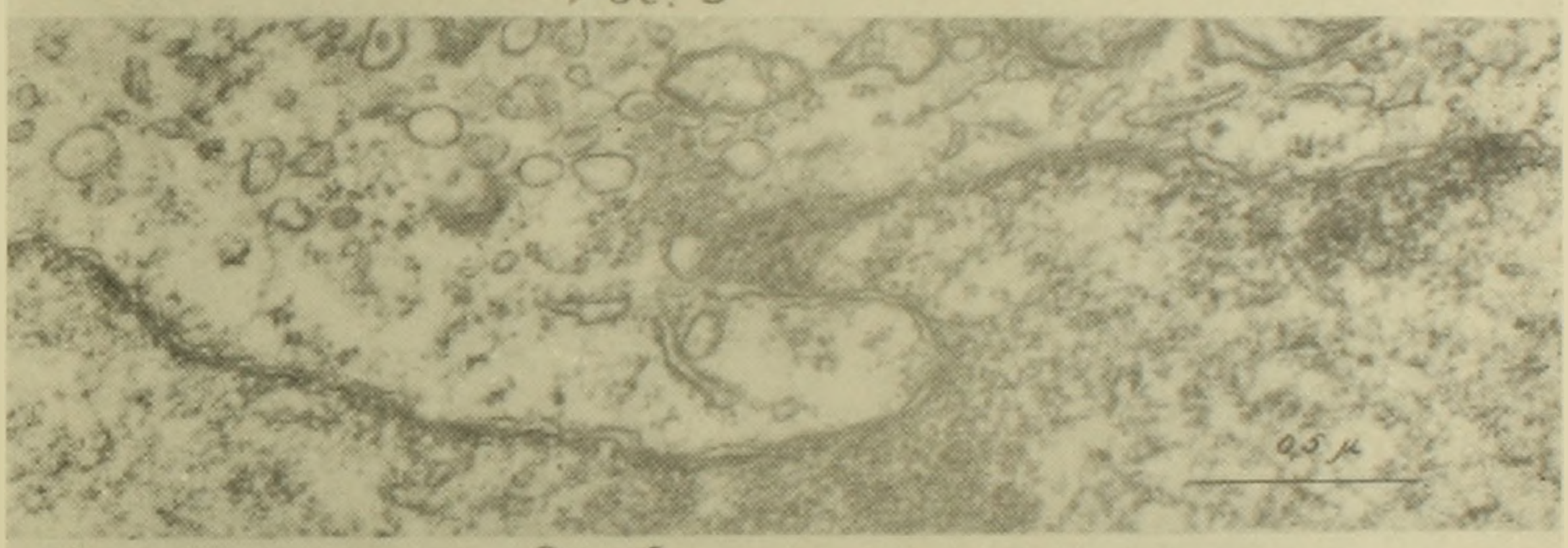

Рис. 6

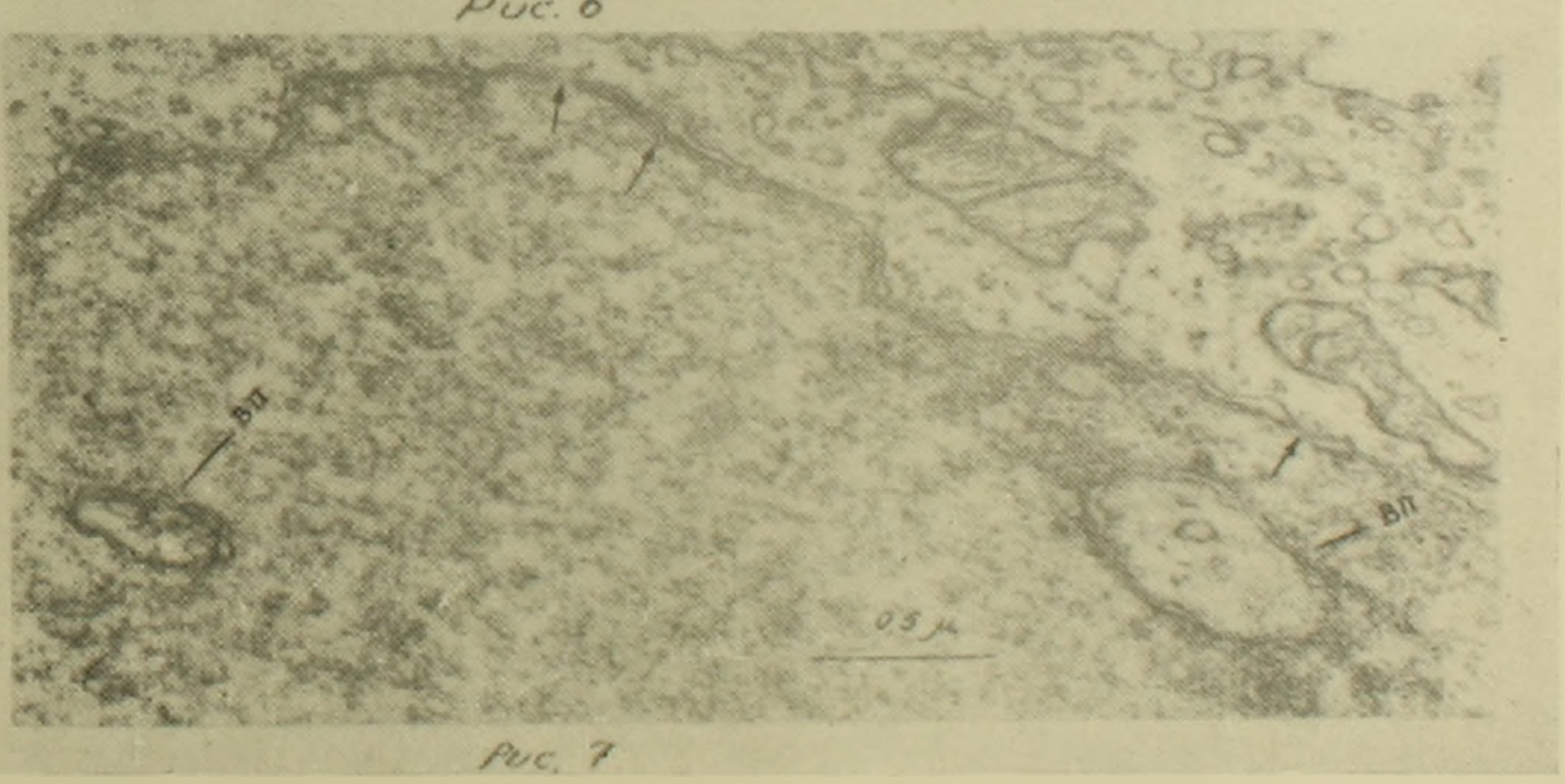

Рис. 7

Рис. 4—7. Отдельные участки клеток культуры почечной ткани зеленой африканской мартышки.

Рис. 4—5. Кольцевой слой ядерного материала, примыкающий к внутренней мембране оболочки ядра и прерывающийся на уровне пор, указанный стрелками.

Рис. 6. Глубокое выпячивание ядра в цитоплазму.

Рис. 7. Поперечные срезы ядра (ВП), в которых видны пузырьки цитоплазмы и рибосомы; поры указаны стрелками.

