

УДК 577.1:577.3:591.83

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ  
МИТОХОНДРИЙ МЫШЦ КУР В ОНТОГЕНЕЗЕ

Р. Б. БАДАЛЯН, А. А. СИМОНЯН, Р. А. СТЕПАНЯН, Л. А. ШАТВЕРОВА

Электронномикроскопическим методом исследованы ультраструктурные особенности митохондрий, выделенных из скелетных мышц кур в онтогенезе. Изучена общая и Са-АТРазная активность в митохондриях. Выявлены определенные структурно-функциональные изменения в этих органоидах в изученные периоды онтогенеза.

*Ключевые слова:* митохондрии, онтогенез, ультраструктура, АТРаза.

Одной из актуальных задач современной биологической науки является выяснение биохимических механизмов, лежащих в основе эмбрионального развития животных. Наши предыдущие исследования выявили некоторые закономерности в энергетическом метаболизме развивающегося куриного эмбриона. Было установлено, что при развитии куриного эмбриона, начиная с плодного периода, дыхание в тканях мозга, печени и миокарда постепенно усиливается, а величина коэффициента соотношения окисления и фосфорилирования уменьшается [3—7]. При этом АТРазная активность в митохондриях возрастает, достигая максимума в тканях 5-дневных цыплят. На основании проделанной работы представляло несомненный интерес изучение становления и развития энергетических механизмов в других тканях развивающегося организма. Важным является изучение изменения ультраструктуры и метаболических проявлений митохондрий, так как эти клеточные органеллы представляют собой наиболее яркий пример структурно-функционального единства. На примере тканей мозга и печени нами было показано, что размеры митохондрий, форма и количество крист при развитии куриного эмбриона в известной мере могут служить показателями функционального состояния и степени энергизации митохондрий [8, 9]. Выявлено, что в ходе эмбриогенеза кур наблюдается постепенное увеличение размеров митохондрий мозга, печени и миокарда, одновременно изменяется их внутренняя структура, сопровождающаяся увеличением количества и протяженности крист. Увеличение общей поверхности внутримитохондриальных мембран соответствует активации процессов дыхания и окислительного фосфорилирования в этих органеллах в течение эмбрионального развития кур.

В настоящей работе изучена общая и Са-АТРазная активность, а также ультраструктурные особенности митохондрий скелетных мышц кур в различные сроки эмбрионального развития и после вылупления.

*Материал и методика.* Исследования проводили на изолированных митохондриях скелетных мышц 15- и 20-дневных эмбрионов, 5-дневных цыплят и годовалых кур белой русской породы. Мышцы измельчали ножницами и затем специальной давилкой. Полученную кашу в течение 30–40 сек гомогенизировали в гомогенизаторе типа Поттера-Эльвегейма в растворе 0,44 М сахарозы—1 мМ ЭДТА. Ядра осаждали при 2000 g (7 мин), митохондрии—12900 g (15 мин). Осадок промывали тем же раствором и центрифугировали. Полученные митохондрии суспендировали в растворе 0,25 М сахарозы—0,02 М трис-НСI буфера (рН 7,4). Активность АТРаза устанавливали по нарастающей неорганического фосфата в следующей инкубационной смеси: 0,25 М сахароза—0,02 М трис-НСI буфер, 2 мг АТР (в пробу). При изучении изменения активности Са-АТРаза ионы добавляли в количестве 20 мМ в конечной концентрации, митохондрии—в количестве 2–4 мг белка. Время инкубации 30 мин при 37°.

Неорганический фосфат и митохондриальный белок определяли по Лоури и сотр. [10, 11]. Количество свободного фосфата выражали в мкатамах/мг белка. Полученные данные статистически обработаны [1].

Для электронномикроскопического исследования осадок митохондриальной фракции фиксировали в 2,5%-ном растворе глутаральдегида, забуференного 0,1 М каодилатом рН 7,4, далее постфиксировали в 1%-ой забуференной четырехокиси осмия. Обезвоживание фиксированных препаратов производили в этаноле восходящей концентрации от 30° до абсолютного спирта, при комнатной температуре. В каждой порции спирта объекты находились не более 10–20 мин. В качестве заливочной среды использовали арадит. Ультратонкие срезы, полученные на ультрамикротоме LKP 8800 А, контрастировали цитратом свинца [12]. Препараты изучали в электронном микроскопе BS 413 А при ускоряющем напряжении 80 кв и апертурной диафрагме 30 мк. Фотографирование проводили при увеличении 15000X. Особое внимание уделяли форме и размерам митохондрий, количеству крист и их расположению.

