

А. А. СИМОНЯН, К. С. АБРАМЯН, М. А. РОСТОМЯН, Р. А. СТЕПАНЯН

ЭЛЕКТРОННОМИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИТОХОНДРИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА КУР В ОНТОГЕНЕЗЕ

Проводилось электронномикроскопическое исследование изолированных митохондрий головного мозга кур в различные периоды эмбрионального и онтогенетического развития (15, 18, 21-дневные эмбрионы, 5-дневные цыплята и взрослые куры). Обнаружены определенные структурные изменения этих органелл: постепенное увеличение количества митохондрий и их размеров в ходе эмбриогенеза, при постоянном соотношении длины к ширине, а также изменения во внутренней структуре, сопровождающиеся увеличением количества и протяженности крист. Намечалось увеличение общей поверхности внутримитохондриальных мембран в процессе развития, свидетельствующее об интенсификации процессов дыхания и фосфорилирования, т. е. о большей функциональной активности.

В предыдущих работах [2, 6—8] было показано, что в процессе развития куриных эмбрионов в энергетическом метаболизме мозговой ткани имеет место ряд важных изменений, характеризующих определенные периоды эмбриогенеза. Выяснилось, что в митохондриях, выделенных из мозга эмбрионов, начиная с 13-го дня и до вылупления цыпленка поглощение кислорода постепенно усиливается. Одновременно с этим коэффициент соотношения окисления и фосфорилирования (Р/О) уменьшается. В исследуемые периоды эмбрионального развития активность АТФазы в мозгу (КФ 3.6.1.3), а также цитохромоксидазы (КФ 1.9.3.1) и сукциндегидрогеназы (КФ 1.3.99.1) постепенно возрастает. С возрастом эмбрионов увеличивается и количество адениннуклеотидов (АТФ, АДФ и АМФ). Приведенные результаты исследований свидетельствуют о том, что окислительно-восстановительные процессы, протекающие в мозгу развивающегося цыпленка, резко усиливаются в поздние периоды эмбрионального развития.

Исходя из вышеприведенных данных, представляется целесообразным проведение электронномикроскопических исследований митохондрий головного мозга куриных эмбрионов в различные периоды развития, поскольку известно, что как в мозгу, так и в других тканях перенос электронов в дыхательной цепи и процессы фосфорилирования неразрывно связаны с митохондриями [4, 14].

Благодаря широкому применению электронной микроскопии за последнее десятилетие достигнуты большие успехи в области исследования морфологических и структурных особенностей митохондрий мозга. Изучение структуры и метаболических проявлений митохондрий является

особенно важным ввиду того, что эти клеточные органониды представляют собой наиболее яркий пример структурно-функционального единства.

Строение митохондрий нервной клетки не обнаруживает значительных отклонений от типичной для этих образований структуры и характеризуется наличием двойной оболочки с отходящими внутрь кристами. По данным Шьестранда [24] и Люси [17], наряду с обычными митохондриями (размерами 2500—7500 Å), в дендритах встречаются органониды более крупных размеров. В мозговых клетках большое скопление митохондрий отмечается в контактных аппаратах — в синапсах и шипиках [12, 13, 20].

Митохондрии, расположенные в разных отделах нервной ткани или в разных нервных клетках, могут отличаться своей электроннооптической плотностью [5]. Так, например, в теле нервной клетки митохондрии светлые, со слабовыраженными кристами, а в отростках, прилегающих к нервной клетке, — темные, осмифильные, кристы в них многочисленны, но недостаточно отчетливо видны из-за электронноплотного матрикса.

Кристы митохондрий нервной клетки характеризуются небольшой толщиной [23]. Величина, количество и ориентация их в цитоплазме одной нервной клетки довольно переменчивы [5]. В одних они идут параллельно длинной оси органониды, в других — перпендикулярно к ней, в некоторых направлении косопродольное.

Матрикс митохондрий клеток мозга светлый, прозрачный, обычно гомогенный, но в некоторых случаях в нем можно обнаружить тончайшие нити или мелкие гранулы высокой электроннооптической плотности. Известно, что эти гранулы являются местами связывания двухвалентных катионов, и в частности Mg и Ca [21, 26].

Задачей данной работы явилось исследование некоторых особенностей морфогенеза митохондриального аппарата клеток мозга куриных эмбрионов в различные периоды их онтогенетического развития.

В литературе имеются данные относительно электронномикроскопического исследования формирования скелетных мышц куриного эмбриона в ранние периоды эмбриогенеза [10, 11]. Изучалось становление клеток печени цыпленка на ранних стадиях эмбрионального развития [16, 18]. Работы Гамори и Хуфик [15], де Лоренцо и Дарина [9] посвящены электронномикроскопическому изучению ганглионарных узлов сетчатки цыпленка. Однако изучению морфогенеза и ультраструктурных особенностей митохондрий нервных клеток в ходе эмбрионального и онтогенетического развития птиц посвящены лишь единичные работы [1, 3].

Материал и методика. Для исследования использовались митохондриальные фракции мозга 15, 18, 21-дневных эмбрионов, а также 5-дневных цыплят, которые сопоставлялись с митохондриями, выделенными из мозговой ткани взрослых кур. Особое внимание уделялось форме, количеству и размерам митохондрий, содержанию крист и их расположению.

Осадок митохондриальных фракций, полученных методом, описанным ранее [2, 6, 7], фиксировали 2% раствором четырехоксида осмия, приготовленным на среде для вы-

деления митохондрий (0,25 М сахараза—0,02 М трис HCl буфере, рН 7,4). Обезвоживание фиксированных препаратов производили в этаноле восходящей концентрации от 40° до абсолютного спирта с интервалами в 10° (от 40° до 60° при 4°С, далее при комнатной температуре). 70° спирт содержал 2% уранилацетата, а первая смена абсолютного спирта—1% фосфорновольфрамовой кислоты. В каждой смене спирта объекты находились не более 20—30 мин. В качестве заливочной среды использовали аралдит. Ультратонкие срезы, полученные на ультрамикротоме LKB 8800 А, дополнительно контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца по Рейнгольду [22] в модификации Венабля и Когешаля [25]. Препараты исследовали в электронном микроскопе BS 413 А при ускоряющем напряжении 80 кв и апертурной диафрагме 30 мк. Подсчет и фотографирование митохондрий производились при инструментальном увеличении 25000X.

Результаты исследований. Электронномикроскопическое изучение изолированных митохондрий головного мозга кур в различные периоды эмбриогенеза показало, что эти органониды имеют овальную, округлую или удлинённую форму (рис. 1—5). Матрикс большинства митохондрий выглядит прозрачным и не содержит какой-либо зернистости. На кристах в единичных случаях имеются электронноплотные гранулы.

Таблица 1
Изменение содержания митохондрий мозга кур в различные периоды эмбрионального и пост-эмбрионального развития*

Дни развития	Количество митохондрий
15	12,8
18	16,0
21	18,4
5-дневные цыплята	19,4
Взрослые куры	11,0

* Усредненные данные исследований 10—15 полей зрения электронного микроскопа при увеличении 25000 X.

Данные, приведенные в табл. 1, свидетельствуют о том, что количество митохондрий в нервных клетках головного мозга кур начиная с 15-го дня развития и до вылупления цыпленка увеличивается. У 5-дневных цыплят, по сравнению с 15-дневными эмбрионами, изменение этого показателя составляет 151%. Увеличение количества митохондрий было показано и в нейробластах спинальных ганглиев развивающегося эмбриона [19].

В мозгу взрослых кур содержание митохондрий заметно сокращается по сравнению с эмбрионами.

В ходе эмбрионального развития кур наблюдаются также изменения величины митохондрий. Данные, приведенные в табл. 2, показывают, что размеры (длина и ширина) митохондрий клеток мозга увеличиваются в процессе развития. Так, например, у 15-дневных эмбрионов средняя длина митохондрий мозга составляет 3740 Å. По мере развития эмбриона отмечается постепенное возрастание величины митохондрий, ко-

Таблица 2

Размеры митохондрий (в Å) головного мозга кур в различные периоды эмбрионального и постэмбрионального развития

Дни развития	Длина			Ширина			Длина/ширина
	минимальная	максимальная	средняя	минимальная	максимальная	средняя	
15	1400	10900	3740	910	3630	2000	1,87
18	1270	9900	3800	910	3630	2000	1,90
21	2360	5820	4000	910	3630	2310	1,73
5-дневные цыплята	1810	7270	5020	1810	4000	2580	1,94
Взрослые куры	2180	7270	4400	910	3630	2360	1,86

торая у 5-дневных цыплят достигает 5020 Å (прирост в 1,3 раза). Такая же закономерность наблюдается и в отношении ширины их. Примечательно, что коэффициент отношения длины к ширине почти постоянен во все изученные периоды эмбриогенеза, что свидетельствует о равномерном развитии митохондрий как в длину, так и в ширину.

Определенный интерес представляют данные, касающиеся изменения внутреннего строения митохондрий в онтогенезе кур. На ранних стадиях эмбриогенеза митохондрии содержат относительно небольшое количество крист (табл. 3), с развитием эмбриона оно увеличивается. Так, по сравнению с 15-дневными эмбрионами содержание крист у 21-дневных составляет около 190%, а у 5-дневных цыплят достигает 230%. Увеличивается также длина крист, которые в ходе развития приобретают извилистые контуры, что способствует увеличению общей поверхности внутримитохондриальных мембран. Расположение крист в различных митохондриях может заметно варьировать. Они обычно ориентированы в трех направлениях: перпендикулярно к длинной оси митохондрий, параллельно ей или под некоторым углом. В отдельных митохондриях кристы располагаются в самых различных направлениях.

Таблица 3

Количество крист в изолированных митохондриях головного мозга кур в различные периоды эмбрионального и постэмбрионального развития

Дни развития	Количество крист
15	5,2 (2—9)
18	6,9 (0—17)
21	9,8 (5—21)
5-дневные цыплята	12,0 (5—22)
Взрослые куры	12,9 (3—18)

В скобках — минимальное и максимальное количество крист в одной митохондрии.

Таким образом, электронномикроскопическое исследование показало, что изолированные митохондрии головного мозга кур в процессе эм-