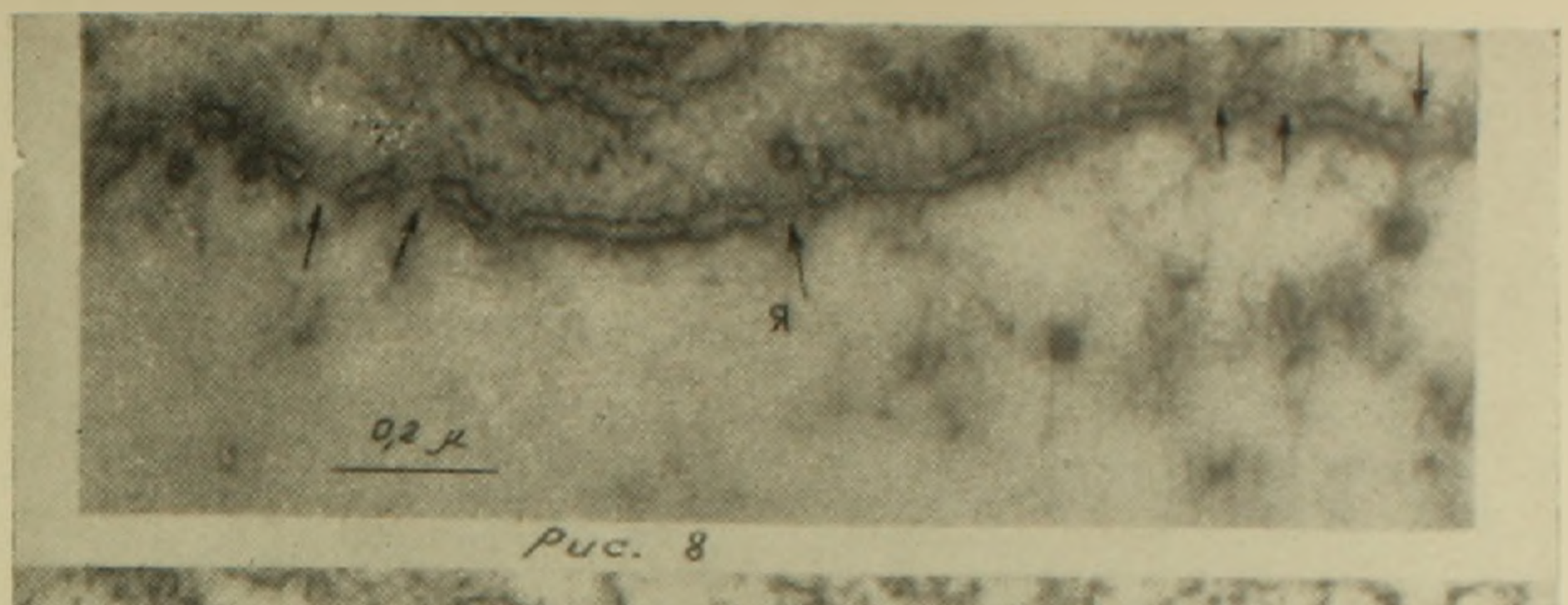

Рис. 8

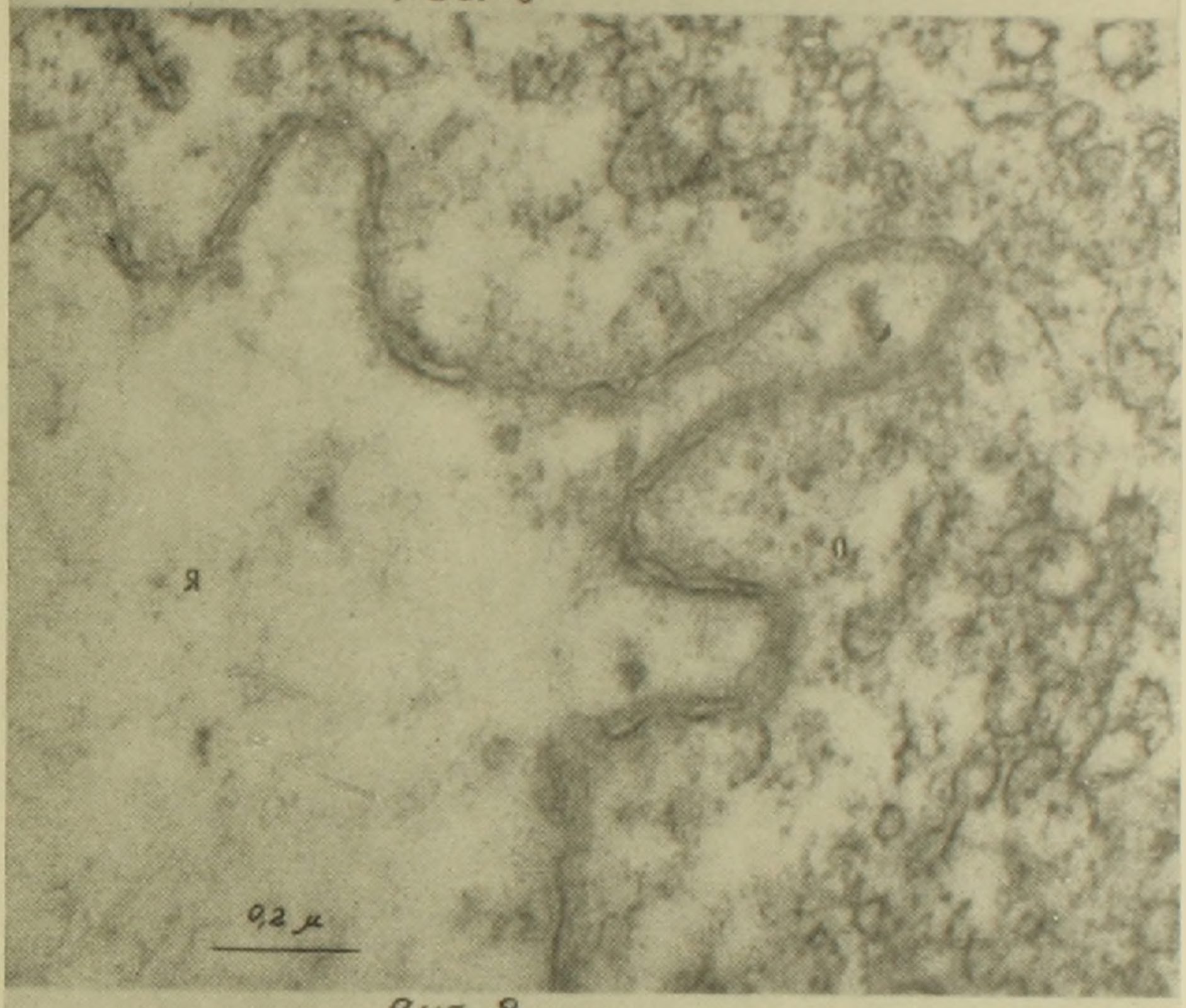

Рис. 9

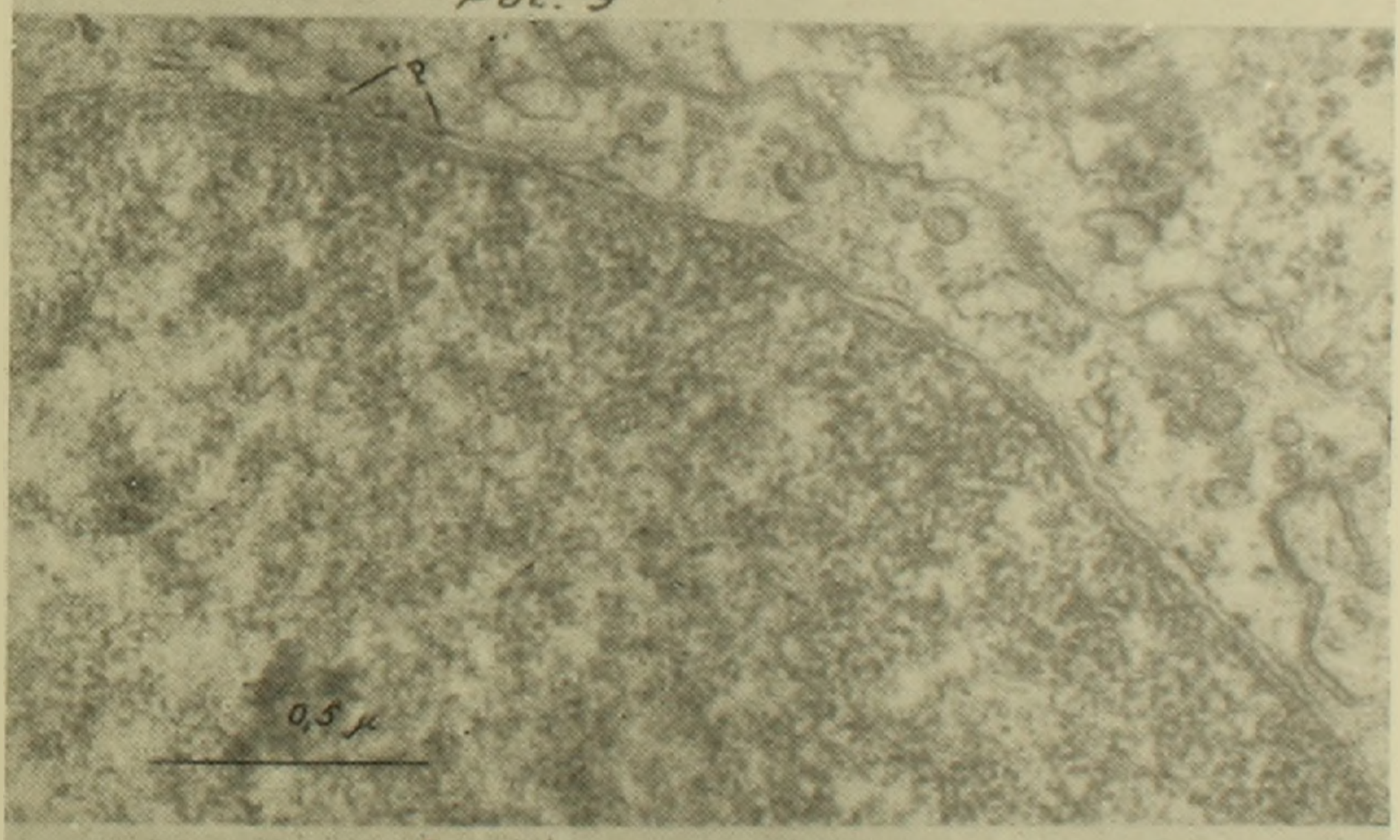

Рис. 10

Рис. 8—9. Фрагменты клеток слюнных желез личинки Chironomus.

Рис. 8. Отчетливо видны поры при большом увеличении и высоком разрешении, обе мембраны оболочки ядра (Я) различной толщины, часто прерывающиеся порами, указанные стрелками.

Рис. 9. Выпячивания ядра (Я), довольно редко наблюдаемые у данного объекта. На обоих фотографиях в ядрах видны гранулы диаметром в 500 А.

Рис. 10. Участок глиальной клетки спинального ганглия крысы. Ядерная оболочка с прикрепленными на ней рибосомами (Р). Поры отсутствуют.

циальные сечения ядерной оболочки на значительных расстояниях, чем мы, к сожалению, не располагаем. Линейное расположение пор не может дать полную информацию об их количественных изменениях, если таковые и наблюдаются. Имея в виду зависимость числа пор от плоскости прохождения среза при поперечном рассечении, все же необходимо отметить значительную разницу в их количестве у разных объектов. Очевидно, такое большое расхождение в количестве пор в некоторой степени находится в связи с функциональными особенностями различных клеток.

Интересен и тот факт, что общая толщина ядерной оболочки в клетках из различных тканей и организмов одинакова, в то время как толщина отдельных ее мембран может варьировать. Это хорошо иллюстрируется при сравнении оболочки ядра глиальных клеток с другими вышеописанными примерами. Хотя обе мембраны ядерной оболочки этого объекта заметно истончены, общая толщина ее такая же, как и у других рассматриваемых объектов, что достигается значительным расширением перинуклеарного пространства.

Необходимость такого детального рассмотрения структуры ядерной оболочки диктовалась наличием возможности исследования взаимоотношений ядра и цитоплазмы, результаты которого будут изложены в следующей работе.