*Результаты и обсуждение.* Проведенные нами исследования показали, что в изолированных митохондриях скелетных мышц эмбрионов общая АТРазная активность постепенно повышается с начала плодного периода эмбрионального развития (табл. 1). Так, например, на 15-й

Таблица 1  
АТРазная активность в изолированных митохондриях мышц кур в онтогенезе,  $\Delta P$  в мкатамах/мг белка

| Дни развития эмбриона | Без активаторов | Ca <sup>++</sup> |
|-----------------------|-----------------|------------------|
| 15-дневные эмбрионы   | 4,82±0,35*      | 5,67±0,32        |
| 20-дневные эмбрионы   | 5,99±0,85       | 6,03±0,81        |
| 5-дневные цыплята     | 3,48±0,79       | 3,59±0,94        |
| Годовалые куры        | 4,01±0,39       | 3,09±0,33        |

\* Средние данные 5–8 опытов.

день количество свободного фосфата составило 4,82 мкатама/мг белка, однако у 20-дневных эмбрионов оно, повышаясь, достигало уже 5,99 мкатама. Аналогичным изменениям подвергается также Са-АТРазная активность. Однако после вылупления цыпленка активность фермента в мышечной ткани заметно подавляется. По сравнению с 20-дневными эмбрионами в митохондриях 5-дневных цыплят общая активность фермента подавляется около 40, а Са-АТРаза—60%. В мито-

хондриях годовалых кур по сравнению с цыплятами общая активность фермента несколько повышается, а Са-АТРаза—даже частично подавляется. Как показывают приведенные данные, активность как общей, так и Са-АТРаза в изолированных митохондриях скелетных мышц в постэмбриональном периоде развития птиц заметно подавляется. Известно, что одним из важных свойств актомиозина является АТРазная активность, обеспечивающая сократительную функцию и использование энергии АТФ при выполнении мышечной работы. Имеются данные [13] о наличии природного ингибитора митохондриальной АТРаза, белкового вещества с молекулярной массой около 11000, сильно угнетающего Са-АТРадную активность актомиозина [13]. Подавление АТРазной активности в наших опытах в постэмбриональном периоде в мышечной ткани кур, по-видимому, можно объяснить появлением этого ингибитора в определенный период развития цыпленка. Какова физиологическая роль этого ингибитора в период постэмбрионального развития кур? Можно допустить, что во взаимодействии с актомиозином этот ингибитор оказывает регулирующее влияние на сократительную функцию скелетных мышц, в частности, ограничивает использование энергии АТФ при выполнении мышечной работы.

Электронномикроскопические исследования митохондрий, изолированных из мышц эмбриона показали, что при его развитии форма митохондрий подвергается определенным изменениям. На ранних стадиях (15-дневные эмбрионы) митохондрии в основном округлые, в дальнейшем они приобретают более удлиненную форму (рис. 1, 2). Количество их варьирует в ходе развития эмбриона (табл. 2). В ранних стадиях онтогенеза у 15-дневных эмбрионов наблюдается большое количество митохондрий (в среднем 21 в каждом поле зрения электронного микроскопа). В период вылупления цыпленка их содержание сокращается почти вдвое (12,6 митохондрий).

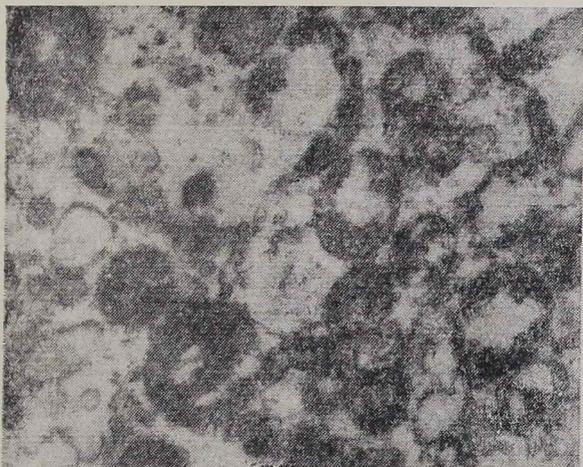


Рис. 1. Митохондрии скелетных мышц 15-дневных куриных эмбрионов.

