

А. А. СИМОНЯН

СООТНОШЕНИЕ ОКИСЛЕНИЯ И ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ
В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ КУРИНОГО ЭМБРИОНА
В ТЕЧЕНИЕ ЭМБРИОГЕНЕЗА

В результате сложных биохимических процессов, протекающих в течение развития куриного эмбриона, образуется большое количество свободной энергии, особенно за счет интенсивной утилизации липидов. С 8 дня эмбрионального развития температура тела зародыша начинает постепенно повышаться, превышая температуру поверхности яйца. На 21 день эта разница составляет $5,7^{\circ}$ [1].

В связи с этим представляло интерес изучить динамику окислительного фосфорилирования и свободного окисления в митохондриях печени куриного эмбриона в течение его развития. Исследования проводились с 13 дня развития зародыша до вылупления цыпленка. С 13 дня начинается плодная стадия эмбрионального развития, которая характеризуется тем, что эмбрион уже приобретает те основные черты, которые характерны для теплокровных животных [1—5].

Методика исследования. От эмбриона на холоду быстро извлекали печень, удаляли желчный пузырь, промывали ее 0,25 М раствором сахарозы и гомогенизировали гомогенизатором Поттера [6] в 0,25 М сахарозе при соотношении 1 : 9. Время гомогенизации—20 секунд. Клеточные фракции отделяли дифференциальным центрифугированием в скоростной рефрижераторной центрифуге типа Lourdes модель LRA. Ядра и цитоплазматические обломки отделяли при $700 \times g$, 10 мин., а митохондрии— $9000 \times g$, 10 мин. О чистоте митохондриальной фракции судили, применяя фазово-контрастный микроскоп и определяя сукцинатдегидрогеназную активность [7]. Морфологический контроль показал, что митохондриальная фракция состоит из цельных мелких и крупных митохондрий. Все операции по выделению митохондрий производили при температуре $0-3^{\circ}$.

Изолированные митохондрии инкубировали при 26° в течение 1 часа. Поглощение кислорода измеряли манометрическим способом [8]. Инкубационная смесь содержала в мкмольях: субстрат окисления (сукцинат, глутамат или α -кетоглутарат) — 50, фосфат калия — 40, KCl—100, $MgCl_2$ —10, глюкозы—150, АТФ—3, гексокиназы—0,50—0,75 мг (Sigma) и митохондрии в количестве, соответствующем 2—3 мг белка, рН среды 7,4. Критерием фосфорилирования служило уменьшение свободного фосфата в инкубационной среде после инкубации. Неорганический фосфат определяли по методу Лоури и Лопеза [9] в модификации В. П. Скулачева [10].

Для определения аденозинтрифосфатазной (АТФ-азной) активности брали следующую инкубационную смесь: 0,25 М сахарозы 1,6 мл, АТФ 0,2 мл (20 мг АТФ в 1 мл) и митохондрии из расчета 2—2,5 мг белка, рН смеси—7,4, время инкубации 30 мин.

Количество О и Р рассчитаны на 1 мг белка. Белок определяли по Лоури и сотр. [11].

Результаты исследований. Полученные нами результаты показывают, что, начиная с плодной стадии эмбрионального развития до вылупления цыпленка, в митохондриях печени зародыша соотношение окисления и фосфорилирования (Р/О) понижается. Так, например, при добавлении сукцината Р/О на 13 день достигает $1,70 \pm 0,076$, на 17 день— $1,38 \pm 0,34$, а затем, постепенно понижаясь, у 21-дневного эмбриона оно составляет всего $1,09 \pm 0,037$ (табл. 1). У однодневных цыплят Р/О равняется $1,05 \pm 0,082$, а у 9—17-дневных— $1,07 \pm 0,044$. С увеличением возраста у цыплят соотношение окисления и фосфорилирования в митохондриях печени снова повышается, у 66—77-дневных цыплят составляет $1,25 \pm 0,068$. В наших опытах в митохондриях печени кур Р/О составляло всего $0,94 \pm 0,070$. Приведенные данные показывают, что окислительные процессы и сопряженное фосфорилирование более интенсивно протекают в митохондриях эмбриона, чем у зрелых птиц.

