

БИОХИМИЯ

УДК 577.15 + 577.3 + 591.39

А. А. Симонян, И. Г. Батикян, А. С. Маргарян

Механизмы адаптации куриного эмбриона к колебательным температурам инкубирования

(Представлено академиком К.Г. Карагезяном 17/ V 2011)

Ключевые слова: митохондрии, окислительное фосфолирование, АТФаза

Известно, что можно управлять интенсивностью окислительного обмена, помещая животное в различные температурные условия, в частности, при понижении окружающей температуры возникает свободное окисление, которое обеспечивает дополнительную теплопродукцию, необходимую для сохранения нормальной температуры тела. В зависимости от характера и длительности действия температуры среды возникающие у животных адаптационные приспособления достигают разных уровней функциональной организации. Формирование теплорегуляторных механизмов начинается еще в эмбриональном периоде, однако у млекопитающих реализация их деятельности до рождения не нужна, тогда как у выводковых птиц переменный температурный режим насиживания яиц приводит к появлению признаков химической терморегуляции еще до вылупления, причем температурные условия эмбрионального развития оказывают заметное влияние на терморегуляцию вылупившихся птенцов [1-3]. Именно поэтому выводковые птицы служат удобным объектом для изучения взаимодействия различных форм температурной приспособляемости.

Целью настоящей работы является исследование влияния кратковременного охлаждения куриных яиц при инкубации на механизм поддержания постоянной температуры тела.

Материал и методика. Эксперименты проводили на 15- и 20-дневных эмбрионах и 5-дневных цыплятах. Охлаждение яиц начинали с 10-го дня инкубации при 20 °С. Яйца охлаждали в течение 30 и 60 мин, причем получасовое охлаждение повторялось в течение 1 сут. трех-, четырех- и пятикратно, а часовое – двукратно. Яйца контрольной группы инкубировались при температуре, предусмотренной существующими правилами по инкубации.

Состояние терморегуляции оценивали по изменениям соотношения между дыханием и фосфорилированием и интенсивности АТФазной реакции в митохондриях, выделенных из тканей мышц и печени [4].

Все методические примеры, включая рецептуру сред выделения и инкубации митохондрий, заимствованы из работы В. П. Скулачева [4] с незначительными модификациями. Субстрат окисления – сукцинат (40 мкМ).

Результаты и обсуждение. Скелетная мускулатура, составляющая значительную часть общей массы тела и являющаяся важнейшим источником дополнительной теплопродукции при химической терморегуляции, может в 1.5-2.5 раза повышать интенсивность энергетических процессов за счет так называемого «терморегуляторного тонуса», значение которого с возрастом растет, тогда как значение двигательной активности уменьшается [5-8]. Способность быстро увеличивать свою теплопродукцию обеспечивает мышцам с точки зрения терморегуляции значительные преимущества перед другими органами. Исходя из этого в первой серии опытов исследовали сопряженность процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях мышц растущего эмбриона и 5-дневных цыплят.

Как следует из данных табл. 1, потребление кислорода в митохондриях, выделенных из мышц контрольной группы, в эмбриональном периоде развития остается на том же уровне, однако после вылупления несколько возрастает. Эстерификация неорганического фосфата по мере развития увеличивается, что соответственно сказывается на величине Р/О. Несколько сниженная величина Р/О в контроле, судя по нашим и литературным данным [9], характерна для интенсивно растущей ткани и появляется в мышцах в ходе развития. При многократном охлаждении яиц наблюдается избыточное потребление кислорода (56 %) и резкое снижение фосфорилирования. При всех вариантах охлаждения яиц в эмбриональном периоде развития отмечается полное разобщение окисления и фосфорилирования, однако на пятый день после вылупления величина Р/О остается на том же уровне.

Таблица 1

Влияние переменных температур инкубирования яиц на окисление и фосфорилирование в митохондриях мышц и печени куриных эмбрионов
(ΔO и ΔP в мкатамах / мг белка / 45 мин, $M \pm S.M.E.$, $n=15$)

Условия опыта	Эмбрионы						5-дневные цыплята		
	15-дневные			20-дневные			ΔO	ΔP	P/O
	ΔO	ΔP	P/O	ΔO	ΔP	P/O			
Мышцы									
Контроль	2.5± 0.1	1.7±0.2	0.7±0.07	2.4±0.3	1.9±0.3	0.8±0.10	3.8±0.2	3.6±0.3	0.9±0.11
Охлаждение									
3-кратное	3.5±0.2	0.4±0.1		3.8±0.6	+0.3±0.6*		3.4±0.4	0.4±0.1	
4-кратное	3.3±0.3	0.2±0.1		3.4±0.5	+0.4±0.1		4.1±0.3	0.3±0.2	
5-кратное	3.2±0.3	0.3±0.1		3.6±0.6	+0.5±0.2		3.7±0.2	0.4±0.1	
2-кратное по 60 мин	2.8±0.2	0.4±0.1		3.3±0.5	+0.5±0.1		3.7±0.2	0.7±0.2	
Печень									
Контроль	3.1±0.1	2.1±0.3	0.7±0.06	3.2±0.2	2.3±0.1	0.7±0.07	2.7±0.2	2.1±0.2	0.8±0.08
Охлаждение									
3-кратное	3.0±0.2	1.9±0.2	0.6±0.05	3.0±0.3	1.8±0.1	0.6±0.06	2.6±0.2	1.5±0.1	0.6±0.04
4-кратное	3.2±0.1	2.1±0.1	0.6±0.05	2.5±0.2	1.6±0.1	0.6±0.05	2.4±0.2	1.3±0.2	0.5±0.03

Примечание: * - увеличение неорганического фосфата в среде.

Разобщение между дыханием и фосфорилированием во всех указанных сроках развития можно объяснить активацией каких-либо АТФазных механизмов митохондрий. Подтверждением этого предположения являются данные, приведенные в табл. 2. Исследование изменения активности фермента под влиянием кратковременного охлаждения показало, что АТФазная активность в эмбриональном периоде развития значительно возрастает (в пределах 30-60 % у 15-дневных и 55-63 % у 20-дневных), у 5-дневных цыплят

активность фермента несколько уменьшается, однако в основном превышает таковую контрольной группы.

В следующей серии опытов мы исследовали влияние переменных температур инкубирования яиц на процесс окислительного фосфорилирования в митохондриях печени куриных эмбрионов и 5-дневных цыплят. Из приведенных в табл. 1 данных видно, что при трех- и четырехкратном охлаждении по 30 мин в митохондриях печени на 15-й день инкубации существенных изменений в процессе окислительного фосфорилирования не наблюдается, в период вылупления уровень дыхания и фосфорилирования несколько уменьшается, соответственно снижается P/O, что больше зависит от утилизации неорганического фосфата, чем изменения в поглощении кислорода.

АТФазная активность в ткани печени во всех указанных сроках развития проявляет тенденцию к понижению (в пределах 15-30 %), тогда как в мышечной ткани активность фермента при охлаждении значительно возрастает (табл. 2). Можно предположить, что митохондрии печени более стабильны к влиянию переменных температур.

Таблица 2

**Влияние переменных температур инкубирования яиц на АТФазную
активность в митохондриях мышц и печени куриных эмбрионов при развитии
(ΔP в мкатамах / мг белка / 30 мин, M ± S.M.E., n=10)**

Условия опыта	Эмбрионы		5-дневные цыплята
	15-дневные	20-дневные	
Мышцы			
Контроль	5.7 ± 0.5	6.5 ± 0.6	7.8 ± 0.5
Охлаждение:			
трехкратное	9.2 ± 0.6	10.6 ± 0.7	9.0 ± 0.6
четырёхкратное	7.5 ± 1.1	10.1 ± 0.6	10.1 ± 1.0
пятикратное	9.1 ± 0.5	10.6 ± 0.8	8.1 ± 0.9
двухкратное по 60 мин	7.6 ± 0.7	10.3 ± 0.6	9.8 ± 0.7
Печень			
Контроль	3.7 ± 0.3	3.0 ± 0.4	3.7 ± 0.3
Охлаждение:			
трехкратное	3.0 ± 0.2	2.6 ± 0.2	3.1 ± 0.2
четырёхкратное	2.6 ± 0.1	2.3 ± 0.2	2.5 ± 0.1

Полученные экспериментальные данные позволяют заключить, что при периодическом охлаждении эмбрионов в период инкубации яиц происходит резкое разобщение окисления от фосфорилирования в митохондриях мышц и сравнительно меньшее в ткани печени, т.е. разобщение в печени можно отнести к «медленной адаптации», а разобщение мышц – к «быстрой адаптации». Вероятно, медленные изменения, происходящие в ткани печени, представляют собой следствие общей перестройки обмена веществ в новых температурных условиях и появляются в результате гиперфункции щитовидной железы при длительном охлаждении. В то же время показано, что митохондрии печени весьма чувствительны к гипертиреозу, однако патологическое уменьшение Р/О при тиреотоксикозе отличается от естественного регуляторного разобщения тем, что для получения некоторого разобщения окисления и фосфорилирования требуется введение больших доз тиреоидного гормона в течение ряда дней, причем это разобщение в противоположность терморегуляторному затрагивает печень, а не скелетные мышцы.

Исследования действия пониженных температур на организм, особенно если это связано с физиологическим механизмом адаптации к холоду в искусственных условиях, отражают потребность не только в анализе типов температурной адаптации, но и в оценке их температурной приспособляемости. Сроки установления терморегуляции и ее эффективность у цыпленка в значительной степени зависят от температурных условий эмбрионального развития. Периодическое действие пониженной температуры не только приводит к компенсаторному усилению обменных процессов в промежутках между охлаждениями, но и ускоряет включение механизма химической терморегуляции, формирование которого у зародыша отмечается уже в плодном периоде развития [2]. Снижение температуры при инкубации является первым толчком для включения механизма химической терморегуляции. Адаптация к сниженным температурам, развивающаяся в течение эмбриогенеза, обеспечивает более высокую сопротивляемость к воздействию холода, ускоряет установление постоянной температуры тела и повышает вывод молодняка и его качество по сравнению с выведенными без охлаждения яйцами [10, 11].

Институт биохимии им. Г.Х. Бунятына НАН РА

А. А. Симонян, И. Г. Батикян, А. С. Маргарян

Механизмы адаптации куриного эмбриона к колебательным температурам инкубирования

Изучено влияние кратковременного охлаждения инкубируемых куриных яиц на интенсивность окислительного фосфорилирования и активность АТФазы митохондрий мышц и печени куриных эмбрионов и цыплят. Установлено, что понижение температуры стимулирует повышенное потребление кислорода митохондриями мышц на фоне уменьшения эстерификации неорганического фосфата. Соответственно снижается Р/О. Активность АТФазы значительно возрастает. В митохондриях печени разобщение окисления от фосфорилирования развивается медленнее. Предполагается, что эти сдвиги направлены на осуществление функции терморегуляции.

Ա.Ա. Միմոնյան, Ի.Հ. Բատիկյան, Ա.Ս. Մարգարյան

Հավի սաղմի հարմարողական մեխանիզմները ինկուբացման տատանողական ջերմաստիճանների նկատմամբ

Ուսումնասիրվել է ինկուբացվող ձվերի կարճատև պաղեցման ազդեցությունը հավի սաղմի և ճտերի կմախքային մկաններից ու լյարդից անջատված միտոքոնդրիումներում օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացման և ԱՏՖազի ակտիվության վրա: Ցույց է տրվել, որ չափավոր ցածր ջերմաստիճանները խթանում են մկանների միտոքոնդրիումներում թթվածնի կլանումը, սակայն նկատելիորեն իջնում է անօրգանական ֆոսֆատի էսթերիֆիկացման մակարդակը: Համապատասխանաբար փոքրանում է P/O-ն: ԱՏՖազայի ակտիվությունը զգալիորեն աճում է: Փորձի նույն պայմաններում լյարդի միտոքոնդրիումներում օքսիդացման և ֆոսֆորիլացման փեղեկումը դանդաղ է զարգանում: Ենթադրվում է, որ նկարագրված տեղաշարժերն ուղղված են սաղմի հյուսվածքներում ջերմակարգավորիչ ֆունկցիայի իրականացմանը:

A.A. Simonyan, I.H. Batikyan, A.S. Margayan

The Adaptation Mechanisms of Chick Embryo at Variable Incubation Temperature

The effect of a short-term cooling of the incubated eggs has been investigated on the intensity of oxidative phosphorylation and the activity of ATPase in mitochondria from muscles and liver of chick embryos and chicks. It was found that the decrease of temperature increases oxygen consumption in muscle mitochondria decreasing etherification of inorganic phosphate. As a consequence, the value P/O decreases. The activity of ATPase significantly increases. Uncoupling

between oxidation and phosphorylation in liver mitochondria takes place more slowly. It is suggested that these changes are directed for realization of thermoregulation.

Литература

1. *Хаскин В.В.* - Ж. общей биологии. 1991. Т. 32. С. 451-459.
2. *Walter I., Seebacher F.* - J. Exp. Biol. 2009. V. 212. P. 2328-2336.
3. *Ruben J.* - Annu. Rev. Physiol. 1995. V. 57. P. 69-95.
4. *Скулачев В.П.* Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи. Л. Наука. 1962. 154 с.
5. *Иванов К.П.* Биоэнергетика и температурный гомеостаз. Л. Наука. 1972. 71 с.
6. *Иванов К.П.* - Физиол. ж. СССР. 1982. Т. 48. С. 1225-1233.
7. *Иванов К.П., Ткаченко Е.Я., Якименко М.А.* - Физиол. ж. СССР. 1987. Т. 50. № 10. С. 1438-1443.
8. *Иванов К.П., Алимухамедова А.С.* - Физиол. ж. СССР. 1989. Т. 49. № 4. С. 482-490.
9. *Скулачев В.П., Джунед Х., Брайнес А.С.* - Биохимия. 1994. Т. 29. № 4. С. 653-661.
10. *Шанскова А.* - Птицеводство. 1997. N 8. С. 28.
11. *Третьяков Н., Руус Ц., Эссенсон А. и др.* - Ж. общей биологии. 1994. Т. 25. N 3. С. 237-239.