

**АКАДЕМИЯ НАУК СССР  
НАУЧНЫЙ ЦЕНТР БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ  
ИНСТИТУТ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ**

**ПРЕПРИНТ**

**А.Г. БЕЛЯКОВИЧ**

**МИТОХОНДРИИ  
ПРЕВРАЩАЮТСЯ В  
МИКРООРГАНИЗМЫ !?**

**ПУЩИНО-1989**

Обобщение литературных данных позволило заключить: митохондрии принципиально способны к самостоятельному существованию вне клетки. Новыми методами получен ряд экспериментальных свидетельств в пользу возможного превращения митохондрий *in vitro* в свободноживущие, размножающиеся путем деления, микроорганизмы. Высказана гипотеза о происхождении прокариот из эукариот.

Материалы работы направляются для публикации в журнал "Nature".

## ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДПОСЫЛКИ

Впервые мысль о том, что митохондрии являются автономными внутриклеточными самовоспроизводящимися структурами, высказал Альтман в 1890 г. /17/. Сегодня это положение подкрепляется многочисленными экспериментальными данными. Стало известно, что митохондрии не только содержат ДНК /12, 16/ и белоксинтезирующий аппарат /18/, но также способны синтезировать как *in vivo* /16/, так и *in vitro* белок /18/, РНК /28/, ДНК /41/. В настоящее время большое количество наблюдений подтверждает точку зрения, согласно которой воспроизведение митохондрий *in vivo* происходит путем их роста и деления /17, 18, 21, 36, 37/.

Выявление названных свойств у митохондрий (и хлоропластов /16, 19, 33/) позволило создать теорию последовательных эндосимбиозов /16/, согласно которой на ранних стадиях биологической эволюции свободноживущие бактерии проникли в протозукариоты и, став симбионтами, со временем превратились в митохондрии. Согласно этой теории бактерии-симбионты позже утратили часть функций, присущих свободноживущим прокариотам.

В настоящее время общепринято, что "поскольку условия, необходимые для роста митохондрий и их развития, исключительно сложны, еще далеко то время (если оно вообще наступит), когда митохондрии смогут расти *in vitro*" /16/. В силу отсутствия экспериментальных данных в литературе не обсуждается вопрос о превращении митохондрий в микроорганизмы /12, 15-18/.

В шестидесятые годы практически одновременно несколькими исследователями было обнаружено, что в клетках животного генетическая информация сосредоточена не в одной органелле, как считалось ранее, а в двух: ядре и митохондриях /22, 27, 38/. С тех пор огромное количество работ было посвящено изучению размера, структуры, свойств, локализации, генетической емкости митохондриальной ДНК (мхДНК) /12, 14, 16-19/.

Какова структура мхДНК? В препаратах мхДНК обнаруживают и кольцевые и линейные молекулы /23/. Но содержание линейных молекул мхДНК в препаратах митохондрий, лизированных осмоти-

ческим шоком, незначительно /39/, и, как показано в работе /45/, линейные молекулы не являются интермедиатами процесса репликации мхДНК. Эти данные позволили заключить, что мхДНК многоклеточных животных обладают кольцевым строением /18/. Контурная длина мономерной кольцевой молекулы мхДНК по данным электронной микроскопии равняется примерно 5 мкм в тканях человека, овцы, мыши, шпленка /24/, морского ежа /42/, дрожжи /43/, крысы /47/ и других животных. Молекулярный вес мхДНК различных животных составляет около 10 мегадальтон, содержит примерно 16000 пар оснований /12/, гены кодируют 2 рРНК, 22 тРНК, 13 полипептидов - субъединиц NADH-дегидрогеназы, цитохрома b, цитохромоксидазы, АТФазы /31 а/.

Продублирована ли генетическая информация, содержащаяся в мхДНК, в ядерном геноме, или она является уникальной? В силу экспериментальных трудностей однозначного ответа пока не получено, но в тех работах, где анализ гомологии ядерной ДНК и мхДНК был осуществлен с высокой тщательностью, получены данные, что ядерная копия мхДНК отсутствует, что мхДНК присутствует в клетке только в составе митохондрий, что митохондриальная генетическая информация не продублирована в ядерном геноме /12/.

Где осуществляется репликация мхДНК? Впервые молекулы мхДНК со структурой реплицирующихся форм были обнаружены с помощью электронной микроскопии в работе /33/, где исследованию подвергались очищенные препараты мхДНК, выделенные с помощью депротеинизации органическими растворителями. Частота встречаемости реплицирующихся форм была небольшой, но результат однозначно указывал на то, что репликация мхДНК происходит именно в митохондриях, но не в каких-либо других структурах клетки /12/. Этот вывод подтверждают и результаты по изучению репликации мхДНК в изолированных митохондриях, которые при инкубации включали меченые предшественники в мхДНК. Так, в одной из первых систем для изучения биосинтеза мхДНК в изолированных митохондриях печени крысы наблюдали линейное на протяжении 1-2 ч инкубации включение метки из дАТФ или дТТФ в мхДНК /41/. При этом показано, что синтез мхДНК в изолированных митохондриях печени крысы представляет собой полуконсервативную репликацию /32/. В работе /11/ показано, что репликация мхДНК *in vivo* в клетках *Nele* осуществляется в фазах S и G<sub>2</sub>, в то время как синтез ядерной ДНК осуществляется только в фазе S.

Вышеперечисленные результаты позволяют заключить, что митохондрии - единственные органеллы тканей многоклеточных животных, содержащие генетическую информацию, отличную от ядерной, способную к самовоспроизведению как в условиях *in vivo*, так и *in vitro*.

Кроме мхДНК, митохондрии содержат также ДНК-зависимую РНК-полимеразу, которая ингибируется актиномицином Д /14/. По-

казано, что актиномицин Д полностью подавляет синтез белка в выделенных митохондриях, т.е. в условиях, позволяющих этому антибиотику проникать через митохондриальные мембраны /14/. Отсюда следует, что митохондрии способны синтезировать информационную РНК на своей ДНК и что актиномицин Д, подавляющий синтез белка в выделенных митохондриях, останавливает этот процесс путем ингибирования синтеза информационной РНК.

Митохондрии содержат белоксинтезирующий аппарат (рибосомы и все виды РНК), отличный от такового в цитоплазме /30/. Рибосомы митохондрий в основном коэффициент седиментации 70S и состоят из двух субъединиц, 50S и 30S /14/. Миторибосомы отличаются от циторибосом по структуре, составу РНК и белков /16, 30, 34/, чувствительности к антибиотикам /25, 30/.

Открытие в изолированных митохондриях мхДНК, ДНК-полимеразы, ДНК-зависимой РНК-полимеразы, всех видов РНК, активирующих ферментов, рибосом, способности к включению аминокислот указывает на то, что митохондрии имеют автономный репликативный аппарат, транскрипционный, трансляционный /18/. Эти аппараты функционируют и в изолированных митохондриях: 1) метка из дАТФ и дТТФ включается в мхДНК линейно на протяжении 1-2 ч /41/; 2) количество РНК, синтезирующейся за 1 ч, составляет 0,2-0,5 пмоля/мг белка митохондрий при 30°C /12, 28/; 3) включение меченых аминокислот в митохондриальный белок продолжается не менее 1,5-2 ч /18/.

Итак, митохондрия - единственная органелла многоклеточных животных, имеющая функционирующий *in vitro* аппарат синтеза ДНК, РНК, белка.

#### Сходства митохондрий и бактерий.

1. Размер и форма. Митохондрии почти не отличаются от бактерий по размеру и форме /40/.

2. Механизм воспроизведения. Известно, что бактерии преимущественно воспроизводятся путем роста и деления. Большое количество наблюдений подтверждает точку зрения, согласно которой воспроизведение митохондрий *in vivo* происходит также путем их роста и деления /17, 18, 21, 36, 37/.

3. Мембраны. а) митохондрии и грамотрицательные бактерии имеют по две мембраны /19/; б) состав липидов в мембранах митохондрий и бактерий почти одинаков /18/; в) система пермеаз митохондрий сходна с аналогичной системой бактерий /18/; г) в митохондриях дрожжей наблюдали миелиновые образования /48/, которые напоминают бактериальные мезосомы /31/; д) дыхательные ансамбли в митохондриях и бактериях локализованы в мембранах /10, 33, 34/.

4. Рибосомы. а) коэффициенты седиментации рибосом и их субъединиц у бактерий и митохондрий одинаковы, 30S, 50S, 70S и отличаются от рибосом цитоплазматических, 40S, 60S, 80S /14/; б) чувствительность митохондриальных и (ЭУ) бактериальных ри-

босом к антибиотикам (циклогексимид, хлорамфеникол, тиострептин, анизомицин, тетрациклин, канамицин и др.) одинакова и прямо противоположна чувствительности к тем же антибиотикам рибосом цитоплазматических /16/.

5. РНК. Последовательности рибосомных РНК митохондрий более сходны с таковыми у бактерий, чем с последовательностями рРНК из цитоплазмы тех же клеток /16, 25/.

