

УДК 616.831+612.015.31

Л. А. АВАКЯН, Н. Н. БОГОЛЕПОВ

ИЗМЕНЕНИЕ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ИЗОЛИРОВАННЫХ
МИТОХОНДРИЙ ПОД ВЛИЯНИЕМ ДЕЗОКСИХОЛАТА НАТРИЯ,
ТРИТОНА x-100, ТРИОКСИМЕТИЛАМИНОМЕТАНА

Ультраструктура митохондрий мозга и их изменение при различных патологических процессах являются одним из важных направлений исследований цитологов и нейроморфологов. Литературные данные показали, что реакция митохондрий на различные патологические воздействия заключается в их набухании, сморщивании, уменьшении количества крист, изменении осмиофилии матрикса митохондрий и, в тяжелых случаях, в их фрагментации. Реже можно наблюдать появление включений в органеллах и другие их изменения [7].

Поскольку любая форма патологических изменений митохондрий связана с первичным воздействием на липопротеиновый комплекс мембран митохондрий, изучение реакции наружной, внутренней мембран и крист органелл представляет особый интерес.

Целью настоящей работы было изучение изменений ультраструктуры митохондрий при более или менее избирательном разрушении белков и липидов мембран митохондрий ионными и неионными детергентами, а также изучение влияния на выделенные митохондрии веществ, резко изменяющих осмотическое давление среды.

В работе была изучена динамика ультраструктуры митохондрий при воздействии на них *in vitro* дезоксихолата натрия (ДОКС), тритона x-100, триоксиметиламинометана (ТРИС) и хлористого натрия. При этом ДОКС действует преимущественно на фосфолипидные компоненты мембран [10], тритон x-100—на белковые компоненты [11], ТРИС и хлористый натрий создавали различную осмотическую среду для изменения проницаемости мембран митохондрий [2].

Исследовались митохондрии коры больших полушарий мозга кошек. Всего было использовано 15 животных.

Фракции митохондрий из коры больших полушарий выделяли при помощи дифференциального центрифугирования (центрифуга ЦЛР-1) следующим образом: 10%-ный гомогенат ткани, приготовленный в среде сахарозы (0,25 М) с ЭДТА (0,1 мМ) pH—7,2—7,4, центрифугировали: ядра выделяли при $1000 \times g$ (10') и после промывания отбрасывали. Митохондрии выделяли при $14500 \times g$ (10') и после повторного центрифугирования pripravляли суспензию из расчета 400 мг ткани/мл.

Воздействующий агент в определенных концентрациях (ДОКС—0,15%, 0,25%, 0,75%; тритон x-100—0,1%, 0,17%, 0,25%; ТРИС—0,02 М; хлористый натрий 0,9 М) добавляли к суспензии митохондрий (параллельно ставилась контрольная проба без детергента) и через 30 мин. пробы центрифугировали при $14500 \times g$ в течение 10 мин. Осадок использовали для электронно-микроскопического исследования. Материал фиксировали в течение 2,5 ч. в 1%-ном растворе OsO_4 на 0,1 М фосфатном буфере, pH—7,2—7,4 с добавлением сахарозы для изотоничности среды (0,25 М). Часть материала фиксировали в 6,25%-ном глутаральдегиде на фосфатном буфере с сахарозой 1 ч., с постфиксацией OsO_4 в течение 2 ч. Материал обезвоживали в этиловых спиртах возрастающей концентрации. Окраску производили 1%-ной фосфорновольфрамовой кислотой в абсолютном спирте (3 ч.), заливку—в смеси бутил- и метилметакрилатов в соотношении 5:1 с добавлением 1% катализатора (перекись бензоила). Резку производили на ультрамикротоме типа ЛКБ, просмотр и съемку—на микроскопе УЭМБ-100 А. Срезы докрашивали по методу Рейнольдса [23] в течение 5—15 мин.

