ՀԱՅԿԱԿԱՆ ՍՍՌ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԿԱԴԵՄԻԱ· ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР. БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ

XIX, № 1, 1966

Ա. Ա. ՍԻՄՈՆՅԱՆ, Թ. Ա. ՍՏԵՓԱՆՅԱՆ

ՀԱՎԻ ՍԱՂՄԻ ԼՅԱՐԴԻ ՄԻՏՈՔՈՆԴՐԻԱՆԵՐՈՒՄ ՕՔՍԻԴԱՑՄԱՆ ՊՈԼՅԱՐՈԳՐԱՖԻԿ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ԷՄԲՐԻՈԳԵՆԵԶԻ ԸՆԹԱՑՔՈՒՄ

Հավի սաղմի նորմալ զարգացման համար կարևոր պայման է գազային փոխանակությունը։ Հայտնի է, որ սաղմի կողմից թթվածնի կլանումը զարգացման 10-րդ օրից ուժեղանում է։ Այդ շրջանում սաղմն ավելի շատ թթվածին է կլանում, քան այն անհրաժեշտ է արտազատվող CO_2-ի առաջացման համար [5]։ Բջիջներում թթվածնի կլանման ուժեղացման հետ միասին ինտենսիվանում են նաև ֆոսֆորիլացման, մակրոէրգերի առաջացման և նրանց ճեղքման պրոցեսները, որի հետևանքով գոյանում է հսկայական քանակությամբ էներգիա [2]։ Այդ էկզոթերմիկ ռեակցիաների հետևանքով ինկուբացման 2-րդ կեսից սաղմի մարմնի ջերմաստիճանն սկսում է բարձրանալ և անցնել շրջապատից։ Այդ կապակցությամբ մեր նպատակն է եղել ուսումնասիրել հավի սաղմի լյարդի միտոքոնդրիաների շնչառության դինամիկան նրա զարգացման ընթացքում։

Հետազոտության մեթոդիկան

Շնչառության ուսումնասիրությունը կատարվել է պոլյարոգրաֆիկ եղանակով։ Հետազոտության պոլյարոգրաֆիկ մեթոդը, որն առաջարկվել է Հեյրովսկու կողմից [3, 8, 9, 10], այժմ լավ մշակված է և կիրառվում է նաև բիոլոգիական սիստեմների նկատմամբ [4]։ Այդ մեթոդի հիմքում ընկած է հոսանքի ուժի չափումը, որն անհրաժեշտ լարվածություն ստեղծելու դեպքում առաջանում է կաթոդի վրա թթվածնի վերականգնման ժամանակ։ Այդ հոսանքի չափումն ու գրառումը թույլ է տալիս դատելու հեղուկում պարունակվող թթվածնի քանակի մասին։ Անալիզի պոլյարոգրաֆիկական մեթոդն աչքի է ընկնում բարձր զգայունությամբ (կարելի է նյութի քանակը որոշել նույնիսկ 10^{-3} կամ 10^{-4}% պարունակության դեպքում), չափումների արագությամբ, ավտոմատ գրառումով և Վարբուրգի մանոմետրիկ մեթոդի համեմատությամբ՝ հյուսվածքի քիչ ծախսումով։ Կարևոր է նաև այն հանգամանքը, որ շնչառության չափումն սկսվում է սիստեմի ավելացումից անմիջապես հետո՝ առանց սպասելու ջերմաստիճանների հավասարեցման։

Թթվածնի քանակական որոշման համար մենք օգտագործել ենք պլատինային տատանվող և կալոմելային էլեկտրոդներ։ Կալոմելային էլեկտրոդ պատրաստելիս անոթի ստորին մասում լցրել ենք էլեկտրոլիտորեն մաքուր սնդիկ (0,75 սմ բարձրությամբ), նրա մակերևույթի մոտ 1 մմ շերտով՝ կալոմել (Hg_2Cl_2-ի դժվարալուծ աղը) և ապա՝ KCl-ի հագեցած լուծույթ։ Սնդիկի մեջ ընկղմել ենք պլատինյա լարը, որը զոդված է ապակյա խողովակի մեջ։ Հեղուկային կոնտակտի համար օգտագործել ենք KCl-ի հագեցած լուծույթի մեջ պատրաստված ագար-ագար։ Կալոմելային էլեկտրոդի անոթի տրամագիծը

