

БИОХИМИЯ

Г. Х. Бунятыан, академик АН Армянской ССР, и А. А. Симонян

Окислительное фосфорилирование в митохондриях мозга
 куриного эмбриона в течение его развития

(Представлено 30/IV 1965)

Развитие зародыша связано с потреблением большого количества энергии. В этом отношении значительный интерес представляет динамика окислительного фосфорилирования в различных тканях зародыша при его развитии.

В настоящем сообщении приводятся результаты наших исследований, посвященных изучению динамики соотношения окисления и фосфорилирования (P/O) и активности аденозинтрифосфатазы в митохондриях мозга куриного эмбриона в течение его развития.

Опыты ставились с 13 дня развития эмбриона до вылупления цыпленка. Для сравнения изучалось также окислительное фосфорилирование митохондрий мозга 1—2-дневных цыплят и зрелых птиц (петух). Возраст эмбриона определялся по срокам инкубации и коррелировался по таблицам морфологического развития Лилли⁽¹⁾.

Исследования проводились на эмбрионах кур породы белый леггорн.

Зародыш быстро обезглавливали, извлекали мозг и освобождали от оболочек, кровь удаляли фильтровальной бумагой, смоченной в растворе 0,25 M сахарозы. Для каждого опыта брали 5—6 г мозгового вещества, полученного из нескольких зародышей. Без предварительного измельчения мозг гомогенизировали стеклянным гомогенизатором типа Поттера с вращающимся тефлоновым пестиком в 0,25 M растворе сахарозы, при соотношении 1:9, в течение 20 секунд. Клеточные фракции отделяли дифференциальным центрифугированием, методом Манделя и других⁽²⁾ с некоторыми модификациями.

Ядра и цитоплазматические обломки клетки отделяли центрифугированием при 800—900 x g в течение 12 мин., а митохондрии—при 15000 x g в течение 15 мин. Чистоту митохондриальной фракции проверяли морфологическим и энзиматическим способами: фазово-контрастным микроскопом и определением активности сукцинатдегидрогеназы по методу Ваттенберга и Леонга⁽³⁾.

Морфологический контроль показал, что митохондриальная фрак-

ция состоит из цельных маленьких и крупных митохондрий. В некоторых случаях обнаруживались обломки миелиновых оболочек.

Все операции, начиная с гомогенизации ткани до выделения митохондрий, проводили при температуре $0 - 3^{\circ}$. Конечный осадок митохондрий суспензировали в $0,25 M$ растворе сахарозы и вносили в соответствующую реакционную смесь.

Изолированные митохондрии инкубировали в течение 1 часа при 26° . Инкубационная смесь содержала (в $\mu\text{мольях}$): субстрат окисления—50 (сукцинат, глутамат и α -кетоглутарат), фосфат калия—40, $\text{KCl} - 100$, $\text{MgCl}_2 - 10$, глюкоза — 150, АТФ — 3 и $0,5 - 0,75 \text{ мг}$ гексокиназы. Конечный объем $2,0 - 2,2 \text{ мл}$, $\text{pH} - 7,4$. Митохондрии добавляли из расчета на 500 мг свежей ткани.

Поглощение кислорода определяли в аппарате Варбурга (⁴).

Неорганический фосфат определяли по методу Лоури и Лопез (⁵), модифицированному В. П. Скулачевым (⁶).

АТФ-азную активность определяли по приросту неорганического фосфора. Инкубационная смесь для определения активности фермента содержала $1,6 \text{ мл}$ $0,25 M$ раствора сахарозы, $0,2 \text{ мл}$ АТФ (20 мг АТФ в 1 мл), pH инкубационной смеси $7,4$. Температура инкубации 26° , время 30 минут.

Все полученные данные рассчитаны на 1 мг белка. Белок определяли методом Лоури и др. (⁷).