6. ДНК. а) ДНК митохондриальная и бактериальная (в отличие от ядерной) имеет кольцевое строение /18/; б) по частоте ближайших соседей и доле G-C мхДНК ближе к ДНК бактерий, чем к ядерной /26/; в) как и в случае бактерий, мхДНК синтезируется в ходе жизненного цикла клетки и поровну распределяется между дочерними митохондриями /44/; г) у митохондрий и бактерий один и тот же механизм репликации ДНК – полуконсервативный /18/; д) мхДНК в эволюционном отношении гораздо ближе к бактериальной ДНК, чем к ядерной ДНК высших организмов /26/.

Таким образом, морфология, механизм воспроизведения, состав и свойства мембран, рибосом, нуклеиновых кислот у митохондрий и бактерий имеют хорошо выраженные черты сходства.

Общие выводы. Митохондрии, имеющие функционирующий *in vitro* аппарат синтеза ДНК, РНК, белка, принципиально способны к самостоятельному существованию вне клетки. Митохондрии – единственные органеллы многоклеточных животных, обладающие такой способностью. В случае реализации этой способности, следует ожидать, что митохондрии превратятся в микроорганизмы, имеющие существенные сходства с бактериями.

## НОВЫЕ МЕТОДЫ

Новые методы позволяют не только ставить новые задачи, но и "старые" решать по-новому. Сколько митохондрий в данной клетке? Какова геометрия этих органелл в клетках интактных? Что обуславливает гетерогенность митохондрий в одной и той же клетке? Как выявить локализацию дыхательных ансамблей в данной бактерии? Как изменяется ферментативный состав бактерий при выращивании в иных условиях? Что произойдет с ферментом после воздействия на него – изменится количество или качество функционирующих молекул? Эти вопросы, нашедшие свои решения в той или иной степени завершенности на страницах книги /1/, являют собой примеры из множества задач, связанных с изучением ферментов, митохондрий, бактерий, которые могут быть решены с помощью двух новых методов /1, 7, 20/, подробно описанных в первых главах /1/ и частично в /7, 20/. Оба метода основаны на применении одного и того же красителя п-НТФ (пара-нитротетразолий фиолетовый). Изучение многих физических и химических свойств п-НТФ, в число которых входят свойства, связанные с восстановлением п-НТФ субстратами, кофакторами, другими компонентами клетки, с местом отложения окрашенного продукта редокс реакции (восстановленной формы п-НТФ),

позволило достаточно достоверно интерпретировать полученные результаты.

Биохимический метод /1, 20/ предназначен для определения активностей сотен ферментов класса оксидоредуктаз. Известно большое количество тетразолиевых методов, с помощью которых определяют активность той или иной редуктазы. Все они, в отличие от предлагаемого, практически непригодны для решения энзимологических задач и, судя по отсутствию литературных данных, не нашли приложения в энзимологии при изучении каталитических свойств ферментов. На примере сукцинатдегидрогеназы /3/ показана возможность использования предлагаемого биохимического метода для изучения каталитических свойств любого фермента из класса оксидоредуктаз. Второй важной характеристикой метода является его пригодность для последовательного определения активностей ряда ферментов в одном препарате /6/. К примеру, в одном мазке из суспензии митохондрий последовательно определили активности 12 ферментов. К третьей характеристике биохимического метода /1/ относится разнообразие используемых в нем препаратов: суспензия бактерий живых или фиксированных; мазок из митохондрий, гомогената или цельной ткани; монослой культуры клеток эукариотов. В качестве автоматического регистратора скорости редокс реакций использовали фотоэлектроколориметр /1, 8/.

Светомикроскопический метод /1, 7/, как и метод биохимический /1, 20/, основан на применении п-НТФ. Однако, в отличие от биохимического, в этом методе определяют не активность редуктаз, а, пользуясь этой активностью, окрашивают (и выявляют с помощью светового микроскопа) в клетках эукариотов строго специфически только митохондрии /1, 2, 4, 7/, а в клетках прокариотов "дыхательные бляшки" /1/ – места локализации дыхательных ансамблей в мембранах бактерий. В книге /1/ рассмотрены свойства известных сегодня витальных красителей митохондрий – януса зеленого и родамина 123, высказано критическое к ним отношение. Показаны условия окрашивания с помощью п-НТФ митохондрий в суспензии этих органелл, в монослое и суспензии клеток, прижизненно и после фиксации, в клетках животного и растения. Описана ячейка, в которой выращивали клетки монослойной культуры, окрашивали в них митохондрии и в течение нескольких суток наблюдали в световом микроскопе за поведением и развитием отдельных митохондрий в одной и той же клетке. Ячейка оказалась полезной при наблюдении за отдельными бактериями с окрашенными при помощи п-НТФ дыхательными бляшками. При первом же взгляде на совокупность окрашенных бактерий одного клона, одного посева невольно приходит сравнение: бактерии, как и люди, все разные.

В главе 3 /1/ показано применение биохимического метода /1, 20/ с целью выявить изменение количества или качества митохондрий в любом органе животного после воздействия на организм. Непосредственно в ткани митохондрии исследуют, в основном, элект-

ронно-микроскопически или гистохимически, с помощью чего невозможно судить об изменениях ферментативного состава, метаболизма, функций органелл. В сегодняшних биохимических исследованиях митохондрии выступают как объект исследования сам по себе, в отрыве от валового количественного и качественного их представления в целой ткани. Совмещение обоих подходов, биохимического и электронно-микроскопического, значительно удлинит бы и усложнит эксперимент. В главе представлен биохимический способ, нацеленный на решение задачи по выявлению изменений, происшедших с митохондриями данной ткани в целом, после воздействия на организм. Идея способа заключается в следующем. На животное оказывают воздействие. Как изменится в результате этого воздействия количество или качество митохондрий в данной ткани? Для ответа на вопрос выполняют три опыта. 1-й опыт. В одинаковых условиях определяют удельную активность маркерного митохондриального фермента (СДГ) в стандартно приготовленных гомогенатах ткани контрольного и опытного животного. 2-й опыт. В приготовленных из этих гомогенатов препаратах измеряют относительную активность СДГ в двух специальным образом приготовленных средах для сравнения каталитических свойств СДГ в опытном препарате относительно контрольного. 3-й опыт. Последовательно находят относительные активности 10-20 митохондриальных ферментов в гомогенатах контрольного и опытного животных. По результатам этих трех опытов, которые практически осуществляют за 1,5-2 ч биохимическим методом /1, 20/, получают ответ об изменении количества и качества митохондрий в исследуемой ткани животного после оказанного на него воздействия. Описанный способ использовали при выявлении изменений, происшедших в митохондриях печени крысы. Показали, что в результате внутрибрюшинного введения животному гидрокортизона количество митохондрий в печени увеличилось на треть, при этом качество органелл осталось неизменным.

В главе 4 /1/ описаны результаты, полученные с помощью светомикроскопического метода /1, 7/. В клетках монослойной культуры удалось при помощи п-НТФ выявить две группы митохондрий, названные по одному из ряда обнаруженных отличительному признаку, "малые" и "большие" /1, 4/. Оказалось, что большие митохондрии в интактных клетках появляются, развиваются и исчезают группами, волнообразно сменяя одна другую, но так, что в любой момент в каждой клетке присутствуют и "большие" и "малые" митохондрии. Исчезая, большие митохондрии превращаются в иные внутриклеточные структуры, названные "постмитохондриями" /4/. Свое название постмитохондрии получили по причинам происхождения из митохондрий и потери двух основных функций митохондриальных - дыхания и фосфорилирования. Появление, развитие и полное физическое исчезновение постмитохондрий также происходит группами, волнообразно - одно поколение следует за другим. *In vitro* никаким способом не удалось "заставить" митохондрии превратиться

в постмитохондрии. Спектрофотометрический и биохимический анализ чистой фракции постмитохондрий, полученной из печени животного, указал на ряд сходных и различных характеристик этих органелл с митохондриями. Против предположения о тривиальном "отмирании" митохондрий, следующему по стадиям развития постмитохондрий, свидетельствует факт полного отсутствия постмитохондрий в почках, мозге, сердце и большого их количества в печени, легком, надпочечнике. Важность дальнейшего изучения постмитохондрий подчеркивается также их присутствием в раковых клетках асцита Эрлиха, асцита Зайделя, Raji.

Глава 5 /1/ посвящена применению и биохимического и светомикроскопического метода для изучения бактерий. Вопросы, связанные с: 1) проницаемостью вещества внутрь интактной бактерии; 2) воздействием экзогенной добавки на метаболизм клеток; 3) с целостностью бактериальных мембран и 4) отличием в суспензии клеток живых от погибших, решаются путем исследования живых бактерий с помощью п-НТФ. Второй подход, основанный также на использовании биохимического метода /1/, позволяет в бактериях фиксированных последовательно определять активности ряда ферментов, изучать изменение метаболизма в целом. Третий подход, светомикроскопический /1/, путем длительного наблюдения за отдельной, окрашенной с помощью п-НТФ, бактерией, позволил в буквальном смысле очевидно установить ряд закономерностей, связанных с появлением новой для данной клетки совокупности дыхательных ансамблей - дыхательной бляшки. Этот подход убедил в том, что новая дыхательная бляшка происходит не путем деления старой, а *de novo*, что она может сформироваться как до, так и после деления клетки.

Ниже представлены результаты, полученные биохимическим и светомикроскопическим методами /1, 7, 20/ при длительном исследовании митохондрий в различных условиях *in vitro*.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СВИДЕТЕЛЬСТВА

Суспензию митохондрий из печени крысы получали стандартным методом центрифугирования /46/, содержание митохондриального белка в суспензии определяли по Лоури /35/. С целью идентификации в световом микроскопе органеллы окрашивали с помощью строго специфического прижизненного красителя митохондрий, п-нитротетразолия фиолетового п-НТФ /1, 2, 4, 7/. Наблюдения осуществляли в темном поле микроскопа в ячейках, специально сконструированных для длительного прижизненного изучения отдельных митохондрий в интактных клетках монослойной культуры /1/. Активность маркерных митохондриальных ферментов определяли с помощью п-НТФ в кюветах фотоэлектроколориметра, использованного на основе разработанной теории в качестве прибора, позволяющего непрерывно регистрировать секундные, минутные и часовые кинетики цветных реакций /1, 8/.

Идентификацию митохондрий с помощью светового микроскопа осуществляли следующим образом. В среду С (сахароза 200 мМ, трис 30 мМ, рН 7,4) вносили митохондрии, инкубировали в кювете фотоэлектроколориметра с длиной оптического пути  $l=0,5$  см и регистрировали изменение величины оптической плотности  $D$  при  $\lambda = 510$  нм (максимум поглощения восстановленной формы п-НТФ /20/). Через 10 мин инкубации, необходимые для утилизации эндогенных субстратов, в кювету вносили п-НТФ. При этом восстановление п-НТФ отсутствовало, что свидетельствовало об отсутствии эндогенных субстратов. После внесения в кювету субстрата маркерного митохондриального фермента (сукцината,  $\beta$ -оксибутирата и т.д.) начиналась окислительно-восстановительная реакция, в ходе которой субстрат окислялся маркерным для митохондрий ферментом, а п-НТФ восстанавливался и отлагался тут же в месте восстановления - в мембранах митохондрий /7, 20/. Окрашенные митохондрии микроскопировали в ячейках в режиме темного поля. На рис. 1 представлены фотографии митохондрий описанного опыта до (а)

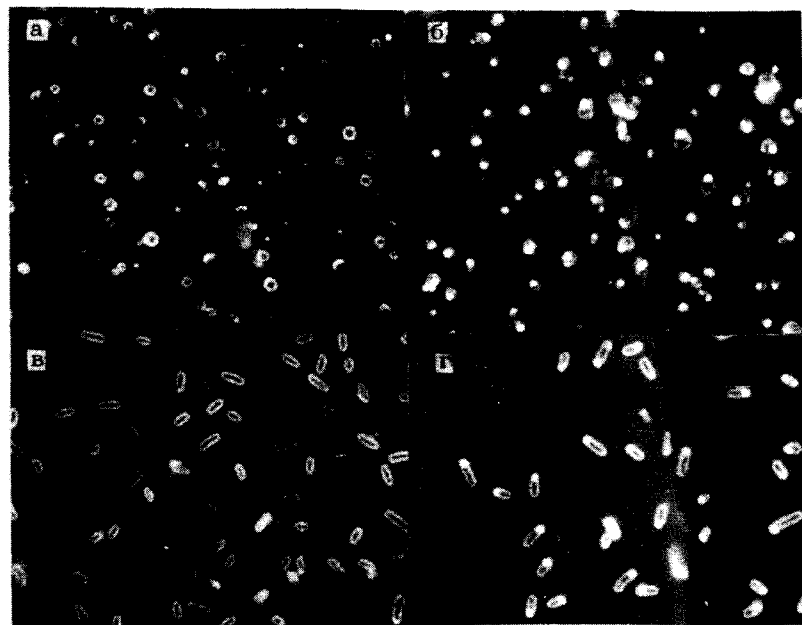


Рис. 1. Окрашивание митохондрий и микроорганизмов с помощью п-НТФ /1, 7/. а, б - Митохондрии печени крысы в темном поле светового микроскопа; а - intactные, б - окрашенные, в, г - Микроорганизмы в темном поле светового микроскопа; в - intactные, г - окрашенные. Увеличение а-г х 400

10

и после (б) введения в среду инкубации сукцината и п-НТФ. Видно, что неокрашенные митохондрии представляются белыми кольцами диаметром 0,5-2 мкм. В окрашенных митохондриях появляются яркие красные точки в темном поле (фиолетовые в проходящем свете) - на фото рис. 1,б белые точки в кольцах. В работах /1, 2, 7/ доказано, что краситель п-НТФ в тканях животного с помощью светового микроскопа выявляет только митохондрии.

В качестве дополнительных тестов при идентификации митохондрий были выполнены следующие. 1. Полярграфические измерения скоростей поглощения  $O_2$  в среде, содержащей выделенные митохондрии, сукцинат и АДФ показали, что дыхательный контроль на сукцинате равен 4:5, что указывает на intactное состояние митохондрий в суспензии. 2. Биохимические измерения скоростей окисления экзогенных субстратов маркерными митохондриальными ферментами на мазках, приготовленных из суспензии митохондрий, изучение каталитических характеристик этих ферментов с помощью п-НТФ /1, 3, 6, 20/ показало сходство этих характеристик с литературными данными, что указывает на хорошее состояние маркерных ферментов в митохондриях суспензии. 3. Измерение количества митохондрий, содержащихся в одном миллиграмме митохондриального белка, оказалось равным в разных опытах  $1-9 \cdot 10^9$  штук /1/. Количество митохондрий в миллиграмме белка, определенное электронно-микроскопически, равно  $4 \cdot 10^9$  шт /29/.

Общим выводом, вытекающим из всех опытов по идентификации митохондрий, является утверждение, что белые кольца, видимые в темном поле светового микроскопа (рис. 1,а), являются митохондриями.

Идентификацию микроорганизмов также осуществляли с помощью темнопольного микроскопирования, окрашивания в среде, содержащей п-НТФ, описанной ячейки и регистрации совокупной редокс реакции с п-НТФ в качестве конечного акцептора электронов /1/. На рис. 1 представлены микроорганизмы, видимые в темном поле микроскопа: в - неокрашенные, г - окрашенные с помощью п-НТФ. Каждый микроорганизм, как и каждая митохондрия, имеет по одной (в абсолютном большинстве) окрашенной грануле.

Отличительные характеристики митохондрий и микроорганизмов, выявленные светомикроскопическим методом /1, 7/, представлены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1

Отличия	Митохондрии	Микроорганизмы
1. Форма	круглая	эллипсоидальная
2. Размер	0,5-2 мкм	2-6 мкм
3. Подвижность	неподвижны	$v \approx 30$ мкм/с
4. Вид неокрашенных окрашенных	○ ●	○ ○

Изменение суммарного количества митохондрий и микроорганизмов в пробе опыта определяли по изменению оптической плотности  $D$  на  $\lambda=510$  нм, без п-НТФ, в кювете с длиной оптического пути  $l=0,5$  см, а также по изменению объема осадка после центрифугирования пробы в режиме  $4000 \text{ g} - 10$  мин.

Изменение относительного количества митохондрий и микроорганизмов в пробе (в %) определяли с помощью микроскопирования тщательно перемешанного образца. При этом суммарное количество структур в поле зрения колебалось от 100 до 200.

Количество митохондрий и микроорганизмов в единице объема пробы или на единицу "мг мх белка" находили путем внесения в ячейку 0,17 мл пробы, осаждения объектов в ячейке высотой 1 мм, обездвиживания микроорганизмов изменением значения pH до величины 5,0 и подсчета в единице объема, параметры которого измеряли с помощью прокалиброванной шкалы.

С целью адекватного восприятия и сокращения изложения введем несколько определений:

1. Стоппер - химический или физический агент, полностью, но обратимо, останавливающий превращение митохондрий в микроорганизмы на неопределенно большой срок ( $\geq$  месяц).

2. Антистоппер - химический или физический агент, снимающий функцию стоппера.

3. Среда хранения - среда, пребывая в которой митохондрии сохраняют способность превратиться в микроорганизмы неопределенно долго ( $\geq$  месяц).

4. Среда превращения - среда, в которой митохондрии превращаются в микроорганизмы, но микроорганизмы не размножаются.

5. Среда размножения - среда, в которой митохондрии превращаются в микроорганизмы и микроорганизмы размножаются.

Приготовление рабочего места к началу каждого опыта предусматривало влажную приборку, протирание стола этанолом, покрытие его фильтровальной бумагой, обработку хромпиком ячеек, пенфлаконов, резиновых пробок для них, носиков для микропипеток, отмывку pH-электродов этанолом.

Опыт первый. В пять пенфлаконов емкостью 15 мл внесли по 5 мл среды А (трис 10 мМ, pH 7,4) и митохондрии печени крысы в количестве, эквивалентном  $D=0,01$ . В пробы 3-5 ввели добавки: сахара 20 мМ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  20 мМ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  20 мМ,  $\text{MgSO}_4$  3 мМ, pH 7,4 (среда Б). В пробы 2 и 4 ввели по 2 мМ ЭДТА до внесения компонентов, превращающих среду А в среду Б. Все пять проб в момент  $t_0$  поставили в суховоздушный термостат  $37^\circ\text{C}$ . Через сутки, в момент  $t_1$ , в пробках 1-5 измерили значения оптической плотности  $D$  в кювете с длиной оптического пути  $l=0,5$  см при  $\lambda=510$  нм, определили наличие митохондрий и микроорганизмов, в пробу 5 ввели 2 мМ ЭДТА, и затем все пробы снова поставили в термостат  $37^\circ\text{C}$ . Примерно через 40 ч от начала инкубации, в момент  $t_2$ , измерили значения  $D$ . Результаты измерений и наблюдений представлены в табл. 2.