2 սմ-ից չպետք է պակաս լինի, հակառակ դեպքում տեղի է ունենում պոլյարացում և ստացվում են ոչ հիշտ տվյալներ [6]։

Պլատինային էլեկտրոդի համար օգտագործել ենք պլատինի 0,3—0,5 մմ տրամագծով 4—5 մմ երկարությամբ [1] լար, որը զոդվել է ապակյա նեղ խողովակի մեջ։ Նման զոդումն ունի այն առավելությունը, որ պոլյարոգրաֆիկ բաժակում հետազոտվող լուծույթի մեջ խորասուզված պլատինի երկարությունը բոլոր դեպքերում մնում է անփոփոխ։

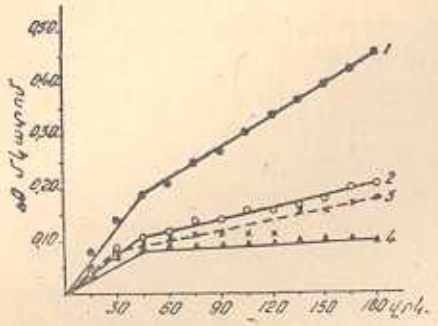
Էլեկտրոդը տատանելու համար օգտագործել ենք երկաթի ապակեպատ կարճ լար, որը պոլյարոգրաֆիկ բաժակում պտտվել է մագնիսական խառնիչի օգնությամբ։

Պոլյարոգրաֆիկ եղանակով թթվածնի քանակի որոշման համար կարևոր նշանակություն ունի ուսումնասիրվող լուծույթի կայուն ջերմաստիճանի պահպանումը։ Ջերմաստիճանի տատանումն ազդում է սահմանային հոսանքի ուժի վրա. դա բացատրվում է նրանով, որ կինետիկական մածուցիկությունը և դիֆուզիայի գործակիցը կախված են ջերմաստիճանից։ Մեր փորձում ինկուբացիոն խառնուրդի կայուն ջերմաստիճանը պահպանվել է պոլյարոգրաֆիական բաժակները տեղավորող սկավառակի մեջ ջրի անընդհատ շրջապատությամբ, որը միացված է եղել ուլտրաթերմոստատի հետ։

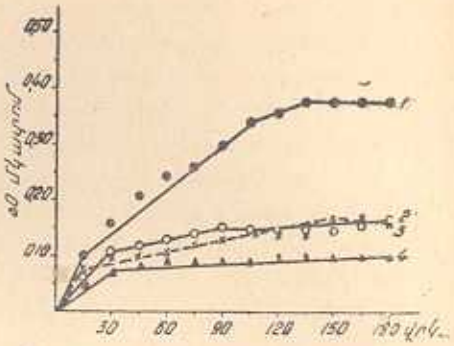
Միտոքոնդրիաների անջատման և նրանց մաքրության որոշման վերաբերյալ մանրամասն նկարագրությունը տրված է մեր նախորդ աշխատությունում [2]։ Մեկուսացված միտոքոնդրիաներն ինկուբացրել ենք 3 բոպե տևողությամբ 26°C-ում։ Ինկուբացիոն խառնուրդը պարունակել է՝ օքսիդացման սուբստրատ (սուկցինատ, գլուտամատ կամ α-կետոգլուտարաթթու) 25 մկմոլ, կալիում ֆոսֆատ՝ 20, KCl-50, $MgCl_2$-5, գլյուկոզա՝ 75, ATP-1,5 մկմոլ և 0,25—0,35 մգ բյուրեղական հեքսոկինազա (Sigma)։ Խառնուրդի վերջնական ծավալը 1,0—1,1 մլ է, pH-ը՝ 7,4։ Միտոքոնդրիաներն ավելացվել են 250 մգ թարմ հյուսվածքի հաշվով, որը համապատասխանում է 1—2 մգ սպիտակուցի։ Ստացված բոլոր տվյալները հաշվել ենք 1 մգ սպիտակուցի վրա. սպիտակուցը որոշել ենք Լոուրիի և աշխատակիցների մեթոդով [11]։