Результаты исследований показывают, что соотношение поглощенного кислорода митохондриями мозга куриного эмбриона и эстерифицированного фосфата с 13 дня развития до вылупления цыпленка постепенно уменьшается (табл. 1). Так, на 13-й день инкубации P/O при окислении сукцината составляет $1,92 \pm 0,104$, на 14-й — $1,83 \pm 0,057$, затем, постепенно понижаясь, на 20-й день доходит до $0,79 \pm 0,022$. У однодневных цыплят оно равняется $0,85 \pm 0,045$. У зрелых птиц P/O снова повышается, составляя $1,92 \pm 0,063$. Полученные результаты свидетельствуют, что уровень окислительного фосфорилирования, начиная с начала плодной стадии, постепенно понижается.

Количество поглощенного кислорода митохондриями мозга в течение развития зародыша прогрессивно увеличивается. Так, на 13-й день развития эмбриона количество поглощенного кислорода митохондриями мозга составляет $1,92 \pm 0,101 \text{ мкатама}$, на 14-й день — $2,07 \pm 0,048$, затем, повышаясь, на 17-й день доходит до $4,90 \pm 0,236$, на 19-й день — $7,99 \pm 0,375 \text{ мкатама}$ кислорода. Количество поглощенного кислорода митохондриями мозга 2—5-дневных цыплят составляет $7,74 \pm 0,204 \text{ мкатама}$.

Аналогичные изменения отмечаются и в отношении эстерифицированного фосфата.

Интенсивность эндогенного дыхания митохондрий мозга в ходе развития эмбриона усиливается. На 13-й день оно составляет $0,14 \pm 0,031$, на 17-й — $1,04 \pm 0,067$, а на 20-й день — $1,25 \pm 0,154 \text{ мкатама}$ кислорода. Эндогенное дыхание митохондрий 2—5-дневных цыплят

Таблица 1

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

Дни развития эмбриона	Эндогенное дыхание			Сукцинат		
	ΔO	ΔP^1	P/O	ΔO	ΔP	P/O
13	$0,14 \pm 0,031$ (6)	$0,16 \pm 0,077$ (6) $t=2,0$	—	$1,92 \pm 0,101$ (6) $P < 0,001$	$3,65 \pm 0,114$ (6) $t=14$	$1,92 \pm 0,104$ (6) $t=11$
14	$0,19 \pm 0,031$ (6)	$0,12 \pm 0,049$ (6) $t=2,4$	—	$2,07 \pm 0,048$ (6) $P < 0,001$	$3,83 \pm 0,040$ (6) $t=95$	$1,83 \pm 0,057$ (6) $t=32$
15	$0,59 \pm 0,094$ (6)	$0,04 \pm 0,020$ (6) $t=2,0$	—	$3,39 \pm 0,389$ (6) $P < 0,001$	$5,28 \pm 0,398$ (6) $t=13$	$1,58 \pm 0,070$ (6) $t=22$
16	$0,67 \pm 0,034$ (5)	$0,13 \pm 0,056$ (5) $t=2,3$	—	$2,15 \pm 0,083$ (6) $P < 0,001$	$3,19 \pm 0,078$ (6) $t=40$	$1,51 \pm 0,038$ (6) $t=40$
17	$1,04 \pm 0,067$ (6)	$0,06 \pm 0,025$ (6) $t=3$	—	$4,90 \pm 0,236$ (6) $P < 0,001$	$6,88 \pm 0,109$ (6) $t=63$	$1,41 \pm 0,063$ (6) $t=22$
18	$0,82 \pm 0,040$ (6)	$0,34 \pm 0,294$ (6) $t=1,2$	—	$5,07 \pm 0,056$ (6) $P < 0,001$	$6,79 \pm 0,068$ (6) $t=99$	$1,33 \pm 0,013$ (6) $t=102$
19	$1,07 \pm 0,038$ (6)	$0,10 \pm 0,034$ (6) $t=3$	—	$7,99 \pm 0,375$ (10) $P < 0,001$	$8,55 \pm 0,246$ (10) $t=34$	$1,09 \pm 0,075$ (10) $t=19$
20	$1,25 \pm 0,154$ (6)	$0,24 \pm 0,055$ (6) $t=4$	—	$5,45 \pm 0,226$ (6) $P < 0,001$	$4,37 \pm 0,379$ (6) $t=11$	$0,79 \pm 0,022$ (6) $t=35$
21	$0,84 \pm 0,031$ (6)	$0,09 \pm 0,045$ (6) $t=2,2$	—	$6,02 \pm 0,065$ (6) $P < 0,001$	$5,26 \pm 0,179$ (6) $t=29$	$0,88 \pm 0,040$ (6) $t=22$
1-дн. цыпл.	$0,76 \pm 0,077$ (5)	$0,97 \pm 0,041$ (5) $t=23$	—	$6,82 \pm 0,276$ (6) $P < 0,001$	$5,80 \pm 0,517$ (6) $t=11$	$0,85 \pm 0,045$ (6) $t=18$
2—5-дн. цыпл.	$1,10 \pm 0,040$ (6)	$0,16 \pm 0,085$ (6) $t=2$	—	$7,74 \pm 0,204$ (20) $P < 0,001$	$6,52 \pm 0,365$ (20) $t=17$	$0,82 \pm 0,063$ (20) $t=13$
Петух	$0,69 \pm 0,094$ (6)	$0,15 \pm 0,098$ (6) $t=1,5$	—	$3,69 \pm 0,100$ (6) $P < 0,001$	$7,08 \pm 0,182$ (6) $t=38$	$1,92 \pm 0,063$ (6) $t=30$