12

Инкубация митохондрий в разных условиях

Таблица 2

№ пробы	$t_0 = 0$ ч			$t_1 = 24$ ч			$t_2 = 40$ ч		
	Среда	Наличие в пробе МХ МО	Внесение в пробу СТ	Оптич. плот. пробы	Наличие в пробе МХ МО	Внесение в пробу СТ	Оптич. плот. пробы	Размножение МО	
									Оптич. плот. пробы
1.	А	+	-	0,01	+	-	0,01	-	
2.	А	+	+	0,01	+	-	0,01	+	
3.	Б	+	-	0,01	+	-	0,80	+	
4.	Б	+	+	0,01	+	-	0,01	+	
5.	Б	+	-	0,01	+	+	0,80	+	

МХ - митохондрии, МО - микроорганизмы, СТ - стоппер, ЭДТА 2 мМ. Среда А -  $\text{H}_2\text{O}$ , трис 10 мМ, pH 7,4. Среда Б -  $\text{H}_2\text{O}$ , сахара 20 мМ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  20 мМ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  20 мМ,  $\text{MgSO}_4$  3 мМ, pH 7,4.

В пробе 1 (табл. 2) в момент  $t_0$  митохондрии были обнаружены, а микроорганизмы не были, в момент  $t_1$ , наоборот, митохондрии не были обнаружены, а микроорганизмы были, в момент  $t_2$  значение оптической плотности  $D$  практически не изменилось. Из этого результата следует, что в среде А на смену митохондриям пришли микроорганизмы, которые в этой среде не размножаются. Для большей убедительности того, что в среде А (трис 10 мМ, pH 7,4) микроорганизмы не размножаются, в три пенфлакона со средой А были введены микроорганизмы из предшествующего опыта в количестве эквивалентном  $D=0,01$ , другие три пенфлакона со средой А были открыты в течение 1 ч на рабочем месте. В первых трех пенфлаконах через 5 дней количество микроорганизмов сохранилось равным исходному, т.к. значение  $D$  осталось неизменным и равным 0,01. В других трех пенфлаконах микроорганизмы совсем не появились. Итак, в среде А микроорганизмы не размножаются.

Исчезновение в пробе митохондрий и появление в ней микроорганизмов возможно одним из двух путей:

либо размножением бактерий (спор):

- а) извне внесенных в пробу;
  - б) внесенных в пробу вместе с митохондриями; появившихся в суспензии митохондрий в ходе выделения;
- либо превращением митохондрий по любому механизму, например:

- в) митохондрии  $\xrightarrow{\text{перестройка}}$  микроорганизмы;
- г) митохондрии  $\xrightarrow{\text{распад}}$  части  $\xrightarrow{\text{сборка}}$  микроорганизмы.

При этом в альтернативе "превращением митохондрий" предусматривается возможность участия в механизмах в) и г) иных (помимо митохондрий) компонентов, присутствующих в суспензии митохондрий, если таковые имеются в тканях интактного организма.

Итак, независимо от конкретного механизма (в, г или иного), поиск которого не входит в задачу данного исследования, появление микроорганизмов в пробах возможно либо размножением бактерий (спор), внесенных извне, либо превращением в них митохондрий.

Так как в среде А микроорганизмы не размножаются, и в пробе 1 (табл. 2) в момент  $t_1$  вместо митохондрий появились микроорганизмы при сохранившемся общем количестве структур практически неизменным ( $D_{t_0} = 0,01$ ;  $D_{t_2} = 0,02$ ), то отсюда следует, что

1) в пробе 1 микроорганизмы появились в результате превращения в них митохондрий; 2) среда А - среда превращения.

В пробе 3 (табл. 2) микроорганизмы, появившиеся в  $t_1$ , к моменту  $t_2$  размножились, изменив значение оптической плотности Д до величины 0,8. Отсюда следует, что среда Б - среда размножения.

Внесение в начальный момент  $t_0$  ЭДТА в среду А пробы 2 (табл. 2) или в среду Б пробы 4 блокировало превращение митохондрий в микроорганизмы. В то же время, внесение ЭДТА в пробу после того, как в ней микроорганизмы появились, в момент  $t_1$  размножение микроорганизмов не предотвратило, т.к. значение оптической плотности в момент  $t_2$ , равное 0,8, стало таким же, как и в пробе 3, в которую ЭДТА не вводили. В пробе 2 микроорганизмы не появились и через месяц, но после введения в пробу 2 СаС1<sub>2</sub> 5 мМ, через сутки в ней исчезли митохондрии и появились микроорганизмы. Таким образом, ЭДТА - стоппер, среда А+ЭДТА - среда хранения.

- Выводы из опыта 1.
1. Появление микроорганизмов в средах А и Б произошло благодаря превращению в них митохондрий.
  2. Среда А - среда превращения. 3. Среда Б - среда размножения.
  4. ЭДТА - стоппер. 5. Среда А+ЭДТА - среда хранения.

Опыт второй. В десять пенфлаконов объемом 15 мл ввели по 5 мл среды А, в семь из них добавили митохондрий в количестве, соответствующему  $D=0,01$ . Десять других пенфлаконов приготовили также, но со средой В (рис. 3). Все 20 проб поставили на инкубацию при 37°C. Через каждые 4 ч отбирали по одному пенфлакону с ми-

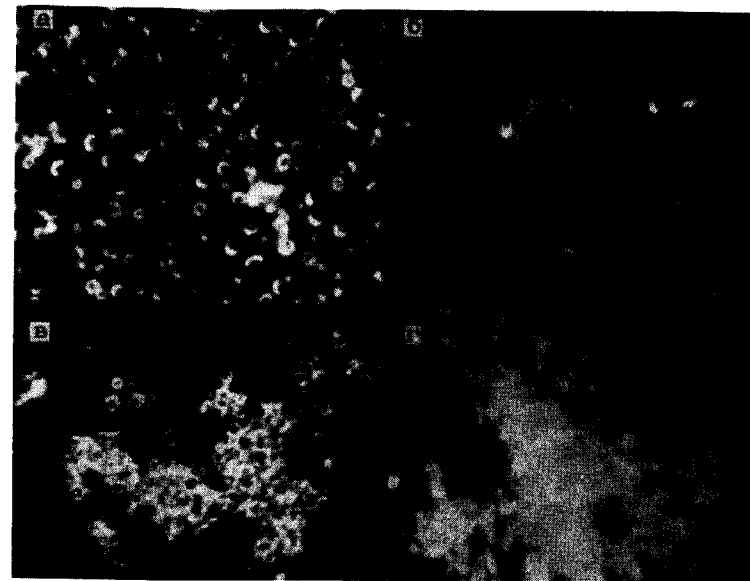


Рис. 2. Изменения, происходящие с митохондриями, инкубированными в пробах со средой А в опыте 2 (см. текст). а - 0 ч, б - 30 ч, в - 12 ч, г - 16-20 ч от начала инкубации. Увеличение а-г х400

тохондриями в среде А и В, оставляя остальные в прежних условиях. Шесть проб без митохондрий (три со средой А, три со средой В) анализировали одновременно в конце опыта. В отобранных пробах измеряли значения оптической плотности Д, рН и микро-скопировали. Результаты измерений и фотографии представлены на рис. 2 и 3.

Из рис. 3, а (точка К<sub>В</sub>) видно, что в конце опыта в трех контрольных пробах со средой В (среда размножения) значение оптической плотности Д равно 0,01. Это означает, что в условиях опыта заражение проб бактериями (спорами) извне не происходит.

