

определением среднего эффективного времени [1]. В качестве примера в таблице приведены данные о продолжительности местноанестезирующего действия новокаина, лидокаина и тримекаина, соответствующие результатам их клинической апробации.

Таким образом, предлагаемая нами модификация для определения продолжительности местноанестезирующего действия при проводниковой анестезии имеет преимущества в отношении способа введения и регистрации, обеспечивает широкую наглядность при работе с большой группой животных, приводит к экономии животных и времени проведения эксперимента. Метод прост и доступен для применения в фармакологических лабораториях и в демонстрационных целях.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бельский М. В кн.: Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. 148. Т. 1963.
2. Розин М. А. В кн.: Фармакология патологических процессов. 269, 1951.
3. Adams H. I. et al. Arch. in Pharmacol., 224, 2: 275—282, 1976.

Поступило 15.VI.1987 г.

Биол. ж. Армении, т. 41, № 1, 64—67, 1988

УДК 577.15—577.3±591.39

### АКТИВНОСТЬ ДЕГИДРОГЕНАЗ МОЗГА ЭМБРИОНА КУР ПРИ ИНКУБИРОВАНИИ ЯИЦ В УСЛОВИЯХ ПЕРЕМЕННЫХ ТЕМПЕРАТУР

А. А. СИМОНЯН, Р. А. СТЕПАНЯН, Р. А. СИМОНЯН, Г. Г. БАТИКЯН

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

**Ключевые слова:** яйца кур, дигидроксиацетил-, изоцитратдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа.

На необходимость создания условий для теплоотдачи инкубируемыми яйцами обращали внимание многие исследователи. В этих целях рекомендовалось общее снижение температуры во вторую половину инкубационного периода. На наш взгляд, целесообразнее поддерживать стабильную температуру с ежедневным периодическим охлаждением в определенные часы суток, способствующим лучшей теплоотдаче и более интенсивному газообмену в связи с изменением внутрияичного давления, что в свою очередь обуславливает высокую жизнеспособность молодняка. Однако, если практический аспект влияния периодического умеренного охлаждения на организм развивающегося птенца в какой-то степени отработан, то биохимическая сторона вопроса не затронута вовсе. Можно предположить, что периодическое искусственное охлаждение эмбриона в первую очередь затрагивает процессы энергообмена, активирует реакции образования энергии из новых дополнительных источников в клетке. Ранее нами было показано, что в условиях колебательной температуры в яйцах происходит разобщение окислительного фосфорилирования с преобладанием свободного окисления и значительно повышается активность АТФазы [4].

В настоящем сообщении приводятся результаты изучения влияния кратковременного охлаждения яиц в период инкубации на активность

лактадегидрогеназы (ЛДГ) и изоцитратдегидрогеназы (ИЦДГ) мозга в разные периоды эмбрионального и раннего постэмбрионального развития кур.

**Материал и методики.** Работа проведена в лаборатории эмбриологии Института Селекции АН АрмССР в 1985 г. Опыты проводили на 15-, 20-дневных эмбрионах и цыплятах. Яйца охлаждали с 10-го дня инкубации при 20° в течение 30 мин путем отключения системы обогрева и увлажнения инкубатора. Охлаждение повторяли трех-, четырех- и пятикратно в течение суток. Яйца контрольной группы инкубировали при стабильной температуре, как это предусмотрено в правилах по инкубации (температура 37,5°, относительная влажность 50—60%).

Методы выделения ферментного препарата и общей активности ЛДГ подробно описаны в нашей предыдущей работе [2]. Активность ИЦДГ определяли по методу Габбеса и сопр. [3], количество mitochondrialного и цитоплазматического белка — по Лоури и сопр. [7].

**Результаты и обсуждение.** Ткань мозга, как и большинство тканей животных, содержит две изоцитратдегидрогеназы, отличающиеся кофакторной специфичностью, конформационными и кинетическими характеристиками, особенностями локализации и функционирования в клетке. НАД-ИЦДГ рассматривается как «истинный компонент» цикла Кребса и локализуется исключительно в митохондриальной фракции, НАДФ-ИЦДГ обнаружена как в митохондриальной, так и цитоплазматической фракциях клеток [4, 6]. Основная функция цитоплазматической НАДФ-ИЦДГ состоит в генерировании НАДФН, необходимого для различных биосинтетических процессов. Участие митохондриальной НАДФ-ИЦДГ в энергетическом метаболизме, как полагают, опосредовано через НАДФ:НАД-трансоксидазную реакцию (НАДФ:НАД-оксидоредуктаза) [8]. В нашей лаборатории ранее изучался характер течения этих реакций в ходе эмбрионального развития сельскохозяйственных птиц [1]. Выявлено пресатлирование активности НАДФ-ИЦДГ над НАД-зависимым ферментом в период эмбрионального развития кур.