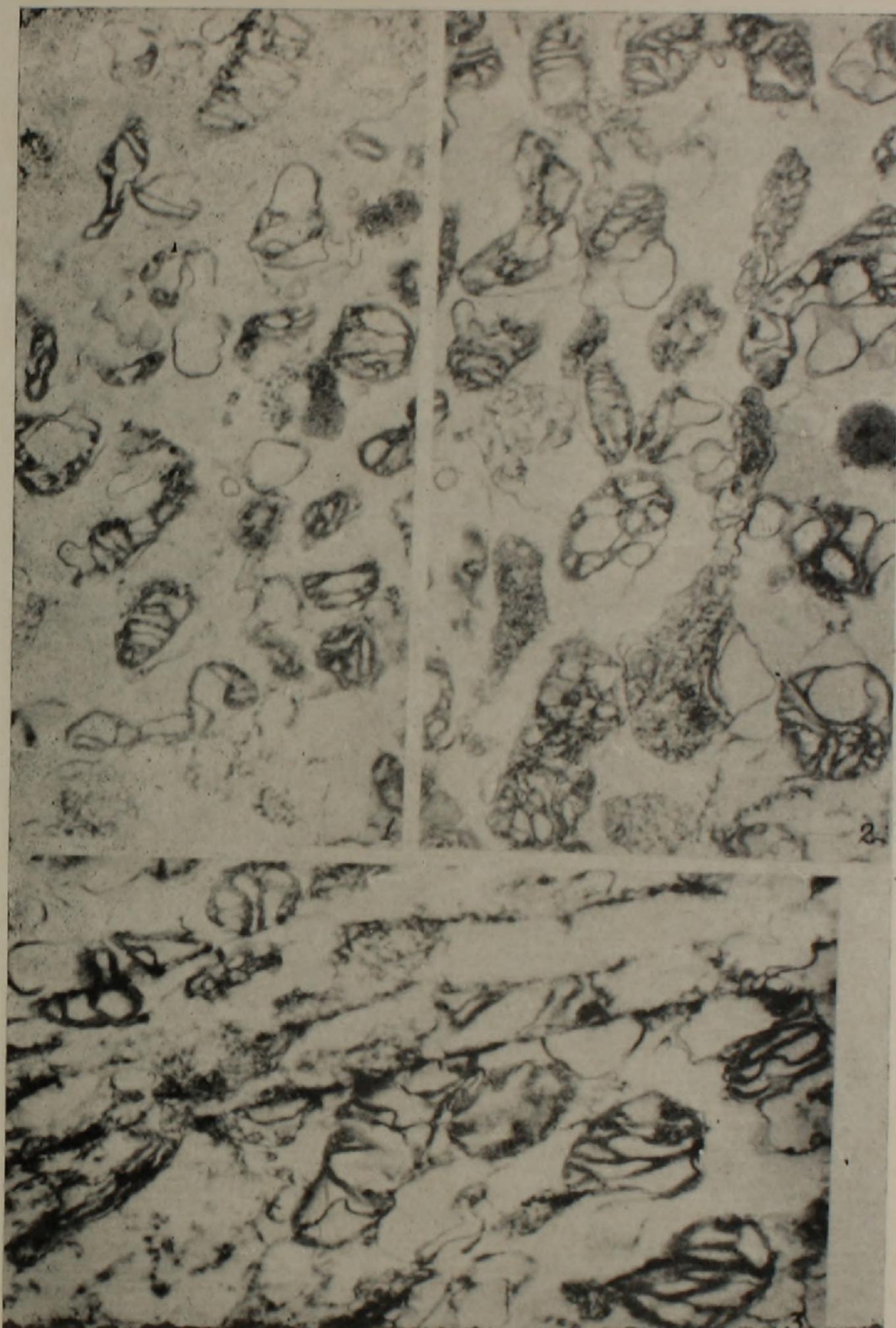


Рис. 1—3. Митохондриальная фракция из мозга кур в различные периоды эмбрионального развития: 1—митохондрии мозга 15-дневных эмбрионов. 2—митохондрии мозга 18-дневных эмбрионов. 3—митохондрии мозга 21-дневных эмбрионов. Ув. 45000X.



Рис. 4. Митохондриальная фракция из мозга 5-дневных цыплят. Ув. 52000X.



Рис. 5. Митохондриальная фракция из мозга взрослых кур. Ув. 52000X.

брионального развития обладают рядом характерных особенностей. Полученные результаты в общих чертах сходны с данными литературы, касающимися строения изолированных митохондрий мозга крыс в раннем постнатальном периоде развития [3]. Однако митохондрии изученных объектов отличаются определенными признаками, характеризующими различные возрастные периоды. Прежде всего это относится к размерам. На ранних стадиях эмбрионального развития кур преобладают митохондрии малых размеров, округлой или овальной формы с небольшим числом крист, не имеющих строго определенной ориентации. По мере развития происходит увеличение размеров митохондрий и крист, последние располагаются более упорядоченно.

Как известно, на внутренних мембранах митохондрий локализируются комплексы ферментов дыхательной цепи. Возрастание количества крист и соответственно увеличение общей поверхности внутримитохондриальных мембран может свидетельствовать о том, что по мере онтогенетического развития кур митохондрии становятся энергетически более активными.

Примечательно, что отношение длины к ширине митохондрий довольно постоянно и почти не меняется в онтогенезе. В исследованиях Глезера [3] столь же постоянно отношение толщины крист к толщине мембран митохондрий, выделенных у крыс в постнатальном периоде развития, а также соотношение осмиофильных и осмиофобных участков крист и оболочки. Как предполагает автор, эти факты являются определяющими при оценке морфо-функционального состояния митохондрий и отражают строгую молекулярную структуру энзимных компонентов и их пространственную упорядоченность в них.

Приведенные выше морфологические данные, касающиеся изменений изолированных митохондрий головного мозга кур в период их онтогенетического развития, определенным образом коррелируют с полученными нами результатами биохимического изучения энергетических процессов, протекающих в митохондриях в различные периоды эмбриогенеза и онтогенеза [2, 6—8].

Институт биохимии АН АрмССР,
Институт экспериментальной биологии
АН АрмССР

Поступило 17.XI 1972 г

Ա. Ա. ՄԵՐՈՆՅԱՆ, Կ. Ս. ԱՔԲԱԶԱՄՅԱՆ, Մ. Ա. ՌՈՍՏՈՄՅԱՆ, Ռ. Ա. ՍՏԵՓԱՆՅԱՆ

ՀԱՎԵՐԻ ԳԼԽՈՒԳԵՂԻՑ ՄԵԿՈՒՍԱՑՎԱԾ ՄԻՏՈՔՈՆՎԵՐԻԱՆԵՐԻ ԷԼԵԿՏՐՈՆԱ-
ՄԻԿՐՈՍԿՈՊԻԱԿԱՆ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆԸ ՕՆՏՈԳԵՆԵՑՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո ՝ մ

Հետադրուստիայան համար վերցրել ենք 15, 18, 21 օրական սաղմերի և 5 օրական ձաթի (ձվից դուրս գալուց հետո) ուղեղից անչատված միտոքոնդրիա-