составляет $1,10 \pm 0,040$ мкатама кислорода. Интересно отметить, что у кур эндогенное дыхание митохондрий снижается.

При эндогенном дыхании фосфат не только не эстерифицируется, а, наоборот, высвобождается и в инкубационной среде увеличивается количество свободного фосфата.

¹ Количество свободного Р.

Таблица 2

Соотношение окисления и фосфорилирования в митохондриях мозга куриного эмбриона в течение эмбриогенеза, субстрат глутамат (Р и О в мкатомах, $M \pm m$)

Дни развития эмбриона	Эндогенное дыхание			Глутамат		
	ΔO	ΔP^1	P/O	ΔO	ΔP	P/O
13	$0,69 \pm 0,030$ (6)	$0,03 \pm 0,005$ (6) t=6	—	$5,59 \pm 0,294$ (6) P < 0,001	$11,27 \pm 0,317$ (6) t=35	$2,04 \pm 0,079$ (6) t=25
14	$0,87 \pm 0,017$ (6)	$0,94 \pm 0,025$ (6) t=37	—	$4,14 \pm 0,131$ (6) P < 0,001	$7,43 \pm 0,139$ (6) t=53	$1,79 \pm 0,031$ (6) t=57
15	$1,60 \pm 0,092$ (6)	$1,61 \pm 0,068$ (6) t=23	—	$6,09 \pm 0,289$ (6) P < 0,001	$9,30 \pm 0,148$ (6) t=63	$1,54 \pm 0,187$ (6) t=20
16	$1,40 \pm 0,073$ (6)	$1,19 \pm 0,029$ (6) t=16	—	$5,54 \pm 0,220$ (6) P < 0,001	$8,29 \pm 0,168$ (6) t=49	$1,50 \pm 0,058$ (6) t=26
17	$1,04 \pm 0,030$ (6)	$1,50 \pm 0,033$ (6) t=45	—	$5,89 \pm 0,048$ (6) P < 0,001	$6,64 \pm 0,100$ (6) t=66	$1,29 \pm 0,078$ (6) t=16
18	$0,84 \pm 0,064$ (6)	$1,32 \pm 0,048$ (6) t=27	—	$6,15 \pm 0,222$ (6) P < 0,001	$6,98 \pm 0,100$ (6) t=69	$1,14 \pm 0,052$ (6) t=22
19	$1,58 \pm 0,035$ (6)	$1,91 \pm 0,059$ (6) t=32	—	$5,92 \pm 0,319$ (6) P < 0,001	$7,28 \pm 0,267$ (6) t=27	$1,24 \pm 0,094$ (6) t=13
20	$2,03 \pm 0,031$ (6)	$1,49 \pm 0,040$ (6) t=37	—	$6,89 \pm 0,348$ (6) P < 0,001	$5,17 \pm 0,229$ (6) t=22	$0,76 \pm 0,064$ (6) t=11
21	$2,52 \pm 0,013$ (6)	$1,72 \pm 0,030$ (6) t=57	—	$7,35 \pm 0,392$ (6) P < 0,001	$6,00 \pm 0,185$ (6) t=32	$0,82 \pm 0,052$ (6) t=15
1-дн. цыпл.	$2,06 \pm 0,049$ (6)	$0,84 \pm 0,100$ (6) t=8	—	$6,61 \pm 0,153$ (6) P < 0,001	$6,83 \pm 0,248$ (6) t=27	$1,03 \pm 0,035$ (6) t=30
2-дн. цыпл.	$1,94 \pm 0,033$ (6)	$1,49 \pm 0,042$ (6) t=35	—	$5,16 \pm 0,124$ (6) P < 0,001	$4,44 \pm 0,079$ (6) t=56	$0,85 \pm 0,019$ (6) t=44
Петух	$0,33 \pm 0,022$ (6)	$0,66 \pm 0,069$ (6) t=9	—	$6,05 \pm 0,133$ (6) P < 0,001	$6,15 \pm 0,236$ (6) t=26	$1,01 \pm 0,040$ (6) t=25