Исследование контрольной фракции митохондрий коры больших полушарий показало, что фракция содержит обычные субмикроскопические компоненты: митохондрии, фрагменты миелиновой оболочки, нервные окончания, рибосомы, микросомы, осмиофильные тела и т. д. Ультраструктура выделенных митохондрий хотя и отличается от нормальной структуры этих органелл, наблюдаемой на срезах ткани мозга, является обычной для митохондрий, выделенных из гомогената. Органеллы контрольной пробы характеризуются своей неоднородностью по форме, размерам, электронной плотности и степени их сохранности (рис. 1). Во фракции преобладают слегка вытянутые, овальные митохондрии размером в среднем $2,5 \times 1,1 \mu$, со светлым или осмиофильным матриксом, сохранными внутренней и наружной мембранами, большим и меньшим количеством нередко слегка валуолизированных крист. Реже встречаются округлые и резко вытянутые митохондрии с резко осмиофильным матриксом. В целом ультраструктура митохондрий контрольных фракций сходна с описанной в работах многих авторов [6, 8, 16, 20, 21, 22, 30].

При воздействии ДОКС наблюдаются заметные изменения ультраструктуры митохондрий, при этом отчетливо выявляется динамика патологических изменений в них в зависимости от концентрации детергента. При воздействии ДОКС в концентрации 0,15% (рис. 2а) ультраструктура митохондрий незначительно отличается от контроля, однако можно отметить уменьшение количества крист, просветление матрикса у некоторых органелл. При увеличении концентрации этого детергента до 0,25% наблюдается полное исчезновение крист с одновременным растворением внутренней мембраны (рис. 2б). Матрикс полностью теряет свою осмиофилию, митохондрии выглядят как округлые образования, окруженные однослойной мембраной с неровным контуром. Электронная плотность мембраны неравномерна по окружности митохон-

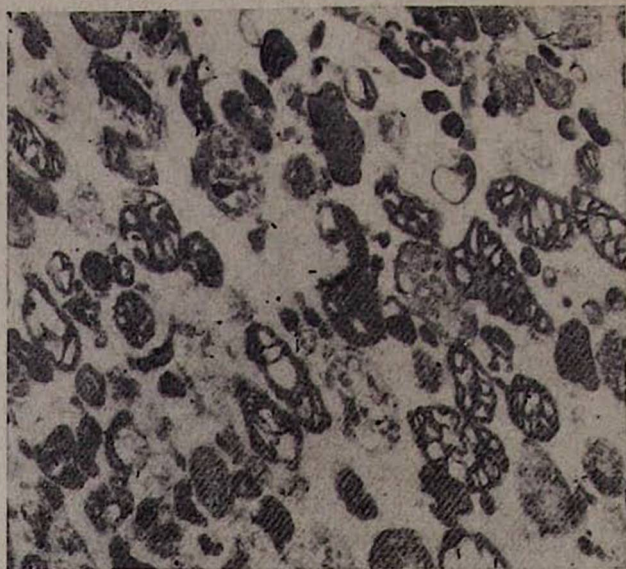


Рис. 1. Электронная микрофотография контрольной фракции митохондрий, выделенных из коры больших полушарий мозга кошки. Фиксация OsO_4 ; ув. $\times 25000$.



Рис. 2а. Электронная микрофотография изолированных митохондрий (ДОКС—0,15%). Фиксация OsO_4 ; ув. $\times 25000$.

дрий, в отдельных местах видны остатки внутренней мембраны и крист. В дальнейшем при увеличении концентрации ДОКС до 0,75% уже не представляется возможным говорить о митохондриях—во фракции можно видеть лишь фрагменты этих органелл, мембраны превращают-