Результаты настоящих исследований показали, что в норме активность НАДФ-ИЦДГ в митохондриальной фракции мозга в процессе эмбрионального развития заметных изменений не претерпевает (табл. 1).

таблица 1. Влияние переменных температур на активность НАДФ-ИЦДГ в субцелочных образованиях мозга куриных эмбрионов и цыплят, мкмоль НАДФН/мг белка/30 мин.

| Возраст развития    | Источник фермента | Контроль | Трехкратное охлаждение | Прирост активности, % | Четырехкратное охлаждение | Прирост активности, % | Пятикратное охлаждение | Прирост активности, % |
|---------------------|-------------------|----------|------------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| 1-дневные эмбрионы  | митохондрии       | 0,051*   | 0,058                  | 13,7                  | 0,062**                   | 21,5                  | 0,066**                | 17,6                  |
|                     | цитоплазма        | 0,037    | 0,038                  |                       | 0,038                     |                       | 0,043**                | 16,2                  |
| 10-дневные эмбрионы | митохондрии       | 0,057    | 0,064                  | 12,3                  | 0,078**                   | 36,8                  | 0,069**                | 21,0                  |
|                     | цитоплазма        | 0,015    | 0,034                  |                       | 0,036                     |                       | 0,037                  |                       |
| цыплята             | митохондрии       | 0,019    | 0,026**                | 36,8                  | 0,026**                   | 36,8                  | 0,027**                | 42,1                  |
|                     | цитоплазма        | 0,024    | 0,025                  |                       | 0,025                     |                       | 0,025                  |                       |

\*\* Статистически достоверные данные.

\* Средние данные из пяти опытов.

В период раннего постэмбрионального развития по сравнению с плодным активностью фермента резко падает (в 2,7 раза). Цитоплазматический фермент подвергается аналогичным изменениям. При охлаждении яиц активность митохондриального фермента в эмбриональном периоде за счет его возрастает (особенно при четырехкратном охлаждении), а цитоплазматический — почти не меняется, исключение составляют 15-дневные эмбрионы, у которых при пятикратном охлаждении наблюдается некоторое падение этого показателя.

Значительное антагонирование НАДФ-НДГ при охлаждении яиц отмечается в митохондриях 5-дневных цыплят (от 36,8 до 42,1% в зависимости от режима охлаждения яиц).

На основании полученных результатов можно предположить, что под влиянием переменной температуры окисление изолимонной кислоты в митохондриях задерживается, причем прирост  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты происходит в зависимости от частоты охлаждения яиц. Этот процесс особенно усиливается в период интенсивного липогенеза, связанного с миелинизацией мозга. Образующийся при этом НАДФН может быть использован в разнообразных реакциях восстановительных биосинтезов. По-видимому, наблюдаемое повышение жизнеспособности цыплят при умеренном охлаждении яиц связано и со стимулированием этой реакции.

Таблица 2. Влияние переменных температур на активность ЛДГ в субклеточных образованиях мозга куринных эмбрионов и цыплят, мкмоль пиридиннуклеотида/мг белка/мин

| Дли-<br>развития       | Источник<br>фермента | Кофери-<br>ры | Контроль | Трехкрат-<br>ное охлаж-<br>дение | При ост.<br>активно-<br>сти, % | Частота<br>кратное<br>охлажде-<br>ние | Прирост<br>активности,<br>% |
|------------------------|----------------------|---------------|----------|----------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|
| 15-дневные<br>эмбрионы | цитоплазма           | НАД           | 0,36     | 0,81*                            | 44,6                           | 0,71*                                 | 36,8                        |
|                        |                      | НАДН          | 0,69     | 0,85*                            | 27,5                           | 0,76                                  | 10,1                        |
|                        | митохонд-<br>рии     | НАД           | 0,41     | 0,54*                            | 31,7                           | 0,51*                                 | 24,4                        |
|                        |                      | НАДН          | 0,48     | 0,68*                            | 41,6                           | 0,61*                                 | 27,0                        |
| 20-дневные<br>эмбрионы | цитоплазма           | НАД           | 0,69     | 1,15*                            | 29,2                           | 1,17*                                 | 31,4                        |
|                        |                      | НАДН          | 1,18     | 1,30                             | 10,2                           | 1,38                                  | 16,9                        |
|                        | митохонд-<br>рии     | НАД           | 0,41     | 0,75*                            | 23,0                           | 0,68                                  | 11,5                        |
|                        |                      | НАДН          | 0,70     | 0,89*                            | 27,1                           | 0,85*                                 | 21,4                        |
| 5-дневные<br>цыплята   | цитоплазма           | НАД           | 0,67     | 0,87*                            | 30,0                           | 0,80                                  | 14,3                        |
|                        |                      | НАДН          | 1,00     | 1,27*                            | 27,0                           | 1,05                                  | 6,0                         |
|                        | митохонд-<br>рии     | НАД           | 0,43     | 0,63                             | 18,8                           | 0,60                                  | 13,2                        |
|                        |                      | НАДН          | 0,54     | 0,65*                            | 26,0                           | 0,68*                                 | 26,0                        |