При окислении глутамата соотношение окисления и фосфорилирования в митохондриях мозга эмбриона с начала плодной стадии до вылупления цыпленка также понижается. Как видно из приведенных данных (табл. 2), на 13-й день развития P/O составляет $2,04 \pm 0,079$

¹ Количество свободного P.

на 15-й — $1,54 \pm 0,187$, на 18-й — $1,14 \pm 0,052$, а на 21-й день инкубации — $0,82 \pm 0,052$. У 1 — 2-дневных цыплят P/O составляет $1,03 \pm 0,035$ и $0,85 \pm 0,019$, примерно на таком уровне оно сохраняется у петуха ($1,01 \pm 0,040$).

Следует отметить, что при окислении глутамата в отличие от сукцината процесс поглощения кислорода митохондриями в течение эмбрионального развития особых изменений не претерпевает.

Что касается эстерификации фосфата, то этот процесс интенсивно протекает в начальном периоде плодной стадии, особенно на 13-й день, затем понижается и начиная с 17 дня инкубации до вылупления цыпленка почти не изменяется.

Полученные результаты показывают, что и в митохондриях мозга петуха процесс фосфорилирования протекает медленнее, чем в начале плодной стадии развития эмбриона. В митохондриях мозга петуха количество эстерифицированного фосфата составляет всего $6,15 \pm 0,236$ мкатама, тогда как на 13-й день развития эмбриона утилизация фосфата доходит до $11,2 \pm 0,317$, а на 15-й день — $9,30 \pm 0,148$ мкатама P.

Аналогичные результаты в отношении окислительного фосфорилирования получены и в опытах, в которых субстратом окисления служил α -кетоглутарат (табл. 3).

Следует отметить, что при окислении α -кетоглутарата интенсивность поглощения кислорода митохондриями сравнительно ниже, чем при утилизации сукцината и, особенно, глутамата.

Полярнографические исследования также показали, что по мере эмбрионального развития поглощение кислорода митохондриями мозга усиливается.

Исследования, проведенные по изучению АТФ-азы, показывают, что в ходе развития эмбриона ее активность в митохондриях мозга повышается (табл. 4). Так, например, на 13-й день инкубации активность фермента составляла $1,70 \pm 0,062$, на 15-й — $1,88 \pm 0,039$, на 18-й она повышалась — $2,10 \pm 0,004$, а на 21-й день — $2,38 \pm 0,129$ мкатама P (на 1 мг белка). У однодневных цыплят активность фермента также высокая, у 2 — 8-дневных цыплят она несколько понижается — $2,19 \pm 0,168$ мкатама P, дальнейшее понижение АТФ-азной активности митохондрий мозга отмечается у зрелых кур ($1,88 \pm 0,129$ мкатама P).