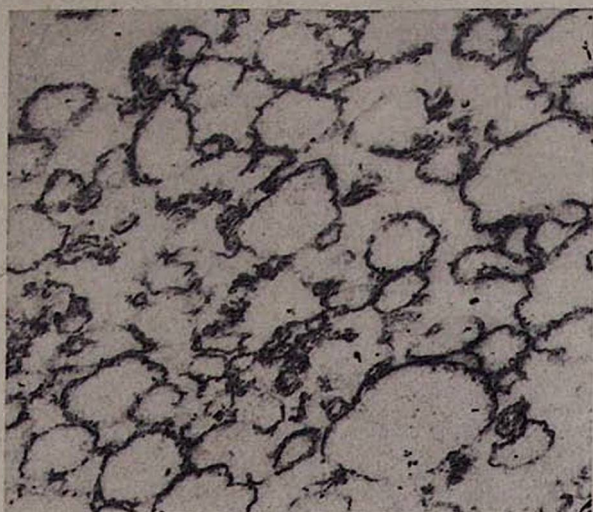


Рис. 26. Электронная микрофотография изолированных митохондрий (ДОКС—0,25%). Фиксация OsO_4 ; ув. $\times 35000$.

ся в округлые везикулярные образования размером в среднем 0,8 μ и еще более мелкие плотные осмиофильные тела.

Раствор тритона х-100 в малых концентрациях (0,1%) не вызывает выраженных изменений большинства митохондрий. Однако среди органелл, сходных с контрольными, встречаются митохондрии, у которых наружная мембрана выпячивается, теряет четкость контура, становится менее осмиофильной. Обработка тритоном х-100 в концентрации 0,17% вызывает заметные изменения ультраструктуры митохондрий (рис. 3).

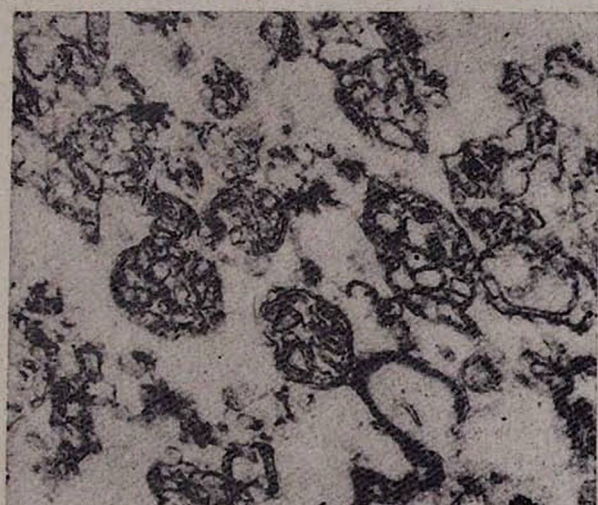


Рис. 3. Электронная микрофотография изолированных органелл (тритон х-100—0,17%). Фиксация OsO_4 ; ув. $\times 35000$.

Особенно резко выражена деструкция наружной мембраны митохондрий: мембрана теряет четкость, местами фрагментируется или даже исчезает. Внутренняя мембрана органелл более сохранна, хотя в некоторых местах также нарушается. Количество и плотность упаковки крист не уменьшается, сохраняется структура матрикса. Часть крист вакуолизирована, в некоторых случаях кристы образуют конгломераты, контактируя между собой. Определенный процент митохондрий при этом воздействии фрагментируется. При обработке большими концентрациями тритона х-100 (0,5%) процесс доходит до полного растворения мембранных компонентов органелл.

Под влиянием ТРИС (0,02 М) митохондрии набухают, отмечается увеличение их размеров, кристы вакуолизируются, снижается электронная плотность матрикса, наблюдается взбухание наружной и внутренней мембран, разрывы и отделение их друг от друга. Однако следует обратить внимание на то, что среди явно набухших органелл встречаются единичные сохраненные митохондрии (рис. 4).

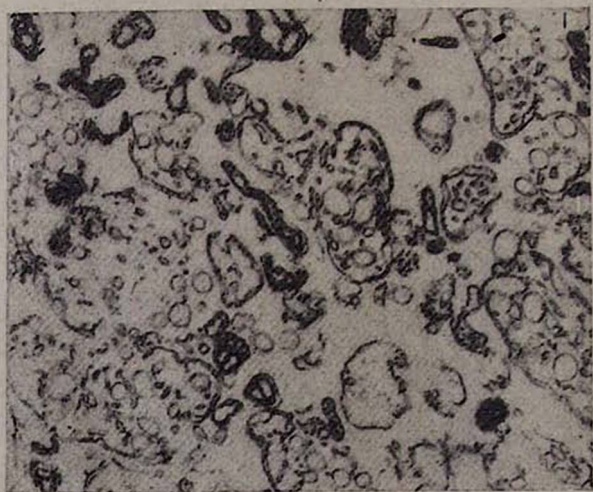


Рис. 4. Электронная микрофотография выделенных митохондрий (ТРИС—0,02 М). Фиксация OsO_4 ; ув. $\times 25000$.