Зоологический институт
АН Армянской ССР
Институт полиомиелита и вирусных
энцефалитов АМН СССР

Поступило 16.XII 1964 г.

Կ. Ս. ԱԲՐԱՀԱՄՅԱՆ, Վ. Ն. ՌԵՅՆՀՈԼԴ

ՄԻ ՔԱՆԻ ԲՋԻՋՆԵՐԻ ԿՈՐԻԶԱԹԱՂԱՆԹՆԵՐԻ ԵՆԹԱՄԱՆՐԱԴԻՏԱԿԱՅԻՆ ԿԱՌՈՒՑՎԱԾՔԻ ՀԱՄԵՄԱՏԱԿԱՆ ԲՆՈՒԹԱԳԻՐԸ

Ա մ փ ո փ ո ւ մ

Մի քանի տեսակ բջիջների կորիզաթաղանթի ենթամանրադիտակային բնութագրի համեմատական ուսումնասիրության ժամանակ բոլոր դեպքերում ցույց է տրված նրա երկշերտությունը և կորիզանցքերի առկայությունը։

Հոդվածում նկարագրվում են համեմատվող բջիջների կորիզաթաղանթների բաղկացուցիչ մասերի մորֆոլոգիական առանձնահատկությունները, որոնք արտահայտվում են նրանց միջև գոյություն ունեցող որոշակի նմանության և տարբերիչ գծերի առկայությամբ։

Յուրաքանչյուր առանձին դեպքում հայտնաբերված է կորիզաթաղանթի կառուցվածքի յուրատեսակությունը, որն, ըստ երևույթին, պայմանավորված է հետազոտված բջիջների տեսակային և ֆունկցիոնալ առանձնահատկություններով։

ЛИТЕРАТУРА

1. Callan H. G. and Tomlin S. G. Proc. Royl. Soc., 137, B 888, 367, 1950.
2. Bairati A. and Lehman F. E. Experientia, 8, 60, 1952.
3. Anderson N. G. Science, 117, 517, 1953.
4. Gall J. G. Exptl. Cell Res, 7, 197, 1954.
5. van Breemen V. L. J. Biophys. and Biochem. Cytol., 1, 257, 1955.
6. Afzelius B. A. Exptl. Cell Res, 8, 147, 1955.
7. Greider M. H. et al., J. Biophys. and Biochem Cytol., 2, Suppl, 445, 1955.
8. Watson M. L. Biochem. et Biophys. acta, 15. 475, 1954.
9. Gay H. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 41, 370, 1955.
10. Kautz J. K., De Marsh G. B. Exptl. Cell Res., 8, 394, 1955.
11. Beams H. W., Tahmisian T. N. et al., Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 91, 473, 1956.
12. Epistein M. B. J. Biophys. and Biochem. Cytol., 3, 567, 851, 1957.
13. Wischnitzer S. J. Ultrastr. Res. 1, 201, 1958.
14. Barer R. et al., Exp. Cell Res , 18. № 1, 179, 1959.
15. Jones P. Nature, 188, 4746, 239, 1960.
16. Merriam R. W. J. Biophys. and Biochem. Cytol., 11, 3, 559, 1961.
17. Bahr G. F. and Beermann W. Exp. Cell Res., 6, 519, 1954.
18. Jacob J. and Jurand A. Cromosoma, 14, 451, 1963.
19. Palade G. E. J. Exp. Med., 95, 285, 1952.
20. Рейнгольд В. Н. Тезисы докл. IV Всесоюзн. совещ. по электр. микроскопии. Сумы, стр. 94, 1963.
21. Рейнгольд В. Н. Тез. докл. IV Всесоюзн. совещ. по электр. микроскопии. Сумы, стр. 95, 1963.
22. Рейнгольд В. Н. Описание изобретения к авт. свид. 818705/31—16. d. 30h., 14. МПК A61k. Приоритет от 11.02.1964.
23. Millonig G. J. Biophys. and Biochem. Cytol., 11, 736, 1961.