Из рис. 2, в видно, что через 12 ч инкубации в пробах А (также и в В) микроорганизмов нет, митохондрии собраны кучками, через несколько часов в кучках одновременно взрывным характером исчезают митохондрии и появляются неподвижные при рН=7,4 (рис. 2, г, экспозиция 10 с) микроорганизмы длиной 2-10 мкм. Через несколько часов микроорганизмы обретают подвижность, большие делются, отходят от куч и, самостоятельно передвигаясь со скоростью около 30 мкм/с, равномерно заполняют пространство. На рис. 2, б показаны микроорганизмы через 30 ч инкубации, при этом обездвиживание (обратимое) осуществляли путем изменения рН среды до величины 5,0. Полное отсутствие в среде В микроорганизмов в



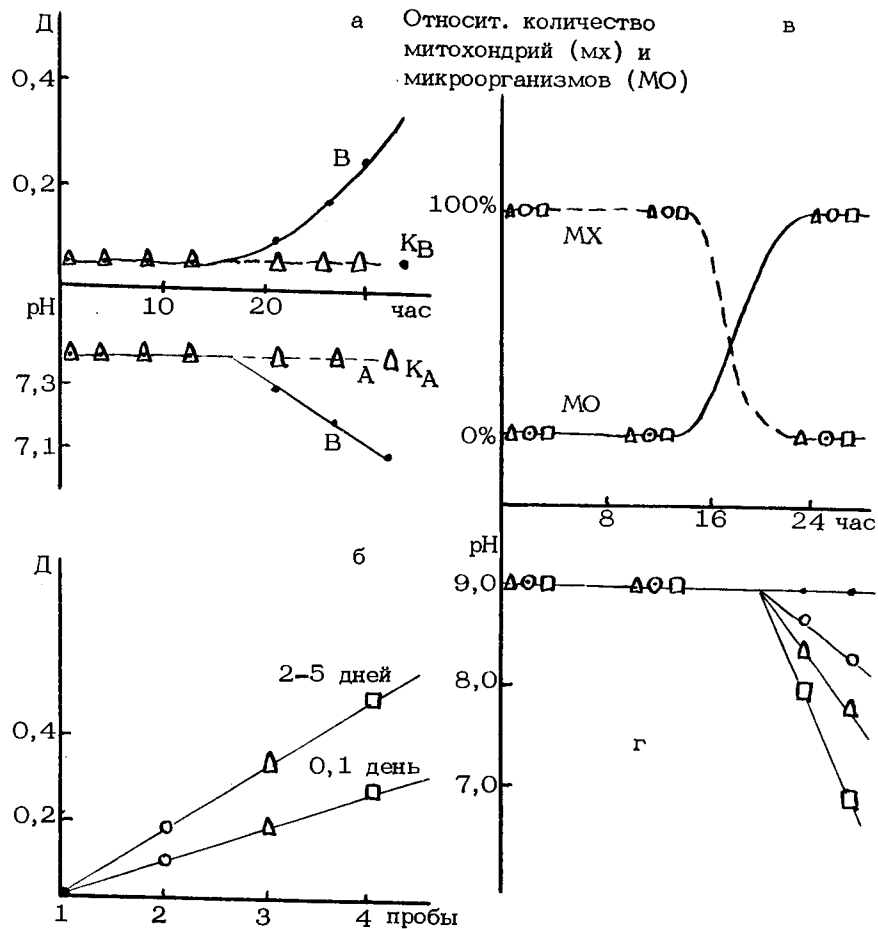


Рис. 3. Изменение значений  $D$ ,  $pH$  и относительного количества митохондрий и микроорганизмов в опытах 2 и 3 (см. текст). а - Опыт 2; ( $\Delta$ ) - среда А (трис 10 мМ,  $pH$  7,4), ( $\bullet$ ) - среда В (сахароза 200 мМ,  $KH_2PO_4$  20 мМ,  $NH_4Cl$  20 мМ,  $MgSO_4$  3 мМ,  $pH$  7,4). б, в, г - Опыт 3; среда С (сахароза 200 мМ, трис 30 мМ,  $pH$  7,4). Пробы: 1 - ( $\bullet$ ), 2 - ( $\circ$ ), 3 - ( $\Delta$ ), 4 - ( $\square$ )

период 0-12 ч инкубации, взрывной характер появления их, а также 4-часовая кинетика удвоения (рис. 3,а) однозначно свидетельствуют в пользу того, что микроорганизмы в пробках В появились не в результате заражения проб извне, а, следовательно, (всего две альтернативы) в результате превращения в них митохондрий.

В среде А (среда превращения) значение оптической плотности в 0 ч и через 30 ч инкубации равно примерно 0,01. Следовательно, количество структур в пробе (в 0 ч - митохондрии, в 30 ч - микроорганизмы) сохранилось примерно одинаковым. Об этом свидетельствуют фотографии на рис. 2а,б. Это означает, что независимо от механизма превращения, в конце концов, каждая митохондрия превратилась в микроорганизм.

Поскольку в среде А (трис 10 мМ,  $pH$  7,4) нет компонентов, которые могли бы быть утилизированы митохондриями или микроорганизмами, то это означает, что появление микроорганизмов в среде А осуществляется полностью и только за счет компонентов, содержащихся в митохондриях. О сохранении количества трис в конце опыта судили по неизменности буферной емкости среды А, путем титрования ее с помощью  $HCl$  и  $KOH$ .

Выводы из опыта 2. Микроорганизмы в средах А и В появляются в результате превращения в них митохондрий. Практически каждая митохондрия превращается в микроорганизм. В среде А микроорганизмы появляются только за счет компонентов митохондрий.

Опыт третий. В этом опыте использовали среду С (сахароза 200 мМ, трис 30 мМ,  $pH$  7,4), содержащую один компонент (сахароза), утилизируемый микроорганизмами. Скорость утилизации регистрировали по скорости изменения значения  $pH$  в пробе. В среде С готовили четыре пробы с различным количеством митохондрий: в пробу 1 митохондрий не вводили, в пробках 1-4 количество митохондрий отражалось значением оптической плотности  $D$  (рис. 3,б). Инкубацию осуществляли одновременно всех проб при  $37^\circ C$ . Измеряли значения оптической плотности  $D$ ,  $pH$ , а также относительное количество митохондрий и микроорганизмов в поле зрения микроскопа, при этом суммарное количество структур варьировало от 100 до 200.

Из рис. 3 видно, что независимо от исходной концентрации митохондрий в пробе все измеренные параметры изменялись аналогично. А именно, доля микроорганизмов до 12 ч инкубации во всех пробках сохранялась равной 0% (рис. 3,в), далее она увеличивалась, а доля митохондрий реципрокно уменьшалась. Независимо от исходной концентрации митохондрий, закисление среды стало происходить после 16 ч (рис. 3,г), т.е. после того, как в пробках появились микроорганизмы.

Полное отсутствие микроорганизмов в пробках 1-4 до 12 ч (рис. 3,в), несмотря на относительно высокое исходное содержание в них митохондрий (в пробе 4  $D=0,30$ , в пробках опытов 1 и 2  $D=0,01$ ), а также на отсутствие закисления в первые 16 ч

(рис. 3, г), говорит об отсутствии микроорганизмов в момент  $t_0$  в пробах ни в результате заражения извне, ни в результате внесения микроорганизмов с нативными митохондриями. Следовательно, появление микроорганизмов в пробах 1-4 было осуществлено благодаря превращению в них митохондрий.

Из данных рис. 3б, в, г следует, что среда С — среда превращения, т.к. в ней митохондрии превращаются в микроорганизмы, но последние не размножаются.

Поскольку суммарное количество митохондрий и микроорганизмов в пробах практически не изменяется в период 12-24 ч (рис. 3,б), а доля митохондрий и микроорганизмов реципрокно меняется практически от 0 до 100% (в среде, где микроорганизмы не способны размножаться), то это означает, что микроорганизмы появились в результате превращения в них митохондрий.

Выводы из опыта 3. Появление микроорганизмов в среде С осуществляется благодаря превращению в них митохондрий. Среда С — среда превращения.

Опыт четвертый. В опытах 1 и 2 исходное содержание в пробах митохондрий соответствовало значению оптической плотности  $D=0,01$ , в опыте 3 значения  $D$  были много больше  $0,01$ , в опыте 4 значения  $D$  много меньше  $0,01$ . В опыте 4 в среде С готовили четыре пробы так, чтобы в пробе 1 содержание митохондрий соответствовало значению  $D=0,01$ , во второй пробе в 10 раз, в третьей в 100, в четвертой в 1000 раз меньше, чем в первой. Все пробы одновременно поставили на инкубацию при  $37^\circ\text{C}$ .

В начальный момент общее содержание митохондрий в пробе 1 было пропорционально количеству митохондрий, представленному на рис. 2,а (как в опыте 2, где исходно количество митохондрий было пропорционально  $D=0,01$ ), в пробе 2 — пропорционально количеству митохондрий на рис. 1,а. В пробе 3, количество митохондрий, видимое в таком же поле при том же увеличении микроскопа, было равно около 10 шт. митохондрий, а в пробе 4 — от 0 до 2 штук. Через 30 ч количество микроорганизмов в пробах 1-4, появившихся в среде С, в которой они не способны размножаться, было пропорционально исходному количеству митохондрий, а именно, в пробе 1, как на рис. 2,а и 2,б ( $D=0,01$ ), в пробе 2, как на рис. 1,а и 1,в ( $D=0,001$ ). В пробе 3 количество микроорганизмов было на порядок меньше, чем в пробе 2 (около 10 штук микроорганизмов в поле зрения, а в пробе 4 от 0 до 2 штук микроорганизмов в поле).

Таким образом, количество микроорганизмов, появившееся в среде превращения С, т.е. в среде, где микроорганизмы не способны размножаться, пропорционально исходному количеству митохондрий и отношение появившихся в пробах микроорганизмов к исходному количеству в них митохондрий равно примерно единице. Такой результат возможен только в случае превращения митохондрий в микроорганизмы.

Предположим, что среда С (сахароза 200 мМ, трис 30 мМ, рН 7,4), являющаяся сама по себе средой превращения, становится средой размножения после внесения в нее митохондрий тут же или спустя некоторое время, необходимое для предполагаемого автолиза митохондрий, в результате которого среда С предположительно станет средой размножения и бактерии, исходно извне попавшие в нее, размножатся. Есть ряд возражений против этого предположения.

Возражение первое. Во всех пробах 1-4 опыта 4 с помощью витального красителя бактерий и микроорганизмов п-НТФ не удалось обнаружить ни одной бактерии в ячейках, содержащих по 0,17 мл соответствующих проб ни в 0 ч, ни через 4 ч, ни через 8 ч, ни через 12 ч после начала опыта.

Возражение второе. Через 16-20 ч после начала инкубации в пробах, примерно к 18-му ч появляется сразу большое количество (после полного отсутствия к 12 ч) микроорганизмов.

Возражение третье. Появившиеся к 18 ч микроорганизмы еще не оформлены и неподвижны в течение нескольких часов. Далее они все становятся подвижными.

Возражение четвертое. Начало закисления среды, вызванное метаболизмом микроорганизмов, зарегистрировано лишь к 18 ч инкубации. Этот момент соответствует времени появления микроорганизмов. До этого времени значение рН сохранялось строго равным исходному.

Возражение пятое. С целью выяснения условия, при котором среда превращения становится средой размножения, выполнен дополнительный эксперимент. В 12 пенфлаконов объемом по 15 мл, содержащих по 5 мл дистиллированной воды, были внесены соответствующие номерам проб добавки в миллимолях конечной концентрации и митохондрии в количестве, соответствующем  $D=0,1$  (табл. 3). Значение рН во всех пробах было равным 7,8, в первой пробе (только  $\text{H}_2\text{O}$ ) это значение было достигнуто внесением КОН. После 2 дней инкубации при  $37^\circ\text{C}$  убедились в том, что в каждой пробе 1-12 митохондрии исчезли, микроорганизмы появились, а также измерили значения  $D$  (табл. 3). Из этих данных следует, что только среды в пробах 9-11 являются средами размножения. Все же остальные (1-8, 13) — среды превращения. Это означает, что даже при одновременной экзогенной добавке по 20 мМ сахарозы и хлористого аммония (проба № 6, табл. 3), а также всех тех компонентов, которые содержат в себе вносимые в пробу митохондрии в количестве, эквивалентном  $D=0,1$ , среда превращения не становится средой размножения. И, следовательно, среда С, содержащая митохондрии в количестве пропорциональном  $D=0,01$  (опыт четвертый) тем более не является средой размножения. Значит, появление микроорганизмов в среде С возможно лишь в результате превращения в них митохондрий.

Возражение шестое. Количество микроорганизмов, появляющихся примерно через сутки в средах превращения, пропорционально ис-

ходному количеству митохондрий в этих средах. Эта пропорциональность соблюдается в широком диапазоне исходной концентрации митохондрий, характеризуемой значениями  $D$  от 0,3 до  $10^{-5}$  (опыты третий и четвертый). И так как коэффициент пропорциональности равен примерно единице, то это возможно лишь в случае превращения митохондрий в микроорганизмы.

Выводы из опыта 4. В среде С количество появившихся микроорганизмов пропорционально исходному количеству митохондрий.

Т а б л и ц а 3

Инкубация митохондрий в различных средах превращения и размножения

№ пробы	Добавки в мМ конечной концентрации					Оптическая плотность пробы через 2 дня $D(\pm 0,03)$	Среды превращения (пр.) и размножения (раз.)
	сахароза	$NH_4Cl$	$KH_2PO_4$	$MgSO_4$	трис		
1	-	-	-	-	-	0,2	пр.
2	-	-	-	-	1	0,2	пр.
3	-	-	-	-	10	0,2	пр.
4	-	-	-	-	100	0,2	пр.
5	200	-	-	-	100	0,2	пр.
6	20	20	-	-	100	0,2	пр.
7	-	20	20	1	100	0,2	пр.
8	20	-	20	1	100	0,2	пр.
9	20	20	20	1	100	1,0	раз.
10	40	40	40	1	100	1,3	раз.
11	2	2	2	0,1	100	0,4	раз.
12	0,2	0,2	0,2	0,01	100	0,2	пр.

Все добавки вносили в дистиллированную воду. Во все пробы исходно ввели одинаковое количество митохондрий ( $D=0,1$ ).

Внесение митохондрий в среду превращения С не обращает ее в среду размножения. Микроорганизмы появляются в среде С благодаря превращению в них митохондрий.

Опыт пятый. В 120 мл дистиллированной воды внесли 12 мМ  $NaHCO_3$  и 120 мкл густой суспензии (60-80 мг мх белка/мл) митохондрий печени крысы. В 40 мл указанной суспензии внесли 1 мМ  $CaCl_2$ , в другие 40 мл добавили стоппер - 2 мМ ЭДТА. Все три суспензии (среда Д - 12 мМ  $NaHCO_3$ , pH 8, 15, среда Е - 12 мМ  $NaHCO_3$ , 1 мМ  $CaCl_2$ , pH 8, 15, среда Д со стоппером,  $D_{ст}$  - 12 мМ

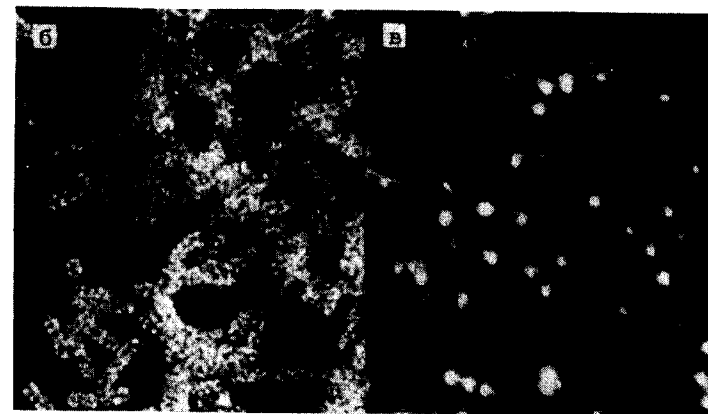
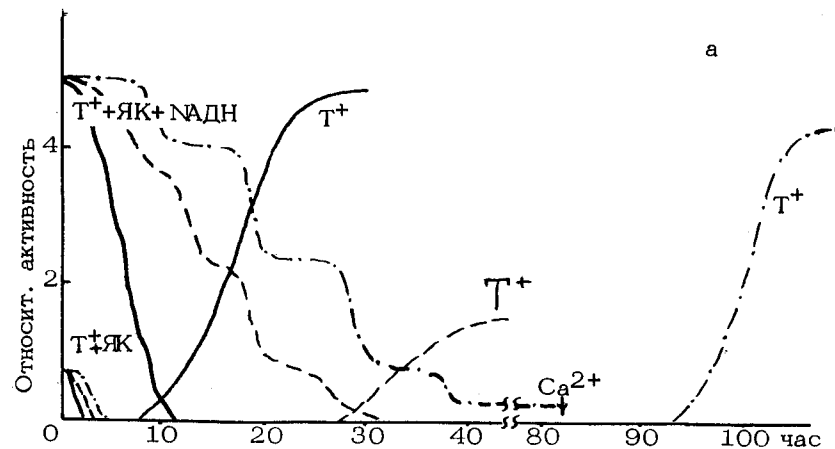


Рис. 4. Биохимические и морфологические изменения митохондрий в средах Д, Е,  $D_{ст}$ : а - п-НТФ редуктазная активность в отсутствие экзогенных субстратов ( $T^+$ ), в присутствии сукцината (Як) или НАДН, (—) - в среде Е (12 мМ  $NaHCO_3$ , 1 мМ  $CaCl_2$  pH 8, 15), (---) - в среде Д (12 мМ  $NaHCO_3$ , pH 8, 15), (-.-.-) - в среде  $D_{ст}$  (12 мМ  $NaHCO_3$  2 мМ ЭДТА, pH, 8, 15); б - микроорганизмы среды Е, окрашенные с помощью п-НТФ; в - микроорганизмы среды Д, окрашенные с помощью п-НТФ. Увеличение б, в  $\times 520$

$NaHCO_3$ , 2 мМ ЭДТА, pH 8, 15) разлили по 2 мл в 15 мл пенфлаконы и начали инкубировать одновременно при  $37^\circ C$ . Через каждые 2 ч отбирали по одному пенфлакону из каждой пробы (Д, Е,  $D_{ст}$ ) и измеряли п-НТФ редуктазную активность /1/ при имев-

шемся в пробах значения  $pH=8,15$  а) на эндогенных субстратах путем введения в 2 мл пробы 0,2 мМ п-НТФ, б) при последующем введении 2 мМ сукцината и в) после введения вслед за сукцинатом 0,1 мМ НАДН. Результат эксперимента представлен на рис. 4,а.

Активность п-НТФ редуктазы в отсутствие экзогенных субстратов отмечала, во-первых, наличие или отсутствие субстратов в пробах, а во-вторых, появление в пробах микроорганизмов с эндогенными субстратами. Активность СДГ и НАДН окисляющих редуктаз указывали на изменения, происходящие с митохондриями во времени. Параллельно биохимическим исследованиям вели наблюдение в микроскопе за окрашенными и неокрашенными митохондриями и микроорганизмами.

Из рис. 4,а видно, что изменения с митохондриями начали происходить с первых минут инкубации. Во всех трех пробах (Д, Е,  $D_{CT}$ ) активность СДГ полностью исчезла через 2-4 ч. Кинетики изменения скорости окисления НАДН в пробах были различны. Ступенчатость кинетики в пробе  $D_{CT}$  значительно более выражена, чем в двух других. В пробе Е (12 мМ  $NaHCO_3$ , 1 мМ  $CaCl_2$ ) окисление НАДН митохондриями полностью прекратилось через 12 ч инкубации, в пробе Д (12 мМ  $NaHCO_3$ ) через 30 ч, в пробе же  $D_{CT}$  (12 мМ  $NaHCO_3$ , 2 мМ ЭДТА) скорость окисления упала до 5-10% от исходной и сохранялась на этом уровне в течение 10 дней наблюдений. В моменты исчезновения митохондриальных НАДН-редуктазных активностей появились активности п-НТФ редуктаз на эндогенных субстратах, указывая на то, что в это время в пробах появились микроорганизмы, которые способны восстановить п-НТФ на собственных субстратах.

На рис. 4,б показаны микроорганизмы, появившиеся в среде Е, на рис. 4,в - в среде Д. Количество дыхательных бляшек в них различно, что отражается в максимальной п-НТФ редуктазной активности на эндогенных субстратах (рис. 4,а).

В пробы со стоппером  $D_{CT}$  через 3 дня, убедившись в абсолютном отсутствии в них микроорганизмов, ввели антистоппер - 4 мМ  $CaCl_2$ . Через 11 ч в среде  $D_{CT}$  с антистоппером появились микроорганизмы с большим чем одна на клетку (как на рис. 4,б) количеством гранул, еще раз указывая на то, что присутствие Са в пробах приводит к принципиальным изменениям в механизме превращения митохондрий в микроорганизмы. Помимо разного количества дыхательных бляшек микроорганизмы, полученные в средах Д и Е, отличаются друг от друга еще двумя показателями. Е - микроорганизмы перемешаются в среде путем кувиркания, а Д - микроорганизмы - равномерным, гладким бегом. Вторым отличием является их отношение к грам окраске: Е - микроорганизмы окрашиваются как грамположительные, а Д - микроорганизмы как грамотрицательные.

Отметим, что при инкубации митохондрий печени крысы в холод-

ной водопроводной воде г. Пушкино, получают микроорганизмы как в случае инкубации митохондрий в среде Е (12 мМ  $NaHCO_3$ , 1 мМ  $CaCl_2$ ) - с несколькими дыхательными бляшками в клетке, перемешающиеся путем кувиркания, окрашивающиеся как грамположительные (как на рис. 4,б).

Выводы из опыта 5. Различные микроорганизмы получают из исходно одинаковых митохондрий в различных средах. В средах Д и Е компонентом, определяющим тип полученных микроорганизмов, является Са.

Общие выводы, вытекающие из 5 опытов:

1. Митохондрии превращаются в микроорганизмы;
2. Микроорганизмы способны многократно размножаться;
3. В разных средах из одинаковых митохондрий возникают разные микроорганизмы.

Ниже перечислены независимые друг от друга экспериментальные свидетельства справедливости общих выводов.

1. В данной среде всегда возникает один и тот же вид микроорганизмов. Этого нельзя было бы наблюдать при случайном заражении (опыты 1-5).

2. Количество возникших в данной пробе микроорганизмов примерно равно исходному количеству в ней митохондрий. Пропорциональность наблюдается в широком диапазоне исходной концентрации митохондрий (опыты 3, 4).

3. Введение в среду стоппера предотвращает появление микроорганизмов, но не предотвращает их размножение (опыты 1, 5).

4. Появление микроорганизмов одновременно и реципрокно сопровождается исчезновением митохондрий (опыт 3).

5. В первые 12 ч инкубации наблюдается полное отсутствие микроорганизмов в среде С (сахароза 200 мМ, трис 30 мМ,  $pH 7,4$ ), содержащей митохондрии (опыт 3).

6. Микроорганизмы, появившиеся через 16-20 ч инкубации митохондрий в среде С, неподвижны. Относительно одновременное (16-20 ч) массовое во всем объеме среды появление неподвижных микроорганизмов указывает на независимое друг от друга их образование (опыт 3).

7. Появление подвижности микроорганизмов и закисление среды С обнаруживаются одновременно после массового возникновения (16-20 ч) исходно неподвижных микроорганизмов (опыт 3).

8. Внесение митохондрий не обращает среду превращения, в которой микроорганизмы не способны размножаться, в среду размножения (опыт 4).

9. В условиях эксперимента не обнаружили заражения ни среды размножения, ни среды превращения (опыт 2).

10. Обобщение литературных данных: митохондрии принципиально способны к самостоятельному существованию вне клетки.

## ГИПОТЕЗА

Как показал анализ литературных данных, в клетках животных имеется одна органелла, принципиально способная к самостоятельному существованию вне клетки — митохондрия, в клетках растения — две: митохондрия и хлоропласт. Не происходит ли превращения хлоропластов в микроорганизмы? Сколько типов микроорганизмов появится в среде, одновременно содержащей митохондрии и хлоропласты одного растения? С целью ответить на эти вопросы выполнили следующий эксперимент.

В 5 мл среды С (сахароза 200 мМ, трис 30 мМ, pH 7,4) приготовили гомогенат из пятисантиметровой верхней части зеленого побега *Allium* сера. В 6 пенфлаконов объемом по 15 мл внесли по 5 мл среды С и по 100 мкл гомогената *Allium* сера. В три пенфлакона внесли по 4 мМ ЭДТА, затем во все 6 ввели по 20 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 20 мМ  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 3 мМ  $\text{MgSO}_4$ . Параллельно приготовили три пробы с митохондриями: в 20 мл среды С внесли 10 мкл густой суспензии (60–80 мг мх белка/мл) митохондрий печени крысы, 20 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 20 мМ  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 3 мМ  $\text{MgSO}_4$ , pH 7,4 и затем разлили по 5 мл в 15 мл пенфлаконы. Все пробы поместили в светоизолированный термостат 37°C. Через три дня инкубации спектрально и светомикроскопически проанализировали появившиеся в пробах микроорганизмы. На рис. 5 показаны спектры возбуждения (эмиссия 675 нм) и люминесценции (возбуждение 395 нм) микроорганизмов, появившихся в пробах, исходно содержащих гомогенат *Allium* сера или митохондрий печени крысы. Видно, что спектры возбуждения митохондрий и микроорганизмов, из них полученных, отличаются между собой незначительно: максимумом при 395 нм, а также разной интенсивностью при 290 нм. В то же время спектр возбуждения микроорганизмов, появившихся в пробе с гомогенатом *Allium* сера, существенно отличается и от контрольного препарата (проба с гомогенатом *Allium* сера в среде со стоппером), в котором микроорганизмы не появились (оптическая плотность сохранилась равной исходной  $D=0,05$ ,  $\lambda=510$  нм,  $l=0,5$  см) и от обоих митохондриальных препаратов. Такие же существенные различия обнаружены и в спектрах люминесценции (рис. 5,б).

На рис. 5,в показаны микроорганизмы, обнаруженные через 3 дня инкубации в средах, исходно содержащих гомогенат *Allium* сера. Видно, что клетки собраны в цепочечные колонии, которые при наблюдении под микроскопом обнаруживают относительную легкость в разрушении и образовании, а также медленные перемещения путем скольжения. Микроорганизмы в средах, исходно содержащих митохондрии, выглядели обычным образом (как на рис. 2,б).

Описанный опыт после каждого из трех повторов дал один и тот же результат — микроорганизмы, возникшие в средах, исходно содержащих митохондрии, люминесцирующих в видимой области пиг-

