

УДК 577.15+577.3+591.39

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ МИТОХОНДРИЙ МОЗГА ПРИ  
СОВМЕСТНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ НА ОРГАНИЗМ КУРИНЫХ  
ЭМБРИОНОВ НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ СРЕДЫ  
ИНКУБИРОВАНИЯ И УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ОБЛУЧЕНИЯ.

СИМОНЯН А. А., СТЕПАНЯН Р. А., БАДАЛЯН Р. Б., АКОПОВА Т. М.

Институт биохимии им. Г. Х. Бунятыяна НАН РА, Ереван

Изучено влияние кратковременных охлаждений инкубируемых куриных яиц в сочетании с ультрафиолетовым облучением на интенсивность течения в митохондриях мозга процессов окисления и изменения аденозинтрифосфатазной и креатинкиназной активности. Показано, что в отдельности низкие температуры и облучение способствуют стимулированию реакций окислительного фосфорилирования, однако при совместном действии этот эффект заметно уменьшается. В плодном периоде развития (15-суточные эмбрионы) уровень гидролитического расщепления АТФ оказывается достаточно высоким; в последующие сроки имеет место перераспределение этих процессов между отдельными структурными образованиями нервной клетки. Исследование активности креатинкиназы выявило превалирование активности фермента в эмбриональной стадии развития в цитоплазматической и в ранней постнатальной жизни — в митохондриальной фракции. Сделано предложение совместно использовать периодические охлаждения инкубируемых яиц и ультрафиолетовое облучение в птицеводстве с целью повышения жизнеспособности цыплят и продуктивности птицы.

В последние годы нами исследовались механизмы влияния низких температур инкубирования яиц на интенсивность окислительных процессов и активность некоторых ферментов митохондрий разных органов куриных эмбрионов в онтогенезе [1—4]. Показано, что, благодаря усиленню обменных процессов в промежутках между охлаждениями, имеет место более быстрое включение систем химической терморегуляции, обеспечивающих адаптацию организма к низким температурам, что, в свою очередь, обеспечивает более высокую степень сопротивляемости к воздействию последних и способствует сравнительно быстрой стабилизации температуры тела. Нами было выдвинуто предположение о необходимости подвергать инкубируемые куриные яйца периодическим кратковременным охлаждениям, способствующим повышению эффективности вывода молодняка и его качества.

В процессе этих исследований нами были предприняты эксперименты по изучению совместного действия на организм птиц низких температур, использованных при инкубировании яиц, и периодического ультрафиолетового облучения. Известно, что наряду с комплексом химических веществ и пищевых факторов в жизненных отправлениях

организма и стимуляции его различных функций, в частности репродуктивной и воспроизводительной, важную роль играют такие физические факторы среды, как температура, влажность воздуха и т. д.

К числу прогрессивных методов, успешно используемых в современном птицеводстве, относится природное ультрафиолетовое облучение, практически отсутствующее при содержании птиц в закрытых помещениях, в результате чего наблюдается снижение выводимости цыплят, особенно зимой и ранней весной. Ультрафиолетовое голодание может быть устранено введением в рацион птиц естественных источников витамина Д, в частности дефицитного и дорогостоящего витаминизированного рыбьего жира. В связи с отмеченным, важное значение приобретают искусственные источники ультрафиолетовой радиации, используемые в виде ртутно-кварцевых, бактерицидных, эритемных и других ламп.

Исходя из вышесказанного, мы провели серию опытов по изучению совместного действия ультрафиолетового облучения (УФО) и охлаждения инкубируемых куриных яиц на изменение процесса окислительного фосфорилирования (ОФ), АТРазной (НФ 3.6. 1.4) и креатинкиназной (КК) (НФ 2.7. 3.2) активностей в ткани мозга в определенные сроки эмбрионального и постэмбрионального развития.

### Материалы и методы

Эксперименты проводили на 15- и 20-суточных эмбрионах и 5-суточных цыплятах. Яйца контрольной группы инкубировали при температуре, предусмотренной в существующих правилах. Охлаждение яиц начинали с 12-го дня инкубации при комнатной температуре в течение суток дважды по 30 мин. УФО проводили ртутно-кварцевой лампой мощностью 220 Вт. В первый раз облучение яиц производили до закладки в инкубаторы и затем эту процедуру повторяли через каждые четыре дня в течение 3 миш.

Методы по исследованию интенсивности процесса ОФ и АТРазной активности приведены в наших предыдущих работах [1, 3]. Активность КК измеряли методом Эннора-Розенберга по скорости накопления креатина и выражали в единицах фермента. Интенсивность окраски, зависящей от количества образовавшегося креатина, определяли на спектрофотометре при  $\lambda$  520 нм и фиолетовом фильтре. Цитоплазматическую и митохондриальную фракции мозга выделяли согласно методике Лызловой [5]. Определение белка проводили биуретовым методом [6].