Выводы. Результаты проведенных исследований показывают, что уровень окислительного фосфорилирования (субстраты окисления — сукцинат, глутамат и α -кетоглутарат), начиная от плодной стадии развития куриного эмбриона вплоть до вылупления цыпленка, понижается. Параллельно с этим усиливается свободное окисление, за счет которого повышается температура зародыша. В течение эмбрионального развития повышается и активность митохондриальной АТФ-азы. Обнаруженные значительные сдвиги в энергетическом обмене имеют

Соотношение окисления и фосфорилирования в митохондриях мозга куриного эмбриона в течение эмбриогенеза, субстрат α -кетоглутарат (O и P в *мкатомах*, $M \pm m$)

Дни развития эмбриона	Эндогенное дыхание			α -кетоглутарат		
	ΔO	ΔP^1	P/O	ΔO	ΔP	P/O
13	$0,74 \pm 0,040$ (6)	$0,07 \pm 0,005$ (6) t=14	—	$3,22 \pm 0,202$ (6) P < 0,001	$5,71 \pm 0,192$ (6) t=30	$1,79 \pm 0,077$ (6) t=23
14	$0,59 \pm 0,077$ (6)	$0,89 \pm 0,046$ (6) t=19	—	$2,28 \pm 0,082$ (6) P < 0,001	$3,26 \pm 0,050$ (6) t=65	$1,43 \pm 0,081$ (6) t=17
15	$1,42 \pm 0,133$ (6)	$1,32 \pm 0,101$ t=13	—	$4,26 \pm 0,100$ (6) P < 0,001	$4,97 \pm 0,108$ (6) t=46	$1,17 \pm 0,040$ t=29
16	$1,12 \pm 0,098$ (6)	$1,13 \pm 0,073$ (6) t=15	—	$3,43 \pm 0,115$ (6) P < 0,001	$4,96 \pm 0,118$ (6) t=33	$1,15 \pm 0,021$ (6) t=54
17	$0,75 \pm 0,115$ (6)	$1,33 \pm 0,054$ (6) t=24	—	$3,86 \pm 0,170$ (6) P < 0,001	$4,00 \pm 0,151$ (6) t=26	$1,05 \pm 0,083$ (6) t=12
18	$0,94 \pm 0,037$ (6)	$1,20 \pm 0,050$ (6) t=24	—	$4,11 \pm 0,136$ (6) P < 0,001	$4,18 \pm 0,148$ (6) t=28	$1,05 \pm 0,059$ (6) t=18
19	$1,65 \pm 0,066$ (6)	$1,51 \pm 0,102$ (6) t=14	—	$4,06 \pm 0,264$ (6) P < 0,001	$3,66 \pm 0,110$ (6) t=33	$0,91 \pm 0,060$ (6) t=15
20	$1,79 \pm 0,078$ (6)	$1,44 \pm 0,026$ (6) t=37	—	$5,03 \pm 0,288$ P < 0,001	$3,87 \pm 0,238$ (6) t=16	$0,77 \pm 0,061$ (6) t=12
21	$1,98 \pm 0,222$ (6)	$1,82 \pm 0,029$ (6) t=63	—	$4,97 \pm 0,365$ (6) P < 0,001	$3,75 \pm 0,162$ (6) t=23	$0,79 \pm 0,208$ (6) t=8
1-дн. цыпл.	$2,00 \pm 0,039$ (6)	$0,92 \pm 0,056$ (6) t=16	—	$5,04 \pm 0,144$ (6) P < 0,001	$3,72 \pm 0,145$ (6) t=25	$0,73 \pm 0,036$ (6) t=20
2-дн. цыпл.	$1,78 \pm 0,060$ (6)	$1,43 \pm 0,029$ (6) t=0,50	—	$4,06 \pm 0,092$ (6) P < 0,001	$2,85 \pm 0,036$ (6) t=79	$0,70 \pm 0,014$ (6) t=50
Петух	$0,28 \pm 0,021$ (6)	$0,76 \pm 0,030$ (6) t=25	—	$3,40 \pm 0,095$ (6) P < 0,001	$3,61 \pm 0,101$ (6) t=35	$1,06 \pm 0,053$ (6) t=20