У 5-дневных цыплят количество митохондрий не изменяется, а в дальнейшем, у годовалых кур, уменьшается (8,8 митохондрий).

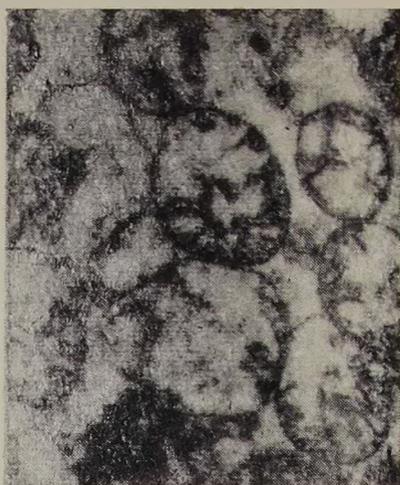


Рис. 2. Митохондрии скелетных мышц годовалых кур.

Таблица 2

Изменение количества митохондрий мышечной ткани кур в различные периоды онтогенетического развития

| Дни развития        | Количество митохондрий |
|---------------------|------------------------|
| 15-дневные эмбрионы | 21,0*                  |
| 20-дневные эмбрионы | 12,6                   |
| 5-дневные цыплята   | 12,6                   |
| Годовалые куры      | 8,8                    |

\* Средние данные подсчета митохондрий на 10—12 поля зрения электронного микроскопа.

Полученные результаты показывают, что при развитии цыпленка митохондрии увеличиваются в размерах (табл. 3). Так, например, средняя длина митохондрий 15-дневных эмбрионов составляет 528 нм, однако у 20-дневных эмбрионов и 5-дневных цыплят она достигает 924 нм, а у годовалых кур—1155 нм. Аналогично изменяется средняя величина ширины митохондрий.

Таблица 3

Изменение величины митохондрий мышечной ткани кур в различные периоды онтогенетического развития, в нм

| Дни развития        | Длина       |              |         | Ширина      |              |         | Длина<br>Ширина |
|---------------------|-------------|--------------|---------|-------------|--------------|---------|-----------------|
|                     | минимальная | максимальная | средняя | минимальная | максимальная | средняя |                 |
| 15-дневные эмбрионы | 132         | 1287         | 528     | 99          | 1089         | 396     | 1,33            |
| 20-дневные эмбрионы | 231         | 2310         | 924     | 165         | 1881         | 693     | 1,33            |
| 5-дневные цыплята   | 396         | 1716         | 924     | 297         | 1155         | 627     | 1,47            |
| Годовалые куры      | 264         | 2343         | 1155    | 231         | 1650         | 825     | 1,40            |

Из табл. 3 видно, что величина соотношения длины к ширине в ходе развития эмбриона увеличивается, достигая максимума у 5-дневных цыплят. На изменение размеров митохондрий указывает также уменьшение количества митохондрий в поле зрения микроскопа.

Сопоставляя полученные нами данные о структурных и функциональных изменениях митохондрий скелетных мышц кур, можно заметить, что хотя количество митохондрий в ходе эмбрионального развития достоверно сокращается, однако их общая энергетическая активность не снижается. в силу того, что в процессе онтогенеза заметно увеличиваются размеры митохондрий и количество крист, и они приобретают более плотный матрикс. Возрастание количества крист и размеров митохондрий и соответственно внутримитохондриальных мембран может свидетельствовать о том, что по мере онтогенетического развития кур митохондрии становятся энергетически более активными.

Приведенные данные, касающиеся изменений изолированных митохондрий мышц в различные периоды онтогенетического развития кур, определенным образом коррелируют с полученными нами результатами биохимического изучения энергетического метаболизма, протекающего в митохондриях в процессе онтогенеза [3—7].