ները: Համեմատության նպատակով դիտումներ կատարել ենք նաև հասուն հավերի վրա: Ուսումնասիրության ընթացքում ուշադրություն ենք դարձրել հավի սաղմնային զարգացման տարբեր ստադիաներում ուղեղի միտոքոնդրիաների ձևի, քանակի և մեծության, ինչպես նաև նրանց մեջ կրիստների պարունակության և տեղադրության վրա: Համապատասխան կտրվածքներում միտոքոնդրիաների մորֆոգենեզի ուսումնասիրությունը կատարել ենք Tesla BS 413 A տիպի էլեկտրոնային միկրոսկոպով 25000 անգամ խոշորացումով և հետագա ֆոտոգրաֆիական 2,2 անգամ մեծացումով:

Ստացված արդյունքները ցույց են տալիս, որ ուղեղային բջջի միտոքոնդրիաները հավերի օնտոգենեզի տարբեր հասակային շրջաններում բնորոշվում են որոշակի առանձնահատկություններով: Սաղմնային զարգացմանը զուգընթաց ներվային բջիջներում միտոքոնդրիաների քանակը աստիճանաբար շատանում է, և մեծանում են նրանց չափերը (երկարությունը և լայնությունը): Սաղմի հասակի հետ միասին շատանում է կրիստների պարունակությունը և նրանց երկարությունը: Միտոքոնդրիաների չափերի մեծացումը, կրիստների քանակի շատացումը և համապատասխանաբար ներքին թաղանթների մակերեսի մեծացումը վկայում են այն մասին, որ նրանք սաղմի հասակին զուգընթաց, էներգետիկ տեսակետից ավելի ակտիվ են դառնում:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Браше Ж. Биохимическая цитология. М., 1960.
2. Бунятян Г. Х., Симоныан А. А., Степаныан Р. А., Бадалян Р. Б. Вопросы биохимии мозга. 6, 251, Ереван, 1971.
3. Глззер И. И. Цитология, 6, 3, 305, 1964.
4. Грин Д. Структура и функция субклеточных частиц. V МБК, 3—4, М., 1961.
5. Саркисов С. А., Боголепов Н. Н. Электронная микроскопия мозга. М., 1967.
6. Симоныан А. А. Некоторые стороны энергетического обмена в онтогенезе кур. Ереван, 1970.
7. Симоныан А. А. Вопросы биохимии мозга. 7, 153, Ереван, 1971.
8. Симоныан А. А., Мовсесян С. Г. Цитохромоксидаза и сукцинатдегидрогеназа в мозгу и печени кур в онтогенезе. ДАН АрмССР (в печати).
9. De Lorenzo, Darin A. J. Nature, 152, 3718, 76, 1966.
10. Dessouky D. A., Richard G. H. Amer. J. Anat., 116, 3, 523, 1965.
11. Fischman Donald A. J. Cell. Biol., 32, 3, 557, 1967.
12. Gray E. J. anat., 93, 420, 1959.
13. Gray E. In: Electron microscopy in anatomy. London, 54, 1961.
14. Green D. E., Perdue J. F. Ann. N. Y. Acad. Sci., 137, 2, 667, 1966.
15. Hamori J., Hufiek B. Acta Biol. (Acad. Sci. Hung.), 15, 2, 213, 1964.
16. Karer H. E. J. Ultrastruct. Res., 4, 2, 149, 1960.
17. Luse S. J. biophys. biochem. cytol., 2, 531, 1956.
18. Machino M. Nature, 210, 5038, 853, 1966.
19. Pannese E. J. Ultrastruct. Res., 15, 1—2, 57, 1966.
20. Pappas G., Purpura D. Exper. neurol., 6, 507, 1961.
21. Pasquali-Ronchetti J., Greenawalt J. W., Carafoli E. J. Cell Biol., 40, 2, 565, 1969.
22. Reynolds S. J. Cell Biol., 17, 1, 208, 1963.
23. Rhodin J. Amer. J. med., 24, 661, 1958.
24. Sjöstrand F. In: Fine structure of cells. Leiden, 16—200, 1955.
25. Venable J. H., Coggeshall R. J. Cell Biol., 25, 2, 407, 1965.
26. Weinbach E., Brand T. Biochim. biophys. acta., 148, 1, 256, 1967.