Փորձերի արդյունքները և նրանց քննարկումը

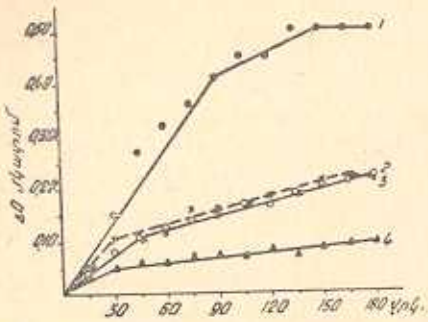
Հետազոտությունների արդյունքները ցույց են տալիս, որ էմբրիոնի լյարդի միտոքոնդրիաների կողմից կլանված թթվածնի քանակը, սկսած զարգացման պտղային շրջանի սկզբից մինչև ճտի դուրս գալը, տարբեր օրերի ընթացքում տատանվում է (գծ. 1—9)։ Այսպես, օրինակ, սուկցինատի օքսիդացման ժամանակ զարգացման 14—16-րդ օրերի ընթացքում միտոքոնդրիաների շնչառությունը ցածր է, իսկ 17—18-րդ օրերի ընթացքում կլանված թթվածնի քանակը բարձրանում և հասնում է 0,50 մկատոմի։ Այնուհետև այն նորից իջնում է մինչև 20-րդ օրը և բարձրանում միայն զարգացման վերջին օրը (0,50 մկատոմ)։ Հավերի լյարդի միտոքոնդրիաների կողմից կլանված թթվածնի քանակը կազմել է 0,45 մկատոմ։ 17-րդ, 18-րդ, ինչպես նաև 21-րդ օրերի ընթացքում միտոքոնդրիաների կողմից թթվածնի կլանումն այնքան ուժեղ է, որ ռեակցիոն խառնուրդի ինկուբացման 90-120 վայրկյանի ընթացքում պոլյարոգրաֆիկ բաժակում եղած թթվածինը ամբողջությամբ յուրացվում է նրանց կողմից և փաստորեն շնչառությունը դադարում է՝ չհասնելով մինչև ժամկետի վերջը։



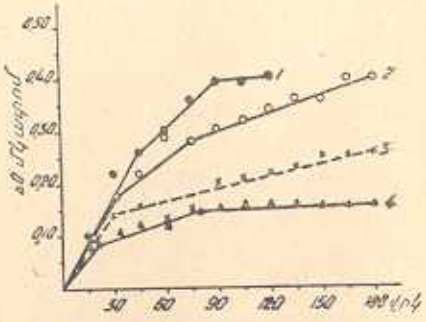
Գծ. 1. 14 օրական սաղմի լյարդի միտոքոնդրիաների շնչառությունը. 1-սուկցինատ, 2—գլուտամատ, 3—α-կետոգլուտարատ և 4—էնզոգեն շնչառություն*



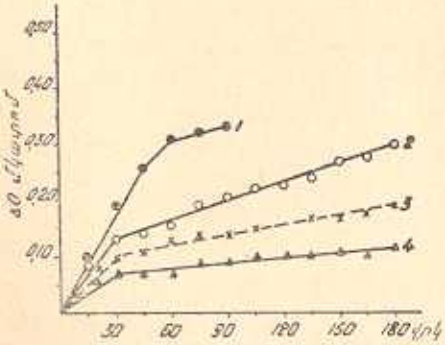
Գծ. 2. 15 օրական սաղմի լյարդի միտոքոնդրիաների շնչառությունը։



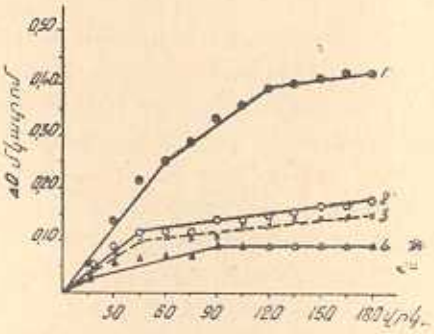
Գծ. 3. 16 օրական սաղմի լյարդի միտոքոնդրիաների շնչառությունը։



Գծ. 4. 17 օրական սաղմի լյարդի միտոքոնդրիաների շնչառությունը։



Գծ. 5. 18 օրական սաղմի լյարդի միտոքոնդրիաների շնչառությունը։

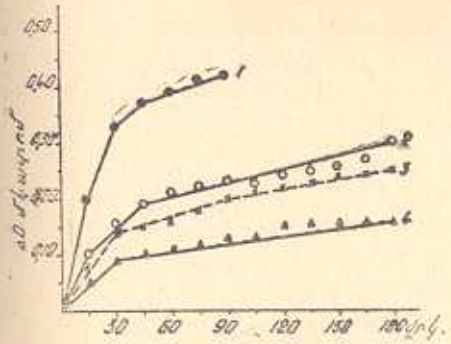


Գծ. 6. 20 օրական սաղմի լյարդի միտոքոնդրիաների շնչառությունը։

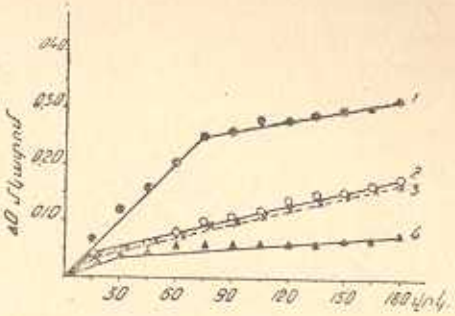
---

* 2—9 գծագրերի նշանակումները նույնն են։

Երբ օքսիդացման սուբստրատը վերցված է գլուտամինաթթուն սաղմի զարգացման 14—16-րդ օրերի ընթացքում, միտոքոնդրիաների շնչառությունը նույնպես ցածր է և բարձրանում է 17—18-րդ օրերի ընթացքում՝ կլանված թթվածնի քանակը հասնում է մինչև 0,40 մկատոմի։ Շնչառության մակարդակը այնուհետև իջնում է և բարձրանում միայն 21-րդ օրը։



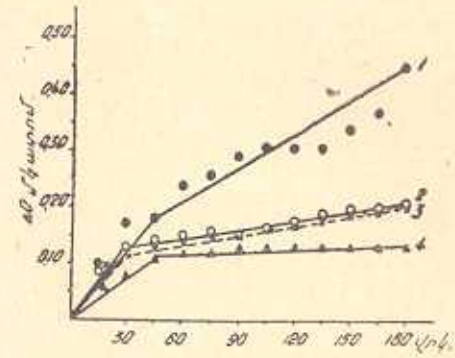
Գծ. 7. 21 օրական սաղմի լյարդի միտոքոնդրիաների շնչառությունը։



Գծ. 8. 1 օրական ճտի լյարդի միտոքոնդրիաների շնչառությունը։

Միտոքոնդրիաների շնչառությունը նման դինամիկայով ընթանում է նաև α-կետոգլուտարաթթվի մասնակցությամբ։

Հետազոտությունները ցույց են տալիս, որ միտոքոնդրիաների էնդոգեն շնչառությունը էմբրիոնալ զարգացման պտղային շրջանի սկզբում նույնպես ցածր է, որից հետո որոշ տատանումներով բարձրանում է մինչև ճտի դուրս գալը։ Գծագրերից երևում է նաև, որ սաղմի լյարդի միտոքոնդրիաներում անհամեմատ լավ օքսիդանում է սուկցինատը, այնուհետև գլուտամատը և α-կետոգլուտարաթթուն։ Պետք է նշել, որ ինկուբացման առանձին օրերի ընթացքում α-կետոգլուտարաթթվի օքսիդացումը միտոքոնդրիաներում միայն շատ քիչ չափով է ետ մնում գլուտամատից։

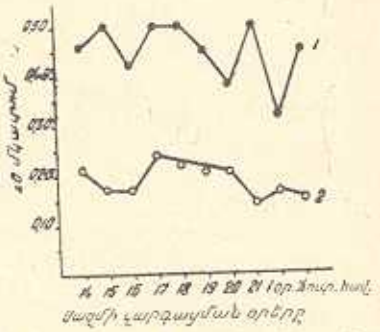


Գծ. 9. Հավի լյարդի միտոքոնդրիաների շնչառությունը։

Գծագրերից երևում է նաև, որ ինկուբացման 3 րոպեի ընթացքում պոլյարոգրաֆիկ բաժակում միտոքոնդրիաների կողմից թթվածնի կլանումը անհամեմատ ուժեղ ընթանում է առաջին 30—60 վայրկյանի ընթացքում, որից հետո կորը որոշ չափով իջնում է և համաչափ ընթանում մինչև խառնուրդի ինկուբացման վերջը։

Մենք ուսումնասիրել ենք նաև լյարդի միտոքոնդրիաների շնչառական կոնտրոլը էմբրիոնալ զարգացման ընթացքում (գծ. 10, 11)։ Գրականության մեջ տվյալներ կան այն մասին, որ հեքսոկինազան, ինչպես նաև ֆոսֆորիլացմանը մասնակցող մյուս նյութերը՝ ATP, անօրգանական ֆոսֆատը հանդիսանում են կանոնավորիչ սիստեմ՝ ֆոսֆորիլացող և աղատ օքսիդացման միջև։ Ռեակցիոն խառնուրդից հանելով ATP, P կամ հեքսոկինազան, իջնում է թթ-

վածնի կլանման մակարդակը։ Շնչառության խթանումը ֆոսֆատի ակցեպտորներով՝ ընդունված է անվանել շնչառական կոնտրոլ։ Շնչառական կոնտրոլի մեծությունը արտահայտվում է միտոքոնդրիաների կողմից ֆոսֆատի և իր ակցեպտորների մասնակցությամբ կլանված թթվածնի և առանց ակցեպտորների կլանված թթվածնի հարաբերությամբ։ Շնչառական կոնտրոլը բնորոշում է կենդանի բջջի՝ նրա կողմից թթվածնի կլանման կանոնավորման ընդունակությունը՝ կապված էներգիայով հարուստ միացությունների առաջացման հետ։ Հավի էմբրիոնի լյարդի միտոքոնդրիաների շնչառական կոնտրոլի գործակիցը սաղմի զարգացման 14-րդ օրից մինչև ճտի դուրս գալը տարբեր օրերի ընթաց-



Գծ. 10. Հավի սաղմի լյարդի միտոքոնդրիաների շնչառության դինամիկան նրա զարգացման ընթացքում լրիվ՝ ռեակցիոն խառնուրդի և ֆոսֆատի ակցեպտորների բացակայության պայմաններում. 1—լրիվ ռեակցիոն խառնուրդ (սուբստրատ՝ սուկցինատ). 2—առանց ATP, P և հեքսոկինազայի։

Գծ. 11. Սաղմի լյարդի միտոքոնդրիաների շնչառական կոնտրոլը էմբրիոգենեզի ընթացքում (սուբստրատ՝ սուկցինատ)։

քում տատանվում է 1,8—2,4-ի միջև։ Պտղային շրջանի սկզբում այն համեմատաբար բարձր է, իսկ այնուհետև շնչին շափով փոքրանում է և այդ ձևով պահպանվում մինչև զարգացման վերջը։

Այսպիսով, հավի էմբրիոնալ զարգացման ընթացքում բջջային շնչառության վերաբերյալ մեր ստացած տվյալները լրացնում են դրականության մեջ եղած՝ ընտանի թռչունների գազափոխանակության վերաբերյալ հետազոտությունները [11, 12]։ Այդ հետազոտություններով ցույց է տրված, որ էմբրիոնալ զարգացման 2-րդ կեսից մինչև ճտերի երկու շաբաթական հասակը մարմնի մեկ միավոր մասսային ընկնող շնչառությունը պրոգրեսիվորեն աճում է մինչև ճտի 60—70 գ դառնալը, որից հետո թթվածնի կլանումը կայունանում է։ Էմբրիոնի շնչառությունն ուժեղանում է հատկապես զարգացման վերջին օրվա ընթացքում, որը համընկնում է ալանտոիսային շնչառության թոքայինին անցնելու շրջանին։ Մեր հետազոտությունները հաստատում են, որ շնչառության նման դինամիկան էմբրիոնալ շրջանում սերտորեն կապվում է ներբջջային շնչառության հետ և պայմանավորված է նրանով։ Շնչառության ուժեղացումը այդ շրջանում հանդիսանում է սաղմի կողմից ճարպերի ինտենսիվ օգտագործման, հիպոթալամուս-հիպոֆիզար սիստեմի լրիվ կազմավորման ու զարգացման, հումորալ ակտիվատորների ինտենսիվ գործունեության արդյունքը [11]։

ՀՍՍՌ ԳԱ բիոքիմիայի ինստիտուտ

Ստացված է 8.VII 1965 թ.

А. А. СИМОНЯН, Р. А. СТЕПАНЯН

ПОЛЯРОГРАФИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ОКИСЛЕНИЯ В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ КУРИНОГО ЭМБРИОНА В ТЕЧЕНИЕ ЭМБРИОГЕНЕЗА

Резюме

Полярографическим методом [3—6] нами изучено окисление в митохондриях печени куриного эмбриона. Субстраты окисления—сукцинат, глутамат и α-кетоглутарат. Наши исследования показывают, что по мере эмбрионального развития до вылупления цыпленка поглощение кислорода митохондриями печени усиливается. Усиленное дыхание митохондриями со второй половины эмбрионального развития связывается с интенсивным использованием липидов эмбрионом, окончательным образованием гипоталамо-гипофизарной системы и активным действием гуморальных активаторов [11]. Наши исследования дополняют имеющиеся в литературе данные о газообмене домашних птиц [11, 12].

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Алимарин И. П., Фрид Б. И. Заводская лаборатория, 18, 11, 1303, 1952.
2. Буниятян Г. Х., Симонян А. А. ДАН АрмССР, 2, 1965.
3. Гейровский Я. Полярографический метод. Теория и практическое применение. ОНТИ, М., 1937.
4. Кольтгоф И. М., Лингейн Дж. Дж. Полярография, Госхимиздат, М.—Л., 1948.
5. Кржишковский К. Н. Физиология сельскохозяйственных птиц. Сельхозгиз, 1933.
6. Совгина О. А. Амперметрическое титрование в анализе минерального сырья. Госгеолтехиздат, М., 1957.
7. Beattie J., Freeman B. M. Brit. Poultry Sci., 3, 1, 51, 1962.
8. Heyrovsky J. Chem. Listy., 16, 256, 1922.
9. Heyrovsky J. Polarographie in der Buch W. Böttger, Physikalische Methoden der analytischen chemie, 2 Teil, Leipzig, 1936.
10. Heyrovsky J. Chikata M., Rec. Trav. Chem., 44, 496, 1925.
11. Lowry O., Rosebrough N., Farr A. and Randoll R. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
12. Freeman B. M. Brit. Poultry Sci., 3, 2, 63, 1962.