### Результаты и обсуждение

Результаты по изучению скорости окисления в митохондриях мозга куриных эмбрионов разных сроков развития и подвергнутых одновременно охлаждению и УФО сведены в табл. 1. При УФО скорость окисления и интенсивность фосфорилирования на 15-й день инкубации по сравнению с контролем оказывается достаточно высокой,

перед вылуплением падает, а на 5-й день постнатальной жизни вновь значительно возрастает. Соответственно этому отмечается увеличение величины Р/О. При совместном действии охлаждения с УФО интенсивность процессов дыхания, фосфорилирования и величина Р/О на 15-е сутки колеблются в пределах высоких значений, а с дальнейшим развитием происходит их уменьшение по сравнению с контрольными величинами, несколько превышая показатели, отмечаемые при одном лишь УФО. В целом, многократное воздействие УФО на организм животных приводит к изменению скорости окислительных процессов. Учитывая наши прежние данные, можно сказать, что, если в отдельности низкие температуры и УФО в значительной степени стимулируют процесс ОФ, то при совместном их действии эта разница уменьшается.

Таблица 1  
Влияние низких температур и ультрафиолетового облучения (УФО) на окисление и фосфорилирование в митохондриях мозга куриных эмбрионов ( $\Delta O$  и  $\Delta P$  в мкатомах/мг белка/45 мин)

Условия опыта	Эмбрионы						5-суточные цыплята		
	15-суточные			20-суточные			$\Delta O$	$\Delta P$	Р/О
Контроль	$\Delta O$	$\Delta P$	Р/О	$\Delta O$	$\Delta P$	Р/О	$\Delta O$	$\Delta P$	Р/О
УФО	1,83	1,57	0,97	2,75	1,95	0,71	2,47	2,38	0,69
УФО + охлаждение	2,31	2,72	1,16	1,98	1,30	0,66	2,93	3,13	1,05
	2,09	2,37	1,14	2,39	1,73	0,72	2,04	1,98	1,00

Примечание. Приведены средние данные из 7-8 опытов.

Как правило, увеличенное потребление кислорода приводит к соответствующему снижению Р/О или стимуляции АТФазных реакций. В табл. 2 отражены результаты изменения АТФазной активности митохондрий мозга куриных эмбрионов, подвергшихся двукратному охлаждению, начиная с 12-го дня инкубации и УФО с первого дня закладки яиц в инкубаторы. Активность фермента определяли в митохондриальной, мембранной и растворимой фракциях в присутствии  $Mg^{2+}$  и бикарбоната, как активатора этого фермента. Как следует из приведенных данных, активность АТФазы в указанных фракциях по ходу развития зародыша подвергается неодинаковому изменению. В митохондриальной фракции по сравнению с контролем активность фермента при охлаждении и УФО + охлаждение подвергается значительному возрастанию, иногда до 44% (20-суточные эмбрионы). По мере развития плода вплоть до его вылупления активность фермента в мембранной фракции при всех условиях эксперимента увеличивается. На 15-ые сутки развития без добавления активаторов она в случае охлаждения возрастает на 63%, а при действии и низких температур, и УФО — на 76%. На 5-й день постнатальной жизни АТФазная активность либо остается на уровне контроля, либо уменьшается ( $Mg^{2+}$  и  $HCO_3^-$ ).

Иная картина наблюдается в растворимой фракции, при этом резкое возрастание активности фермента наблюдается на 15-е сутки инкубации. Примечательно, что совместное действие УФО с охлаждением сопровождается высшим подъемом активности фермента — от 45 до 108%. Перед вылуплением АТРазная активность по сравнению с контролем падает у облученных эмбрионов и повышается в случае совместного действия облучения и охлаждения. На 5-й день постнатальной жизни в митохондриальной и мембранной фракциях активность фермента или слегка понижается, или остается на первоначальном уровне. В растворимой фракции в присутствии  $Mg^{2+}$  она возрастает до 30%, а в присутствии  $Mg^{2+}$  и  $HCO_3^-$  всего на 10%. Полученные результаты свидетельствуют о различной степени эффективности низких температур и УФО в отношении АТР-гидролазной реакции.