Хлористый натрий (0,9 М) вызывает сжатие органелл (рис. 5). При этом обращает на себя внимание увеличение плотности и осmioфильности матрикса и мембран, отек крист.

Таким образом, полученные данные, показали определенную специфику изменений митохондрий при избирательном преимущественном воздействии на липиды и протеины липопротеинового комплекса мембран митохондрий.

При сопоставлении изменений митохондрий, полученных при воздействии на них, с изменениями митохондрий на срезах ткани при различных патологических процессах можно отметить определенное сходство.

Наиболее распространенной реакцией митохондрий нервных клеток является набухание органелл при ретроградной дегенерации, при гипоксии, при отеке мозга, при воспалительных заболеваниях [1, 5, 7, 9, 29]. Эта реакция, сопровождающаяся потерей крист, рассматривалась в литературе, как защитный компенсаторный процесс в клетке.

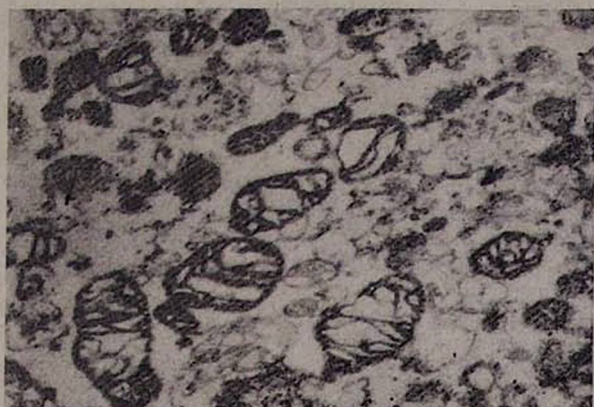


Рис. 5. Электронная микрофотография выделенных митохондрий (NaCl —0,9 М). Фиксация OsO_4 ; ув. $\times 25000$.

Эта морфологическая специфика сочетается с определенными сдвигами метаболизма. Биохимическое исследование фракции показало [2, 4], что метаболизм митохондрий изменяется по-разному при воздействии ДОКС, тритона х-100, хлористого натрия и ТРИС. Установлено, что под влиянием указанных детергентов солюбилизируется ферментный белок, активность которого определяется в растворимой фракции клетки. В случае ферментов, структурированных в митохондриях (цитохромоксидаза, гексокиназа), происходит, по-видимому, освобождение некоторых связей фермента, часть которого до этого находилась в латентной форме. Таким образом, имеет место активации ферментных систем, проявляющаяся в неодинаковой степени как в отношении каждого из использованных детергентов, так и для различных ферментов.

Литературные данные [10] показывают, что при воздействии ДОКС на митохондрии печени увеличивается количество цитохромов в растворимой части суспензии, экстрагированных из выделенных митохондрий. При этом кристы полностью разрушаются, матрикс просветляется, что согласуется с полученными нами данными. На повышение экстракции цитохромов при воздействии ДОКС указывается также в ряде других исследований [2, 10, 14, 18]. В работе Ватсона и Сикевича [27, 28] подчеркивается динамика изменений митохондрий, в разных слоях осадка от поверхности до дна 0,3%-ным раствором ДОКС. Наши данные позволили более четко показать, как изменяются органеллы при воздействии ДОКС в зависимости от его концентрации. Следу-

ет подчеркнуть, что ДОКС, влияя на проницаемость наружной мембраны органеллы, избирательно растворяет внутреннюю мембрану митохондрий. Из этого следует, что обе мембраны имеют разный биологический состав: внутренняя мембрана содержит больше ДОКС-растворимых фосфолипидов, чем наружная, хотя, по данным некоторых авторов [17], общее количество фосфолипидов больше в наружной мембране. Неоднородность состава наружной и внутренней мембран особенно отчетливо показана в работах Чанса и Леви с соавторами [13, 19], которым удалось получить отдельные субфракции наружной и внутренней мембран.