важное биологическое значение для развития эмбриона и создают предпосылки для вылупления цыпленка из яйца.

¹ Количество свободного P.

Аденозинтрифосфатазная активность митохондрий мозга куриного эмбриона в течение эмбриогенеза $M \pm m$

Дни развития эмбриона	P в мкатамах	t	Дни развития эмбриона	P в мкатамах	t
13	$1,70 \pm 0,062$ (7)	27	19	$2,11 \pm 0,034$ (3)	61
14	$1,82 \pm 0,134$ (6)	13	20	$2,59 \pm 0,017$ (5)	17,6
15	$1,88 \pm 0,039$ (19)	48	21	$2,38 \pm 0,129$ (5)	18
16	$2,01 \pm 0,419$ (9)	4,7	1-дн. цыпл.	$2,37 \pm 0,086$ (5)	27
17	$1,96 \pm 0,043$ (7)	45	2-8-дн. цыпл.	$2,19 \pm 0,168$ (5)	13
18	$2,10 \pm 0,004$ (5)	52	Петух	$1,88 \pm 0,129$	14

Հ. Խ. ԲՈՒՆՅԱԹՅԱՆ, Հայկական ՍՍԻ ԳԱ ակադեմիկոս, Լ. Ա. Ա. ՍԻՄՈՆՅԱՆ

Օբսիդացիոն ֆոսֆորիլացումը հավի սաղմի ուղեղի միտոնոմերիաներում նրա զարգացման ընթացքում

Կատարված հետազոտությունների արդյունքները ցույց են տալիս, որ հավի սաղմնային զարգացման ընթացքում օբսիդացիոն ֆոսֆորիլացումն ուղեղի միտոնոմերիաներում սկսած պտղային ստադիայից մինչև ճափ դուրս գալը, իջնում է: Դրան զուգընթաց բարձրանում է ազատ օբսիդացման պրոցեսը, խթանվում է մակրոէրգերի նեղումը, որի հետևանքով մեծանում է ազատ էներգիայի բանակը և այս նպատակով է սաղմի մարմնի զերմաստիճանի բարձրացմանը: Սաղմնային զարգացման ընթացքում միտոնոմերիաների ԱՏՖ-ազային ակտիվությունը աստիճանաբար բարձրանում է, որը սերտորեն կապված է օբսիդացիոն ֆոսֆորիլացման վերը նշված փոփոխությունների հետ:

Սաղմնային զարգացման 2-րդ կեսից սկսած էներգետիկ փոխանակության մեջ կատարվող այս տեղաշարժերը ունեն կարևոր բիոլոգիական նշանակություն, ինչպես սաղմի բնորոշիկական պրոցեսների, նույնպես և ձևավորված ճափ ձվից դուրս գալու ընթացքում:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ Г. Гамилтон, Lillies Development of the Chick, New York, 1952. ² П. Мак-диль и др., J. Neurochem., 8, 126, 1961. ³ P. Ваттенберг и Ж. Леонг, J. Histochem., Cytochem., 8, 296, 1960. ⁴ В. В. Умбрейт, Р. Х. Буррис, Дж. Ф. Штауффер, Методические методы изучения тканевого обмена, М., ИЛ, 1951. ⁵ О. Лоури и Ж. Лопез, J. Biol. Chem., 162, 421, 1946. ⁶ В. П. Скулачев, Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи, 153—154, М., 1962. ⁷ О. Лоури и др., J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.