Поглощение кислорода митохондриями при окислении сукцината варьирует в течение развития эмбриона. На 13—15 день отмечается высокий уровень окислительных процессов, который затем постепенно понижается. Сопряженное фосфорилирование в начале плодной стадии протекает более интенсивно, а затем понижается. Так, на 13 день количество эстерифицированного фосфата составляет $10,33 \pm 0,513$, на 17 день— $8,31 \pm 0,579$, а на 20 день— $5,81 \pm 0,272$, а у однодневных цыплят оно достигает $4,98 \pm 0,410$ мкатама Р. Процесс эстерификации фосфата у кур протекает менее интенсивно— $3,06 \pm 0,282$ мкатом Р.

Усиленное эндогенное дыхание митохондрий отмечается на 13—14 день, затем оно понижается и не претерпевает особых изменений до вылупления цыпленка. У кур эндогенное дыхание митохондрий выражено слабее.

При эндогенном дыхании окислительное фосфорилирование как бы отсутствует, и наоборот, в среде увеличивается количество свободного фосфата.

При окислении глутамата Р/О в митохондриях печени эмбриона в течение эмбриогенеза тоже понижается. На 13 день оно составляет $2,13 \pm 0,058$, на 17 день— $1,53 \pm 0,074$, а на 20 день, по сравнению с 13 днем, уменьшается более чем в два раза (табл. 2). У однодневных цыплят Р/О повышается ($1,47 \pm 0,039$). У кур оно составляет $1,69 \pm 0,149$.

В этих опытах в начале плодной стадии развития эмбриона поглощение кислорода митохондриями высокое, а в течение последующих дней оно несколько замедляется. Аналогичное явление отмечается и в отношении процесса сопряженного фосфорилирования.

Соотношение дыхания и фосфорилирования при окислении α -кето-

Таблица Г

Соотношение окисления и фосфорилирования в митохондриях печени куриного эмбриона в течение эмбриогенеза, субстрат сукцинат ($M \pm m$)

Дни развития эмбриона	Эндогенное дыхание			Сукцинат		
	ΔO мкатома	ΔP^* мкатома	P/O	ΔO мкатома	ΔP мкатома	P/O
13	$0,69 \pm 0,070$ (6)	$0,80 \pm 0,147$ (6) $t=5,7$	—	$6,26 \pm 0,316$ (11) T=14 P<0,001	$10,33 \pm 0,513$ (11) $t=20$	$1,70 \pm 0,076$ (11) $t=24$
14	$0,35 \pm 0,065$ (6)	$0,67 \pm 0,179$ (6) $t=3,7$	—	$6,79 \pm 0,583$ (9) T=11 P<0,001	$9,47 \pm 0,940$ (9) $t=10$	$1,41 \pm 0,061$ (9) $t=23$
15	$0,32 \pm 0,100$ (7)	$0,46 \pm 0,100$ (7) $t=4,6$	—	$6,25 \pm 0,225$ (17) T=24 P<0,001	$11,27 \pm 0,943$ (17) $t=12$	$1,76 \pm 0,114$ (17) $t=16$
16	$0,15 \pm 0,016$ (6)	$0,40 \pm 0,089$ (6) $t=5$	—	$6,54 \pm 0,508$ (14) T=12 P<0,002	$9,68 \pm 0,773$ (14) $t=12$	$1,45 \pm 0,032$ (14) $t=48$
17	$0,07 \pm 0,013$ (6)	$0,36 \pm 0,115$ (6) $t=3,2$	—	$5,91 \pm 0,351$ (26) T=16 P<0,001	$8,31 \pm 0,579$ (26) $t=14$	$1,38 \pm 0,034$ (26) $t=46$
18	$0,49 \pm 0,143$ (7)	$0,31 \pm 0,061$ (7) $t=5$	—	$5,24 \pm 0,253$ (20) T=16 P<0,001	$6,27 \pm 0,528$ (20) $t=11$	$1,16 \pm 0,043$ (20) $t=29$
19	$0,29 \pm 0,041$ (6)	$0,59 \pm 0,143$ (6) $t=4,2$	—	$5,23 \pm 0,342$ (14) T=14 P<0,001	$6,05 \pm 0,372$ (14) $t=16$	$1,16 \pm 0,015$ (14) $t=77$
20	$0,22 \pm 0,042$ (6)	$0,74 \pm 0,117$ (6) $t=6$	—	$5,06 \pm 0,113$ (6) T=40 P<0,001	$5,81 \pm 0,272$ (6) $t=21$	$1,14 \pm 0,049$ (6) $t=23$
21	$0,35 \pm 0,011$ (6)	$0,53 \pm 0,180$ (6) $t=28$	—	$5,61 \pm 0,370$ (6) T=24 P<0,001	$6,05 \pm 0,292$ (6) $t=20$	$1,09 \pm 0,037$ (6) $t=29$
дн. цыпл.	$0,45 \pm 0,121$ (6)	$0,89 \pm 0,138$ (6) $t=64$	—	$4,81 \pm 0,492$ (6) T=8 P<0,001	$4,98 \pm 0,410$ (6) $t=12$	$1,05 \pm 0,082$ (6) $t=23$
17-дневн. цыпл.	$0,81 \pm 0,148$ (7)	$0,96 \pm 0,114$ (7) $t=8,7$	—	$11,95 \pm 0,778$ (13) T=14 P<0,001	$12,05 \pm 0,739$ (13) $t=16$	$1,07 \pm 0,044$ (13) $t=26$
6-77-дневн. цыпл.	$0,35 \pm 0,007$ (6)	$0,95 \pm 0,010$ (6) $t=95$	—	$4,31 \pm 0,289$ (6) T=14 P<0,001	$5,38 \pm 0,417$ (6) $t=13$	$1,25 \pm 0,068$ (6) $t=20$
петух	$0,28 \pm 0,051$ (6)	$1,22 \pm 0,178$ (6) $t=6,8$	—	$3,15 \pm 0,232$ (6) T=12 P<0,001	$3,06 \pm 0,282$ (6) $t=10$	$0,94 \pm 0,070$ (6) $t=13$

* Количество свободного фосфата.

Таблица 2

Соотношение окисления и фосфорилирования в митохондриях печени куриного эмбриона в течение его развития, субстрат окисления глутамат ($M \pm m$)

Дни развития эмбриона	Эндогенное дыхание			Глутамат		
	ΔO мкато-мы	ΔP^* мкато-мы	P/O	ΔO мкато-мы	ΔP мкато-мы	P/O
13	$0,64 \pm 0,083$ (6)	$0,74 \pm 0,146$ (6) $t=5,3$	—	$2,61 \pm 0,132$ (7) $T=13$ $P < 0,001$	$5,68 \pm 0,173$ (7) $t=33$	$2,13 \pm 0,058$ (7) $t=42$
14	$0,67 \pm 0,138$ (6)	$0,81 \pm 0,104$ (6) $t=8$	—	$2,96 \pm 0,062$ (11) $T=15$ $P < 0,001$	$6,57 \pm 0,159$ (11) $t=41$	$2,21 \pm 0,040$ (11) $t=15$
15	$0,43 \pm 0,140$ (6)	$0,65 \pm 0,100$ (6) $t=6,5$	—	$3,22 \pm 0,352$ (6) $T=23$ $P < 0,001$	$6,63 \pm 0,678$ (6) $t=9,8$	$2,06 \pm 0,040$ (6) $t=5,1$
16	$0,27 \pm 0,012$ (6)	$0,30 \pm 0,027$ (6) $t=10$	—	$3,53 \pm 0,052$ (7) $T=65$ $P < 0,001$	$8,10 \pm 0,427$ (7) $t=19$	$2,25 \pm 0,097$ (7) $t=25$
17	$0,44 \pm 0,020$ (6)	$0,46 \pm 0,027$ (6) $t=17$	—	$3,18 \pm 0,390$ (8) $T=7,2$ $P < 0,001$	$5,00 \pm 0,867$ (8) $t=5,8$	$1,53 \pm 0,074$ (8) $t=21$
18	$0,15 \pm 0,006$ (7)	$0,45 \pm 0,015$ $t=30$	—	$2,52 \pm 0,190$ (6) $T=13$ $P < 0,001$	$4,08 \pm 0,440$ (6) $t=9$	$1,59 \pm 0,054$ (6) $t=32$
19	$0,55 \pm 0,064$ (6)	$0,56 \pm 0,041$ (6) $t=14$	—	$2,57 \pm 0,056$ (8) $T=25$ $P < 0,001$	$4,20 \pm 0,422$ (8) $t=10$	$1,43 \pm 0,044$ (8) $t=35$
20	$0,22 \pm 0,008$ (6)	$0,77 \pm 0,006$ (6) $t=125$	—	$1,70 \pm 0,046$ (6) $T=35$ $P < 0,001$	$1,54 \pm 0,108$ (6) $t=1,4$	$0,90 \pm 0,037$ (6) $t=24$
21	$0,35 \pm 0,123$ (6)	$0,63 \pm 0,016$ (6) $t=39$	—	$3,91 \pm 0,264$ (8) $T=134$ $P < 0,001$	$5,42 \pm 0,331$ (8) $t=16$	$1,35 \pm 0,041$ (8) $t=33$
1-дн. цыпл.	$0,34 \pm 0,123$ (6)	$0,68 \pm 0,073$ (6) $t=9,7$	—	$4,00 \pm 0,065$ (8) $T=26$ $P < 0,001$	$6,02 \pm 0,122$ (8) $t=50$	$1,47 \pm 0,039$ (8) $t=37$
66—77-днев. цыпл.	$0,35 \pm 0,007$ (6)	$0,95 \pm 0,010$ (6) $t=45$	—	$2,33 \pm 0,418$ (6) $T=4,8$ $P < 0,001$	$4,13 \pm 0,457$ (5) $t=9$	$1,91 \pm 0,240$ (6) $t=8$
Петух	$0,31 \pm 0,031$ (6)	$1,02 \pm 0,045$ (6) $t=25$	—	$1,66 \pm 0,058$ (6) $T=22$ $P < 0,001$	$2,76 \pm 0,162$ (6) $t=17$	$1,69 \pm 0,149$ (6) $t=12$

* Количество свободного фосфата.

Таблица 3

Соотношение окисления и фосфорилирования в митохондриях печени куриного эмбриона в течение эмбриогенеза, субстрат окисления α -кетоглутарат ($M \pm m$)

Дни развития эмбриона	Эндогенное дыхание			α -кетоглутарат		
	ΔO мкато- мы	ΔP^* мкато- мы	P/O	ΔO мкато- мы	ΔP мкато- мы	P/O
13	$0,73 \pm 0,043$ (6)	$0,64 \pm 0,100$ (6) t=6	—	$2,64 \pm 0,096$ (7) T=19 P<0,001	$5,05 \pm 0,235$ (7) t=21	$1,90 \pm 0,063$ (7) t=30
14	$0,68 \pm 0,027$ (6)	$0,73 \pm 0,009$ (6) t=81	—	$4,47 \pm 0,313$ (7) T=12 P<0,001	$7,92 \pm 0,312$ (7) t=25	$1,78 \pm 0,077$ (7) t=23
15	$0,67 \pm 0,123$ (6)	$0,67 \pm 0,166$ (6) t=6	—	$5,42 \pm 0,062$ (7) T=35 P<0,001	$9,66 \pm 0,251$ (7) t=38	$1,77 \pm 0,041$ (7) t=43
16	$0,26 \pm 0,039$ (6)	$0,40 \pm 0,016$ (6) t=25	—	$3,73 \pm 0,320$ (8) T=32 P<0,001	$6,64 \pm 0,365$ (8) t=18	$1,81 \pm 0,080$ (8) t=22
17	$0,10 \pm 0,090$ (6)	$0,53 \pm 0,092$ (6) t=58	—	$4,17 \pm 0,199$ (9) T=44 P<0,001	$6,67 \pm 0,306$ (9) t=21	$1,59 \pm 0,072$ (9) t=22
18	$0,15 \pm 0,007$ (6)	$0,34 \pm 0,054$ (6) t=63	—	$3,86 \pm 0,095$ (8) T=40 P<0,001	$6,33 \pm 0,530$ (6) t=12	$1,67 \pm 0,096$ (8) t=17
19	$0,48 \pm 0,025$ (6)	$0,43 \pm 0,026$ (6) t=16	—	$4,16 \pm 0,170$ (9) T=21 P<0,001	$7,13 \pm 0,324$ (9) t=22	$1,70 \pm 0,037$ (9) t=50
20	$0,26 \pm 0,022$ (6)	$0,56 \pm 0,045$ (6) t=12	—	$3,17 \pm 0,109$ (6) T=27 P<0,001	$5,78 \pm 0,067$ (6) t=85	$1,83 \pm 0,067$ (6) t=27
21	$0,37 \pm 0,014$ (6)	$0,49 \pm 0,020$ (6) t=24	—	$2,72 \pm 0,170$ (8) T=14 P<0,001	$4,37 \pm 0,356$ (8) t=12	$1,57 \pm 0,094$ (8) t=16
1-дн. цыпл.	$0,27 \pm 0,023$ (6)	$0,95 \pm 0,092$ (6) t=10	—	$4,41 \pm 0,114$ (7) T=36 P<0,001	$6,13 \pm 0,095$ (7) t=64	$1,39 \pm 0,075$ (7) t=18
9—17-дн. цыпл,	$0,99 \pm 0,041$ (7)	$0,96 \pm 0,123$ (7) t=7	—	$6,18 \pm 0,535$ (6) T=9 P<0,001	$9,55 \pm 0,474$ (6) t=20	$1,48 \pm 0,084$ (6) t=17
66—77- дневн. цыпл.	$0,35 \pm 0,007$ (6)	$0,95 \pm 0,010$ (6) t=95	—	$2,37 \pm 0,185$ (6) T=11 P<0,001	$4,33 \pm 0,209$ (6) t=20	$1,85 \pm 0,067$ (6) t=27
Петух	$0,34 \pm 0,024$ (6)	$1,04 \pm 0,062$ (6) t=16	—	$3,62 \pm 0,049$ (6) T=62 P<0,001	$5,48 \pm 0,063$ (6) t=87	$1,52 \pm 0,066$ (6) t=23

* Количество свободного фосфата.

глутарата в ходе развития эмбриона в митохондриях печени также понижается. На 13 день Р/О составляет $1,90 \pm 0,063$, на 17 день— $1,59 \pm 0,072$, на 21 день— $1,57 \pm 0,094$ (табл. 3). У однодневных цыплят Р/О снижается еще больше ($1,39 \pm 0,075$), а у 9—17 и 66—77-дневных цыплят Р/О вновь повышается 1,48 и 1,85 соответственно. У зрелых кур Р/О составляет $1,52 \pm 0,066$.

При окислении α -кетоглутарата количество поглощенного кислорода митохондриями и интенсивность связывания фосфата варьируют в течение эмбриогенеза.

АТФ-азная активность в митохондриях печени в течение развития эмбриона повышается (табл. 4). На 13 день количество отщепившегося

Таблица 4

АТФ-азная активность в митохондриях печени куриного эмбриона в течение эмбриогенеза

Дни развития эмбриона	Р мкатома	t*	Дни развития эмбриона	Р мкатома	t*
	M±m			M±m	
13	$1,31 \pm 0,100$ (17)	13	19	$1,76 \pm 0,143$ (6)	12
14	$1,53 \pm 0,225$ (5)	7	20	$1,97 \pm 0,150$ (5)	12
15	$1,58 \pm 0,182$ (6)	8	21	$1,98 \pm 0,278$ (5)	7
16	$1,74 \pm 0,281$ (5)	6	1-дневн. цыпленок	$2,29 \pm 0,156$ (7)	14
17	$1,70 \pm 0,183$ (6)	9	9—17-дневн. цыпленок	$3,42 \pm 0,170$ (7)	20
18	$1,75 \pm 0,112$ (8)	15	Петух	$1,89 \pm 0,020$ (6)	94

* Статистическая достоверность ряда.