Как уже отмечалось выше, ультраструктурные изменения митохондрий при воздействии тритона х-100 начинаются с растворения наружной мембраны. Тритон х-100 для разрушения мембран использовали и другие авторы [15, 24]. Под влиянием тритона х-100 в митохондриях происходят активация окислительных ферментов, увеличение проницаемости мембран для щелочных ионов [4, 12, 25].

Наши данные указывают, что оба детергента имеют различную точку приложения к ультраструктуре митохондрий.

Воздействие на липопротеиновый комплекс мембран вызывает в ряде случаев набухание или сжатие митохондрий при большем или меньшем изменении их матрикса. Эти изменения органелл могут быть связаны и с изменением осмотического давления в цитоплазме нейрона или в среде выделяемых митохондрий [5, 26].

При экспериментальных воздействиях обнаружено, что не все митохондрии равномерно вовлекаются в процесс и находятся в разной степени патологического нарушения. Это, несомненно, связано с неоднородностью исходного состояния митохондрий.

Наши предыдущие данные по выяснению лабильности мембранных структур показали, что малая концентрация детергентов: ДОКС, тритона х-100—приводит к уменьшению спонтанного набухания митохондрий коры больших полушарий. Интересно отметить, что солюбилизация белков, отмеченная при воздействии детергентов, не сопровождается уменьшением их содержания и составляет 95—103% [3].

На основании результатов, полученных в данной работе, можно сделать заключение о специфическом действии детергентов на ультраструктуру митохондрий: ДОКС преимущественно влияет на внутреннюю мембрану и кристы органелл, а тритон х-100 преимущественно на наружную мембрану.

Неодинаковая чувствительность и реакция обеих мембран органелл наблюдается также в присутствии в среде ТРИС.

Патологические изменения митохондрий *in vitro* в сопоставлении с ультраструктурными изменениями органелл в тканях углубляют наши представления о строении их мембран.

Լ. Ա. ԱՎԱԳՅԱՆ, Ն. Ն. ԲՈԳՈԼԵՊՈՎ

ՄԵԿՈՒՍԱՅՎԱԾ ՄԻՏՈՔՈՆՈՐԻԱՆԵՐԻ ՈՒԼՏՐԱԿԱՆՈՒԹՅՎԱԾՔԻ ՓՈՓՈԽՈՒԹՅՈՒՆԸ
ԴԵՋՕՔՍԻԽՈԼԱՍՏՅՈՒՆ ՆԱՏՐԻՈՒՄԻ, ՏՐԻՏՈՆ X-100-Ի,
ՏՐԻՕՔՍԻՄԵԹԻԼԱՄԻՆՈՍԵԹԱՆԻ ԵՎ ՔԼՈՐԱՅԻՆ ՆԱՏՐԻՈՒՄԻ
ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՏԱԿ

Ա. մ փ ն փ ն լ մ

Ուսումնասիրության է ենթարկվել կատվի ուղեղի մեծ կիսագնդերի կեղևից անջատված միտոքոնդրիանների ենթամիկրոսկոպիական կառուցվածքը դե-
զօքսիխոլատային նատրիումի և տրիտոն X-100-ի ազդեցության տակ,
որոնք առավելապես ընտրողականորեն քայքայում են օրգանիզմների թաղանթ-
ների սպիտակին և լիպիդային կոմպոնենտները, ինչպես նաև տրիօքսիմեթիլ-
ամինոմեթանի և քլորային նատրիումի ազդեցությունը, որոնք խիստ փոփո-
խում են միջավայրի օսմոտիկ ճնշումը:

Աշխատանքում ցույց է տրվում, որ դետերգենտները (դեզօքսիխոլատային
նատրիում և տրիտոն X-100) և հիպոտոնիկ միջավայրը քայքայիչ ազդեցու-
թյուն ունեն միտոքոնդրիանների թաղանթների վրա, միաժամանակ քլորային
նատրիումը առաջացնում է ոչ խիստ կառուցվածքային փոփոխություններ:

Հետազոտությունը բացահայտում է միտոքոնդրիանների արտաքին և ներ-
քին թաղանթների տարբեր մորֆո-բիոքիմիական կառուցվածքը, որով պայ-
մանավորվում է օրգանիզմների ոչ միատեսակ պատասխանը և զգայնությունը
ազդակների նկատմամբ:

Դետերգենտների ազդեցությունը միտոքոնդրիանների վրա սպեցիֆիկ է և
արտահայտվում է օրգանիզմների ինքնատիպ փոփոխություններով:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Боголепов Н. Н. Журнал невропатологии и психиатрии, 1965, 65, 2, стр. 174.
2. Гилудова Г. П. Диссертация. М., 1966.
3. Доведова Е. Л., Авакян Л. А., Боголепов Н. Н. В печати.
4. Доведова Е. Л., Бигль Х. В кн.: Митохондрии. М., 1969, стр. 123.
5. Жаботинский Ю. М. Нормальная и патологическая морфология нейрона. Л., 1965.
6. Машанский В. Ф. В кн.: Руководство по цитологии, т. 1. М.—Л., 1965, стр. 200.
7. Митин К. С. В кн.: Митохондрии. Биохимия и морфология. М., 1957, стр. 98.
8. Петров В. С. Архив анатомии, гистологии и эмбриологии, 1968, IV, 3, стр. 77.
9. Саркисов А. С., Боголепова Н. Н. Электронная микроскопия мозга. М., 1967.
10. Ball E. G., Cliffe D. J. Intern. Rev. Cytol., 1962, 13, 99.
11. Bruungraber E. G. and Aguilar V. J. Neurochem., 1962, 9, 451.
12. Cereijo-Santalo R. Canadian J. of Biochemistry, 1968, 46, 55.
13. Chance B., Parsons D. F., Williams R. R. Science, 1963, 143, 3602, 136.
14. Cooperstein S. J. J. Biological chemistry, 1963, 238, 11, 3750.
15. Fiszer S. and De Robertis E. Brain research, 1967, 5, 31.
16. Грин Д. Е. В кн.: Структурные компоненты клетки. М., 1962, стр. 78.
17. Huet C., Lévy M., Pascaud M. Biochemica et biophysica acta, 1968, 150, 3, 521.
18. Koch R. B. and Lindall A. W. J. Neurochem., 1966, 13, 11, 1231.

19. Lévy M., Toury R., Ardré J. *Bíchimica, Biophysica Acta.*, 1967, 135, 4, 599.
20. Lovtrup Soren. *Proress in brain rescarch.*, 1964, 4, 237.
21. Lovtrup S. and Zelander T. *Experim. coll res.*, 1962, 27, 3, 168.
22. Petrushka E. and Giuditta A. J. *Biophys. and Biochem. Cytol.*, 1959, 6, 129.
23. Reynolds E. S. J. *Coll Biology*, 1963, 17, 208.
24. Roberis de E., Azeurra J. a. Fiszer S. *Brain Research*, 1967, 5, 45.
25. Spirtes M. A. a. Groth P. S. *Nature*, 1961, 190, 4772, 274.
26. Tedeschi H. J. *Biophys., Blochem. cytol.*, 1959, 6, 2, 241.
27. Watson M. L. a. Siekevitz Ph. J. *Biophys., Blochem., Cytol.*, 1956, 4, 2, 379.
28. Watson M. L. a. Siekevitz Ph. J. *Biopys. Blochem. Cytol.*, 1956, 2, 6, 639.
29. Webster H. J. *Coll Biology*, 1962, 12, 361.
30. Whittaker V. P. In: *Regulation of metabolic processes in mitochondria*. Amsterdam—London, 1966, 1.