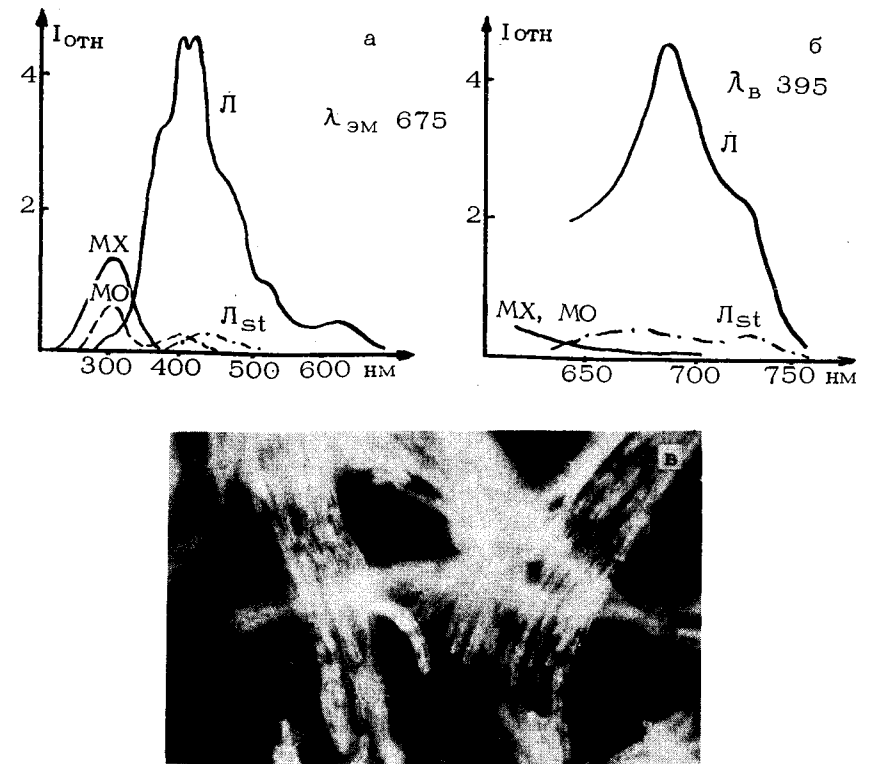


Рис. 5. Спектральные и светомикроскопические характеристики митохондрий, гомогената *Allium* сера и микроорганизмов, из них получаемых. а, б — Спектры возбуждения (а; эмиссия 675 нм) и эмиссии (б; возбуждение 395 нм) митохондрий печени крысы (Мх), микроорганизмов, из них получаемых (МО) через 3 дня инкубации, а также из гомогената *Allium* сера (Л-лук). Кривая  $L_{st}$  — контроль, гомогенат *Allium* сера со стоппером (4 мМ ЭДТА) через 3 дня инкубации; в — Микроорганизмы, появившиеся через 3 дня инкубации в среде (см. текст) с гомогенатом *Allium* сера Увеличение  $\times 300$

ментов не содержали в отличие от микроорганизмов, возникших в средах с гомогенатом *Allium* сера. Хорошо спектрально сопряженная группа пигментов (рис. 5,а) в микроорганизмах из проб с гомогенатом *Allium* сера, по-видимому, является их фотосистемой на стадии формирования.

Таким образом, приходим к заключению, что в средах, исходно содержащих митохондрии и хлоропласты, возникают фотосинтезирующие микроорганизмы, в отличие от нефотосинтезирующих в средах с митохондриями.

На основании собственного экспериментального материала, представленного в данной работе и в /1/, автор выдвигает следующую рабочую гипотезу:

- 1) прокариоты эволюционно были созданы, а также происходят в настоящее время из эукариот;
- 2) имеется два канала связи между эу- и прокариотами - митохондрии и хлоропласты;
- 3) в интактных клетках митохондрии превращаются в постмитохондрии (новые внутриклеточные образования /1, 4/), в разрушенных - в прокариоты;
- 4) митохондрии разрушенных клеток производят нефотосинтезирующие прокариоты, хлоропласты (самостоятельно или совместно с митохондриями) - фотосинтезирующие;
- 5) и митохондрии и хлоропласты в зависимости от начальных условий превращаются в различные микроорганизмы;
- 6) разнообразие прокариот создается множеством разных геномов митохондрий и хлоропластов, начальными условиями превращения органелл в микроорганизмы, дальнейшим взаимодействием клеток между собой, посредничеством плазмид и вирусов, а также адаптивными реакциями появившихся прокариот к изменениям среды обитания.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Белякович А.Г. Изучение митохондрий и бактерий с помощью соли тетразолия п-НТФ. Пушино, ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1989, в печати.
2. Белякович А.Г. В сб.: Митохондриальные процессы во временной организации. Пушино, ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1978, с. 64.
3. Белякович А.Г. - В сб.: Митохондрии. Пушино, ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1981, с. 18.
4. Белякович А.Г. - В сб.: Труды 4-й все. междунивер. конфер. Тбилиси, 1985, часть 1, с. 70.
5. Белякович А.Г. - Цитология. 1986, т. 28, № 5, с. 595.
6. Белякович А.Г., Лахина Л.В., Панкратова Е.В., Теплицкий Б.И., Чумакова Г.П. - Вопр. мед. химии. 1987, № 3, с. 118.
7. Белякович А.Г. Авторское свидетельство № 1339434, 1987.
8. Белякович А.Г. - Вопр. мед. химии. 1988, № 4, с. 144.
9. Бернхард С. Структура и функция ферментов. М., Мир, 1971.
10. Вилли К. Биология, М., Мир, 1968, с. 168.
11. Вольпе П. Биохимия клеточного цикла. М., Мир, 1979, с. 59.
12. Гаузе Г.Г. Митохондриальная ДНК. М., Наука, 1977, с. 9.
13. Гельман Н.С., Лукьянова М.А., Островский Д.Н. Мембраны бактерий и дыхательная цепь. М., Наука, 1972.
14. Ленинджер А. Биохимия, М., Мир, 1974, с. 441.
15. Лузиков В.Н. Регуляция формирования митохондрий. М., Наука, 1980.

16. Маргелис Л. Роль симбиоза в эволюции клетки. М., Мир, 1983, с. 182, 15, 91.
17. Озернюк Н.Д. Рост и воспроизведение митохондрий. М., Наука, 1978.
18. Рудин Д., Уилки Д. Биогенез митохондрий. М., Мир, 1970, с. 75, 47, 15, 21, 22.
19. Страйер Л. Биохимия. М., Мир, 1984.
20. Belyakovich A.G. - *Analyt. Biochem.* 1983, v. 131, p. 404.
21. Berjeron M., Droj B. - *J. Ultrastr. Res.* 1969, v. 26, No 1, p. 17.
22. Borst P., Ruttenberg G. - *BBA.* 1966, v. 144, p. 645.
23. Borst P., Van Bruggen E.F.J., Ruttenberg G., Kroon A.M. - *BBA.* 1967, v. 149, p. 156.
24. Borst P., Kroon A.M. - *Intern. Rev. Cytol.* 1969, v. 26, p. 108.
25. Bucher T., Neupert W., Sebald W., Werner S. *Genetics and biogenesis of chloroplasts and mitochondria.* Amsterdam, North-Holl, 1976.
26. Cummins J.E., Rusch H.P., Evans T.E. - *J. Mol. Biol.* 1967, v. 23, p. 281.
27. Dawid I.B., Wolstenholme D.R. - *J. Mol. Biol.*, 1967, v. 28, p. 223.
28. Fukamachi S., Bartoov B., Freeman R. - *Biochem. J.* 1972, v. 128, p. 299.
29. Gear A.R.L., Bednarek J.M. - *J. Cell. Biol.* 1972, v. 54, p. 325.
30. Gillman N.W. *Organelle Heredity.* N.Y. Raven Press, 1978.
31. Halder D., Freeman K., Work T.S. - *Nature.* 1966, v. 211, p. 9.
- 31 a. Jacobs H.T., Elliott D.I., Math V.B., Farguharson A. - *J. Mol. Biol.*, 1988, v. 202, p. 185.
32. Karol M.H., Simpson M.V. - *Science.* 1968, v. 162, p. 470.
33. Kirschner R.H., Wolstenholme D.R., Gross N.J. - *PNAS.* 1968, v. 60, p. 1466.
34. Linnane A.W. *The nature of mitochondrial RNA.* / Eds. E.C. Slater, J.M. Tager. Bari Italy, Adriatica Editrice, 1968.
35. Lowry O.H., Rosenbough H.J., Farr A.L., Randall R.J. - *J. Biol. Chem.* 1951, v. 193, p. 265.
36. Luck D.G.L. - *PNAS.* 1963, v. 49, No 2, p. 233.
37. Luck D.G.L. - *J. Cell. Biol.* 1965, v. 24, No 3, p. 445.

38. Nass M. - PNAS. 1966, v. 56, p. 1215.
39. Nass M. - J. Mol. Biol. 1969, v. 42, p. 529.
40. Nass M.M.K., Nass S., Afjelius B.A. - Exptl. Cell. Res. 1965, v. 37, p. 516.
41. Parsons P., Simpson M.V. - Science. 1967, v. 155, p. 91.
42. Pico L., Blaier D.G., Tyler A., Vinograd. - PNAS. 1968, v. 59, p. 838.
43. Polan M.L., Friedman S., Galli J.G., Gehring W. - J. Cell. Biol. 1973, v. 56, p. 580.
44. Reich E., Luck D.J.L. - PNAS. 1966, v. 5, p. 167.
45. Robberson D.L., Kasamatsu H., Vinograd J. - PNAS. 1972, v. 69, p. 737.
46. Schneider W.C. - J. Biol. Chem. 1948, v. 176, p. 259.
47. Wolstenholme D.R., Koike K. - Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol. 1974, p. 267.
48. Yotuyanagi Y.C. - Reud. Acad. Sci. Paris, 1966, v. 262, p. 1348.

Анатолий Григорьевич Белякович

МИТОХОНДРИИ ПРЕВРАЩАЮТСЯ В МИКРООРГАНИЗМЫ!?

Препринт

Отредактировано и подготовлено к печати в ОНТИ НЦБИ  
АН СССР

Редактор Т.К.Тевэиева  
Технический редактор С.М.Ткачук  
Корректор Л.М.Орлова

Подписано к печати 23.08.89 г. Т-15097. Уч.-изд.л. 1,6.  
Усл. печ. л. 1,75. Формат 60x90/16. Тираж 250 экз.  
Заказ 2065Р. Бесплатно. Изд. № 75.

Отпечатано на ротапринтере в Отделе научно-технической  
информации Научного центра биологических исследований  
АН СССР в Пушкине