\* Статистически достоверные данные.

В табл. 2 приведены результаты изучения активности ЛДГ под влиянием переменной температуры инкубирования яиц в разные периоды развития птенца. В контрольных опытах в цитоплазме и митохондриях активность НАД- и НАДН-ЛДГ в ходе эмбрионального развития птенца заметно увеличивается. У 5-дневных цыплят образование лактата и пирувата несколько подавляется по сравнению с периодом выклева.

Под влиянием трехкратного охлаждения яиц в разные периоды индивидуального развития кур прирост активности НАД-ЛДГ в цитоплазме достигает от 29,2 до 44,6% по сравнению с контролем. В меньшей степени, но также повышается активность НАДН-ЛДГ. Аналогичная картина активирования двух форм ЛДГ отмечается и при четырехкратном охлаждении яиц. Однако в условиях нашего опыта в митохондриальной фракции наблюдается обратная картина активирования фермента: прирост активности НАДН-ЛДГ намного превалирует над НАД-ЛДГ.

Таким образом, под влиянием низких температур инкубирования яиц происходит заметное активирование двух форм ЛДГ. Однако этот процесс не равнозначен для митохондриального и цитоплазматического фермента. Холодовой фактор в цитоплазме больше ускоряет реакции образования пирувата, чем лактата, стимулируя этим путем процессы аэробного окисления и компенсируя недостаток теплоотдачи. Имеются данные о том, что при адаптации теплокровных животных к многократным переохлаждениям обмен углеводов в ткани головного мозга направлен на образование фосфорилированных форм глюкозы, которые вовлекаются в метаболизм по основным и шунтовым путям. Происходит качественная и количественная перестройка во взаимоотношениях этих метаболических путей. При этом интенсивность протекания окислительных процессов в клетке во многом зависит от состояния ферментов цикла трикарбоновых кислот. В окислительных процессах ткани мозга при адаптации теплокровных животных к холоду выделяется надлежащее место сукцинат- и изоцитратдегидрогеназам. В наших экспериментах активирование митохондриального НАДФ-НДГ головного мозга свидетельствует о стимулировании реакций цикла трикарбоновых кислот в мозге птенца при кратковременном охлаждении инкубируемых яиц. Одновременно в митохондриях заметно увеличивается количество поглощенного кислорода [4]. В условиях пониженных температур в мозге может происходить также интенсивное окисление неэтерифицированных жирных кислот, являющихся источником энергии. С другой стороны, увеличение дыхания мозга охлажденных птенцов может быть связано с усилением окисления дикарбоновых кислот. Отмеченные сдвиги являются важными компенсаторными процессами, обеспечивающими последующий выход цыпленка из состояния гипотермии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Арутюнян Л. А., Симосян А. А., Симосян Р. А. Цитохимия, 2, 4, 417, 1983.
2. Батикян Г. Г., Симосян А. А. Биолог. ж. Армении, 34, 8, 807, 1981.
3. Ефремов Н. Д., Вольский Г. Г. В кн.: Методы биохимических исследований, 212, 11., 1982.
4. Симосян А. А., Симосян Р. А., Месроbian Е. Б. Биолог. ж. Армении, 10, 5, 387, 1987.
5. Cartier M., Pantaloni D. Eur. J. Biochem., 37, 2, 311, 1973.
6. Fatima H. R., Datziel K. Biochim. Biophys. Acta, 631, 1, 11, 1980.
7. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
8. Stein A. M., Stein J. H., Kirkman S. K. Biochemistry, 9, 3, 1970-1972.

Поступило 8.IV 1988 г.