Таблица 2

Изменение АТРазной активности в разных фракциях мозга под влиянием низких температур инкубирования яиц и ультрафиолетового облучения (УФО). ( $P_1$  в мкатомах на мг белка/30 мин)

Условия опыта		Без активаторов			$Mg^{2+}$			$Mg^{2+} - HCO_3^-$		
		кон- троль	УФО	УФО+ охлаж- дение	кон- троль	УФО	УФО+ охлаж- дение	кон- троль	УФО	УФО+ охлаж- дение
15-суточные эмбрионы	митохондриальная фракция	3,60	3,85	4,69	5,82	5,89	6,08	10,43	8,50	9,54
	митохондриальные мембраны	2,46	4,02	4,33	5,21	6,54	7,15	8,19	9,21	11,96
	растворимая фракция	1,98	2,97	4,13	5,25	5,46	7,63	6,94	7,99	12,06
20-суточные эмбрионы	митохондриальная фракция	5,41	6,62	7,59	6,78	8,92	8,82	9,73	14,06	11,69
	митохондриальные мембраны	5,58	5,03	5,85	8,86	7,68	9,50	10,63	10,86	12,33
	растворимая фракция	3,14	2,51	2,83	7,06	6,30	8,17	9,31	8,10	9,93
5-суточные шпалта	митохондриальная фракция	5,33	5,66	6,20	8,03	7,71	7,91	13,86	12,50	11,42
	митохондриальные мембраны	6,50	5,30	6,59	9,12	7,46	8,47	14,08	9,44	10,95
	растворимая фракция	3,01	3,19	3,66	7,20	9,38	9,43	11,60	13,06	12,67

Примечание. Приведены средние данные из 5—6 опытов.

Анализируя приведенные в таблице данные, можно отметить, что при многократном охлаждении инкубируемых куриных яиц на фоне УФО имеет место интенсификация окислительных процессов и гидролиза АТР в плодном периоде развития. В последующие периоды развития, по-видимому, происходит перераспределение в картине выраженности этих процессов между отдельными структурными образованиями нервной клетки.

Периодические охлаждения инкубируемых яиц на фоне УФО серьезным образом сказываются и на изменениях активности КК. Изучение ее динамики в митохондриальной и цитоплазматической фракциях мозга кур в разные сроки развития свидетельствует (табл. 3), что повышение активности фермента в митохондриях мозга облученных куриных эмбрионов начинает проявляться только со стадии вылупления с последующим прогрессивным возрастанием, достигающим в мозгу 5-дневных цыплят приблизительно 45% от уровня активности контрольной группы животных. При совместном действии УФО и охлаждения активности фермента оказывается невысокой, а к моменту вылупления даже значительно пониженной, что, однако, через несколько дней после вылупления цыпленка сменяется значительным возрастанием активности КК (48%). Представляют интерес изменения динамики активности цитоплазматической формы КК. У группы животных, подвергнутых действию УФО в плодном периоде развития и перед вылуплением, обнаруживается высокий уровень активности, который после вылупления заметно снижается. Сочетанное действие низких температур с УФО характеризуется тенденцией к понижению активности КК, за исключением ее небольшого возрастания на стадии вылупления. Сравнительное исследование активности двух креатинкиназ в ткани мозга кур в онтогенезе позволяет заключить о превалировании ее на эмбриональной стадии развития в цитоплазме, а в постнатальной жизни — в митохондриальной фракции.

Таблица 3  
Изменение активности креатинкиназы в разных фракциях мозга куриного эмбриона под влиянием низких температур инкубируемых яиц и ультрафиолетового облучения (УФО) (мкМ креатина/мг белка/мин).

Возраст	Митохондрии			Цитоплазма		
	контроль	УФО	УФО + охлаждение	контроль	УФО	УФО + охлаждение
15-суточные эмбрионы	8,68	8,88	9,84	12,02	14,44	11,29
20-суточные эмбрионы	13,53	14,99	10,97	12,53	15,93	14,69
5-суточные цыплята	12,64	18,31	18,65	14,91	16,06	13,85

Примечание. Приведены средние данные из 4—5 опытов.

Полученные данные позволяют заключить об удавшейся попытке выявить некоторые особенности саморегуляции энергетического обмена в митохондриях и цитоплазме на разных этапах онтогенеза. Установлено, что при периодическом охлаждении в сочетании с УФО происходит возрастание интенсивности течения окислительных процессов, неодинаковая степень активирования АТР-гидролазной реакции и активности КК. Таким образом, при периодических кратковременных охлаждениях на фоне УФО происходят заметные изменения в отдельных

реакциях энергетического метаболизма, обуславливающие нормальную теплоотдачу инкубируемых яиц.