Институт биохимии АН АрмССР

Поступило 27.XII 1979 г.

**ՀԱՎԵՐԻ ՄԿԱՆՆԵՐԻ ՄԻՏՈՔՈՆՈՐԻԱՆԵՐԻ ՖՈՒՆԿՑԻՈՆԱԼ ԵՎ ՈՒԼՏՐԱԿԱՌՈՒՅՎԱԾՔԱՅԻՆ ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏՎՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ ՕՆՏՈԳԵՆԵԶՈՒՄ**

Ռ. Բ. ԹԱԳԱՆՅԱՆ, Ա. Ա. ՍԻՄՈՆՅԱՆ, Ռ. Ա. ՍՏԵՓԱՆՅԱՆ, Լ. Ա. ՇՍԱՎԵՐՈՎԱ

Ուսումնասիրվել են հավերի կմախքային մկաններից անջատված միտոքոնդրիաների ֆունկցիոնալ և էլեկտրոնամանրադիտակային փոփոխությունները օնտոգենեզի տարբեր շրջաններում: Պարզվել է, որ վաղ էմբրիոգենեզում (15 օրական սաղմ) մկանների միտոքոնդրիաներն ավելի մանր են: Հասակին զուգընթաց դրանց չափերը մեծանում են և ավելանում խտրոցների քանակը, էներգետիկ տեսակետից միտոքոնդրիաներն ավելի ակտիվ են դառնում: ԱՏՖային ակտիվությունը մկաններից անջատված միտոքոնդրիաներում, սկսած հավի սաղմի ստղային դարդացման շրջանի սկզբից, ասիճանաբար աճում է մինչև 20 օրական հասակը: Հետսաղմնային շրջանում ֆերմենտի ակտիվությունը հսկայական չափով ճնշվում է, որը բացատրվում է բնական ինհիբիտորի ազդեցությամբ:

**FUNCTIONAL AND ULTRASTRUCTURAL PECULIARITIES OF MITOCHONDRIA OF HEN MUSCLE IN ONTOGENESIS**

R. B. BADALIAN, A. A. SIMONIAN, R. A. STEPANIAN, L. A. SHATVEROVA

Ultrastructural peculiarities of mitochondria isolated from skeletal muscles of hens in ontogenesis have been studied by electronmicroscopic method. General and Ca-ATP-ase activity in mitochondria has been studied. Definite structural-functional changes in those organoids during studied periods of ontogenesis have been exposed.

1. Закутинский Д. И., Селиванова Л. И. Биологическая оценка препаратов для профилактики и лечения лучевой болезни. М., 1960.
2. Пульмен М., Гарбер Е. V Международный биохим. конгресс. Реф. секц. сообщ., II, 406, М., 1961.
3. Симолян А. А., Степанян Р. А. Вопросы биохимии мозга. *б*, 225, 1970.
4. Симолян А. А., Геворкян Г. А., Степанян Р. А. Укр. биохим. журн., 50, 3, 281, 1978.
5. Симолян А. А. Докт. дисс., Ереван, 1973.
6. Симолян А. А., Степанян Р. А., Геворкян Г. А. Тез. Всесоюзн. симпоз.: «Окислительные ферменты животной клетки и регуляция их активности», 41, Горький, 1978.
7. Симолян А. А., Степанян Р. А., Бадалян Р. Б., Геворкян Г. А. Тез. науч. сообщ. IV Всесоюзн. биохим. съезда 2, 168, 1979.
8. Симолян А. А., Абрамян К. С., Ростомян М. А., Степанян Р. А. Биолог. ж. Армении, 26, 2, 33, 1973.
9. Симолян А. А., Абрамян К. С., Геворкян Г. А., Бадалян Р. Б., Шатзерова Л. А. Биолог. ж. Армении, 30, 5, 18, 1977.
10. Lowry O. H., Lopez J. A. J. Biol. Chem., 162, 421, 1946.
11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
12. Reynolds S. J. Cell. Biol., 17, 1, 208, 1963.
13. Yamazaki S., Hasebe H., Takisawa H., Tamaura Y., Inada Y. Biochem. biophys. Res. Communic., 75, 1104, 1977.