фосфата составляет $1,31 \pm 0,100$, на 16 день— $1,74 \pm 0,281$ мкатома, затем, постепенно повышаясь, на 20 день оно составляет $1,97 \pm 0,150$. Высокая активность АТФ-азы отмечается у одно- и 9—17-дневных цыплят (количество фосфата $2,29 \pm 0,156$ и $3,42 \pm 0,170$ мкатома соответственно). АТФ-аза менее активна у зрелых кур— $1,89 \pm 0,020$ мкатома Р.

В ы в о д ы

Результаты проведенных исследований показывают, что в митохондриях печени куриного эмбриона, начиная с плодной стадии эмбрионального развития вплоть до вылупления цыпленка, соотношение окисления и фосфорилирования понижается.

Параллельно с понижением окислительного фосфорилирования усиливается свободное окисление, в результате чего увеличивается количе-

ство свободной энергии. Благодаря этим энергетическим сдвигам по мере развития эмбриона повышается его температура. В течение эмбриогенеза повышается также АТФ-азная активность митохондрий печени.

Институт биохимии

АН АрмССР

Поступило 14.VII 1965 г.

Ա. Ա. ՄԻՄՈՆՅԱՆ

ՕՔՍԻԴԱՑՄԱՆ ԵՎ ՖՈՍՖՈՐԻԼԱՑՄԱՆ ՀԱՐԱԲԵՐԱԿՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՀԱՎԻ ՍԱՀՄԻ
ԼՅԱՐԴԻ ՄԻՏՈՔՈՆԴՐԻԱՆԵՐՈՒՄ ԷՄԲՐԻՈԳԵՆԵՋԻ ԸՆԹԱՑՔՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ու մ

Այս աշխատության մեջ մենք ուսումնասիրել ենք օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացման դինամիկան հավի սաղմի լյարդի միտոքոնդրիաներում՝ նրա զարգացման ընթացքում: Կատարված հետազոտությունների արդյունքները ցույց են տալիս, որ հավի սաղմի միտոքոնդրիաներում, սկսած էմբրիոնալ զարգացման պտղային ստադիայի սկզբից մինչև ձտի դուրս գալը, օքսիդացման և ֆոսֆորիլացման հարաբերակցությունը աստիճանաբար իջնում է: Օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացման մակարդակի իջեցմանը զուգընթաց բարձրանում է ազատ օքսիդացումը, որի հետևանքով ինկուբացման վերջում զգալիորեն բարձրանում է սաղմի մարմնի ջերմաստիճանը: Էմբրիոգենեզի ընթացքում բարձրանում է նաև ադենոզինտրիֆոսֆատազայի ակտիվությունը սաղմի լյարդի միտոքոնդրիաներում:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Отрыганьев Г. К., Хмыров В. А., Колобов Г. М. Инкубация, М., 1964.
2. Рагозина М. Н., Изв. АН СССР, серия биол., 4, 95—111, 1955.
3. Рагозина М. Н. ДАН СССР, 89, 4, 1953.
4. Шмидт Г. А. Тр. Ин-та морф.-живот. им. А. Н. Северцова, 12, 1954.
5. Шмидт Г. А. Эмбриология животных, ч. II, М., 1953.
6. Potter V. R. and Elvehjem C. A. J. Biol. Chem. 114, 2, 495—504, 1936.
7. Wattenberg L. W. and Leong J. L. J. Histochem. Cytochem. 8, 296, 1960.
8. Умбрейт В. В., Буррис Р. Х., Штауффер Дж. Ф. Манометрические методы изучения тканевого обмена. М., ИЛ., 1951.
9. Lowry O. H. and Lopez J. A. J. Biol. Chem., 162, 421, 1946.
10. Скулачев В. П. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи, М., 1962.
11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.