В настоящее время накоплен обширный экспериментальный материал, свидетельствующий о нарушении биоэнергетических механизмов в митохондриях при воздействии на них повышенных и пониженных температур; изучен механизм тепловой и холодовой инактивации на различных уровнях молекулярной организации дыхательной цепи. Это касается фосфорилирующих и нефосфорилирующих частиц переноса электронов [7—9] на уровне цельных митохондрий [10, 11] и изолированных полиферментных комплексов дыхательной цепи [12]. В частности, показано, что кратковременное воздействие высокой температуры на организм подавляет дыхательную активность митохондрий скелетных мышц при одновременной стимуляции процессов фосфорилирования. При многократных воздействиях тепла различной интенсивности способность митохондрий скелетных мышц к ОФ изменяется [13]. Согласно некоторым указаниям [14], повышение температурной устойчивости цыплят происходит при их эмбриональном развитии в условиях сниженной или периодически изменяющейся температуры. Литература по вопросам инкубации содержит данные о разностороннем влиянии изменений инкубационной температуры на биологические особенности и хозяйственные качества выведенного молодняка. С другой стороны, показано, что кратковременное охлаждение вызывает повышение теплопродукции за счет возрастания избыточного потребления кислорода, то есть помимо основной теплопродукции происходит дополнительная регуляторная выработка тепла, удерживающая температуру тела на обычном уровне [9].

Нет необходимости разъяснять практическое значение повышенной температурной устойчивости цыплят в начале их выращивания. Следует лишь отметить, что высокая сопротивляемость холоду связана со многими другими свойствами организма, определяющими его жизнеспособность. Бесспорно, что в комплексе мероприятий, направленных на улучшение выращивания молодняка и повышение продуктивности взрослого поголовья, важную роль играет снижение микробной загрязненности воздуха и воды. Это может быть легко достигнуто применением различных источников УФО, биологическая и экологическая эффективность которого экспериментально подтверждена [15]. Учитывая научную обоснованность и высокую эффективность использования низких температур инкубации яиц и УФО в птицеводстве, мы предлагаем их совместное использование для повышения инкубационных качеств яиц, а главное — продуктивности птицы.

# THE FUNCTION OF BRAIN MITOCHONDRIA OF HEN EMBRYONS UNDER THE INFLUENCE OF LOW TEMPERATURE AND ULTRAVIOLET TREATMENT

SIMONIAN A. A., STEPANIAN R. A., BADALIAN R. B., AKOPOVA T. M.

H. Kh. Buniatian Institute of Biochemistry Natl. Acad. Sci. of Rep. Armenia, Yerevan

The influence of short time cooling and ultraviolet treatment of the incubated hen eggs on the intensity of oxidative processes and adenosine triphosphatase and creatinekinase activities of brain are studied. It is shown that low temperature and ultraviolet treatment separately have stimulated oxidative phosphorylation, but these two treatments together decrease this difference. In 15-day embryos the ATP-hydrolysis is high, afterwards redistribution of these processes between different structures in neuronal cell takes place. The investigation of creatinekinase shows that the activity of the enzyme is in the cytoplasm, but at postnatal period it is in the mitochondrial fraction. It is proposed to use the periodical cooling and ultraviolet treatment in poultry to enhance the life-ability of chickens and hens productivity.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Симонян А. А., Степанян Р. А., Месропян Е. Б. Биол. журн. Армении, т. 40, с. 387—390, 1987.
2. Симонян А. А., Степанян Р. А., Месропян Е. Б. Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т. 24, с. 432—436, 1988.
3. Симонян А. А., Степанян Р. А., Бадалян Р. Б., Укр. биохим. журн., т. 61, с. 69—72, 1989.
4. Степанян Р. А., Симонян А. А. Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т. 26, с. 73—77, 1990.
5. Лыздова С. Н. Фосфагенкиназы, Л., ЛГУ, 1974.
6. Itzhack Ruth F., Gill D. M. *Analyt. Biochem.*, v. 9, p. 401—411, 1964.
7. Лузиков В. Н. Структура и функция ферментов (под ред. С. Е. Северина), М., МГУ, вып. 2, с. 21—62, 1973.
8. Лузиков В. Н., Сакс В. А., Березин И. В. Биохимия, т. 35, с. 1053—1055, 197С.
9. Скулочев В. П. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи, М., АН СССР, 1962.
10. Алматов К. Т., Аулов Д. М., Ахмеров Р. П., Рахимов М. М. *Вопр. мед. химии*, т. 23, с. 96—101, 1977.
11. Северин С. Е., Скулочев В. П., Маслов С. П., Бенедиктов И. Н., Шестаков В. Г. Докл. АН СССР, т. 131, с. 1447—1450, 1960.
12. Рахимов М. М., Алматов К. Т. Биохимия, т. 42, с. 1852—1863, 1977.
13. Акрамов Ш. И. — В кн.: *Адаптация организма к высокой температуре среды*. Ташкент, АН УзССР, с. 63—64, 1980.
14. Хаскин В. В. *Физиол. журн. СССР*, т. 49, с. 1254—1259, 1963.
15. Карапетян С. К., Кочарян Р. Г. Биологическое действие искусственных источников ультрафиолетового излучения на животный организм, Ереван, АН АрмССР, 1977.

Поступила 20. XII, 1991: