

А. А. СИМОНЯН

ВЫДЕЛЕННАЯ ИЗ ПЕЧЕНИ КУРИНОГО ЭМБРИОНА
ЛИПОИДО-БЕЛКОВАЯ ФРАКЦИЯ И ЕЕ ВЛИЯНИЕ
НА ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ
МИТОХОНДРИЙ МОЗГА

Из печени куриного эмбриона удалось выделить отдельную фракцию, 74,5% которой составляют липиды, 25,4% белки и белковоподобные вещества. Выделенная фракция желтого цвета, не растворяется в воде (можно только суспензировать), растворяется в ацетоне, эфире и в других жировых растворителях. По сравнению с другими компонентами гомогената эмбриональной печени, эта фракция легкая и при центрифугировании при 0—3°, 9000 × g толстым слоем выделяется на поверхности надосадочной жидкости.

В печени эмбриона она обнаруживается во второй половине плодной стадии, т. е. с 16—17 дня, сильно увеличивается на 19—21 день и сохраняется на этом уровне у 4—5-дневных цыплят. Количество ее постепенно уменьшается, и у месячных цыплят она не обнаруживается.

Интересно отметить, что окраска печеночной ткани эмбриона в течение эмбриогенеза меняется. До 13—14-дневного возраста печень эмбриона имеет такую же окраску как и у кур, затем она постепенно приобретает желтый оттенок и у 17—18-дневного эмбриона принимает интенсивно желтый цвет, который сохраняется и у 1—5-дневных цыплят. У месячных цыплят печень принимает свою нормальную окраску. Таким образом, изменение окраски печени эмбриона в течение его развития обуславливается появлением и исчезновением в ней вышеуказанной липоидо-белковой фракции.

С целью выяснения роли этой липоидо-белковой фракции мы поставили перед собой задачу изучить ее влияние на окислительное фосфорилирование митохондрий мозга куриного эмбриона. Опыты проводили на эмбрионах кур породы белый леггорн (возраст 18—19 дней). Для сравнения изучали действие липоидо-белковой фракции также на митохондрии мозга кроликов и белых крыс (зрелые животные).

Методика. Митохондрии мозга получали дифференциальным центрифугированием, по способу Манделя и др. [5] с некоторыми модификациями. Центрифугирование производили в скоростной рефрижераторной центрифуге типа Lourdes (модель LRA).

Ядра и цитоплазматические обломки выделяли центрифугированием при 800—900 × g в течение 12 мин., а митохондрии—при 15000 × g

в течение 15 мин. Чистоту клеточных фракций исследовали фазово-контрастным микроскопом и энзиматическим методом, определяя активность сукцинатдегидрогеназы (сукцинат, O_2 —оксидоредуктаза) по методу Ваттенберга и Леонга [6].

Морфологический контроль показал, что митохондриальная фракция состоит из маленьких и крупных митохондрий, образующих единое целое. В некоторых случаях виднелись обломки миелиновой структуры.

Энзиматический контроль показал, что микросомальная фракция не содержит митохондрий, так как в ней сукцинатдегидрогеназная активность всегда отсутствует. В ядерной фракции иногда, правда слабо, выявляется активность фермента. Возможно, что при выделении ядер осаждаются также незначительные количества тяжелых митохондрий.

Все операции выделения митохондрий проводили при температуре $0-3^\circ$. Конечный осадок митохондрий суспензировали в 0,25 М растворе сахарозы и помещали в соответствующую реакционную смесь.

Изолированные митохондрии инкубировали в течение 1 ч. при 26° в аппарате Варбурга [2]. Инкубационная смесь содержала в мкмольях: субстрата окисления—сукцината—50, фосфата калия—40, KCl—100, $MgCl_2$ —10, глюкозы—150, АТФ—3 и 0,75 мг гексокиназы (Sigma). Митохондрии добавляли с расчетом на 2—2,5 мг белка. В каждой пробе в реакционную смесь прибавляли 7 мг липоидо-белковой фракции, выделенной из эмбриональной печени и суспензированной в 0,25 М растворе сахарозы. Общее количество смеси—2,4 мл, pH 7,4.

Неорганический фосфат определяли методом Лоури и Лопеза [3] в модификации В. П. Скулачева [1]. Полученные данные рассчитаны на 1 мг белка. Белок определяли по методу Лоури и др. [4].

Результаты опытов. Полученные результаты показывают, что под действием липоидо-белковой фракции процесс окислительного фосфорилирования митохондрий мозга куриного эмбриона разобщается: дыхание усиливается, а эстерификация фосфата замедляется (табл. 1). Соответственно вдвое уменьшается коэффициент P/O ($P < 0,001$).

Таблица 1
Влияние липоидо-белковой фракции на соотношение окисления и фосфорилирования в митохондриях мозга куриного эмбриона

	Контроль			Липоидо-белковая фракция		
	ΔO мкатома	ΔP мкатома	P/O	ΔO мкатома	ΔP мкатома	P/O
M \pm m	6,79 \pm 0,060	5,81 \pm 0,392	0,85 \pm 0,033	8,55 \pm 0,329	3,54 \pm 0,159	0,42 \pm 0,030
T	(8)	(8)	(8)	(15) 10,09	(15) 5,41	(15) 9,7
				$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$

При действии фракции такое разобщение окислительного фосфорилирования намечается и в митохондриях мозга 1-дневных цыплят (табл. 2).

Таблица 2

Влияние липоидо-белковой фракции на соотношение окисления и фосфорилирования в митохондриях мозга 1-дневных цыплят

	Контроль			Липоидо-белковая фракция		
	ΔO мкатома	ΔP мкатома	P/O	ΔO мкатома	ΔP мкатома	P/O
M \pm m	7,11 \pm 0,155	6,46 \pm 0,325	0,90 \pm 0,037	8,51 \pm 0,191	6,26 \pm 0,190	0,74 \pm 0,032
T	(5)	(5)	(5)	(10)	(10)	(10)
				5,69	0,535	1,23
				P<0,001	P>0,500	P>0,200

Полярнографическое изучение дыхания показывает, что в течение первых трех минут инкубации дыхание митохондрий мозга цыпленка при действии этой фракции, по сравнению с контрольными пробами, усиливается более чем в 1,6 раза.

Опыты показывают, что под влиянием липоидо-белковой фракции окислительное фосфорилирование митохондрий мозга кролика тоже разобщается (табл. 3).

Таблица 3

Влияние липоидо-белковой фракции на соотношение окисления и фосфорилирования в митохондриях мозга кролика

	Контроль			Липоидо-белковая фракция		
	ΔO мкатома	ΔP мкатома	P/O	ΔO мкатома	ΔP мкатома	P/O
M \pm m	5,25 \pm 0,052	10,43 \pm 0,064	0,98 \pm 0,013	5,13 \pm 0,309	0,65 \pm 0,050	0,12 \pm 0,008
T	(4)	(4)	(4)	(5)	(5)	(5)
				0,40	12,1	12,2
				P>0,500	P<0,001	P<0,001

Из таблицы видно, что окислительное фосфорилирование в митохондриях мозга кролика под действием этой отдельной фракции разобщается сильнее, чем у куриных эмбрионов. Так, по сравнению с контролем, под влиянием фракции P/O уменьшается в 16,5 раза (с 1,98 до 0,12, P<0,001), количество сопряженного фосфата от 10,43 понижается до 0,65 мкатама (P<0,001).

Липоидо-белковая фракция показывает такое же действие и при окислении митохондрий мозга белых крыс (табл. 4). Под влиянием фракции P/O в изолированных митохондриях мозга белых крыс, по сравнению с контролем, понижается почти вдвое, настолько же уменьшается количество сопряженного фосфата (P<0,001); что касается количества поглощенного митохондриями кислорода, то при участии липоидо-белковой фракции оно повышается незначительно.

Таблица 4

Влияние липоидо-белковой фракции на соотношение окисления и фосфорилирования в митохондриях мозга белых крыс

	Контроль			Липоидо-белковая фракция		
	ΔO мкатома	ΔP мкатома	P/O	ΔO мкатома	ΔP мкатома	P/O
M \pm m	4,45 \pm 0,122	6,51 \pm 0,044	1,46 \pm 0,003	4,54 \pm 0,054	3,43 \pm 0,162	0,75 \pm 0,032
T	(5)	(5)	(5)	(6)	(6)	(6)
				0,7	19	25
				P=0,500	P<0,001	P<0,001

Во второй части работы мы изучали действие фракции на аденозинтрифосфатазную (3.6.1.3 АТФ-фосфогидролаза) активность. Для изучения активности фермента брали следующую инкубационную смесь: 1,4 мл 0,25 М раствора сахарозы, 0,2 мл АТФ (20 мг АТФ в 1 мл), 0,2 мл суспензии митохондрий, рассчитанной на 1—2 мг белка, и в каждой пробе—7 мг фракции. Конечный объем 2 мл, рН 7,4. Инкубацию производили при 26°. Критерием активности фермента служило увеличение неорганического фосфата в среде после 30-минутной инкубации. Полученные данные показывают, что при наличии липоидо-белковой фракции АТФ-аза митохондрий мозговой ткани куриного эмбриона активируется (рис. 1). Так, в контрольных опытах количество неорганического фосфата, расщепленного АТФ-азой, составляет всего $1,59 \pm 0,09$ мкатома, а при действии фракции оно, увеличиваясь, доходит до $2,18 \pm 0,072$ ($0,005 > P > 0,001$).

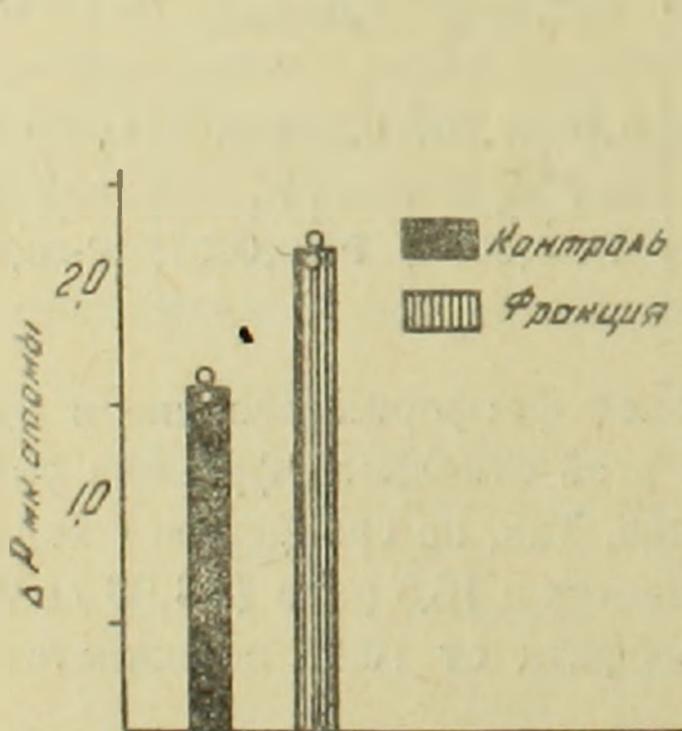


Рис. 1. Влияние липоидо-белковой фракции на АТФ-азную активность митохондрий мозга куриного эмбриона.

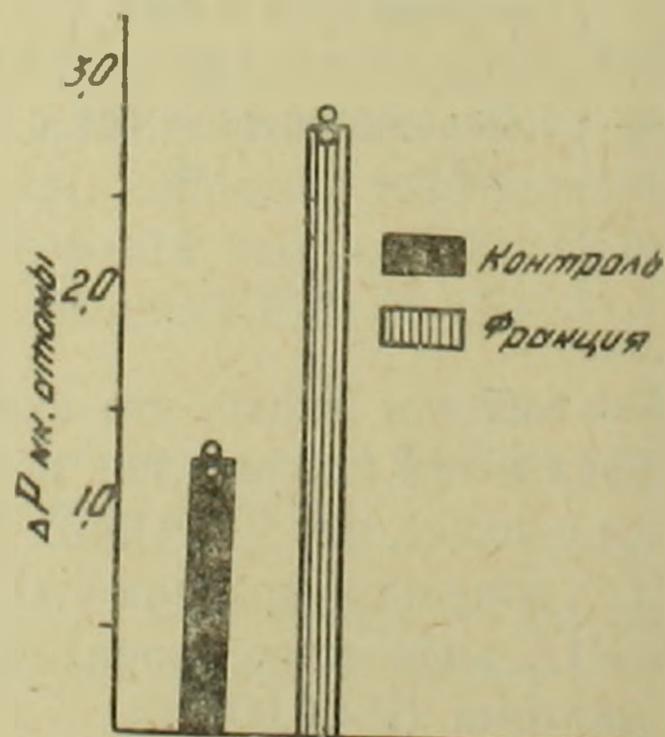


Рис. 2. Влияние липоидо-белковой фракции на АТФ-азную активность 1-дневных цыплят.

Под влиянием фракции активность АТФ-азы митохондрий мозга 1-дневных цыплят повышается более чем в два раза (рис. 2).

Такое же влияние липоидо-белковая фракция оказывает на АТФ-азу мозга кроликов (рис. 3) и белых крыс (рис. 4). Например, активность

фермента кроликов под действием этой фракции повышается в 2,5 раза ($P < 0,001$).

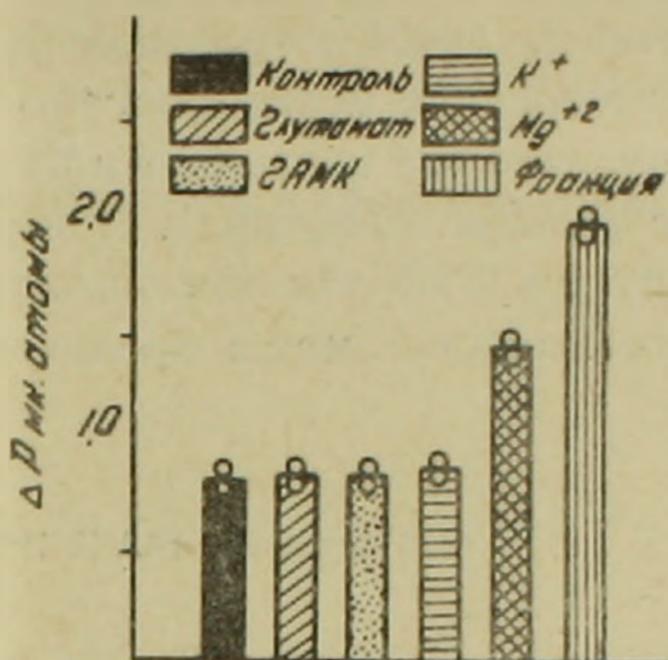


Рис. 3. АТФ-азная активность митохондрий мозга кроликов и влияние глутамата, ГАМК, K⁺, Mg²⁺ и липоидо-белковой фракции на активность фермента.

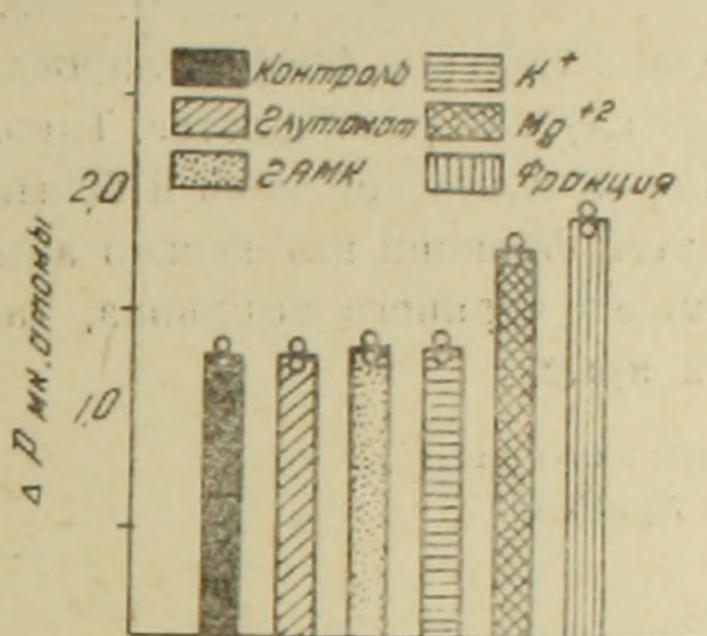


Рис. 4. АТФ-азная активность митохондрий мозга крысы и влияние глутамата, ГАМК, K⁺, Mg²⁺ и липоидо-белковой фракции на активность фермента.

Сравнительное изучение показывает, что под влиянием липоидо-белковой фракции активность АТФ-азы митохондрий мозга кроликов повышается больше, чем у крыс и куриного эмбриона. Такая высокая активность наблюдается и у 1-дневных цыплят. Повышение активности фермента при добавлении этой фракции тесно связано с ее влиянием на процесс окислительного фосфорилирования митохондрий. Как было показано выше, под влиянием фракции больше всего разобщается окислительное фосфорилирование митохондрий мозга кроликов. Это объясняется, по-видимому, воздействием активизированной АТФ-азы, ибо при активном действии фермента расщепляется большое количество макроэргов.

Для сравнения с фракцией, как с хорошим активатором АТФ-азы, мы одновременно испытывали и другие активаторы фермента: γ-аминомасляную кислоту (ГАМК), глутамат, K⁺ и Mg²⁺ (рис. 4 и 5). В каждой пробе опыта брали по 50 мк молей ГАМК или глутамата, 100 мк молей KCl и 10 мк молей MgCl₂.

Опыты показали, что под действием глутамата, ГАМК и K⁺ АТФ-аза митохондрий мозга кроликов и белых крыс почти не активизируется. Эти вещества, как активаторы АТФ-азы, намного уступают липоидо-белковой фракции. Активность фермента повышает только Mg²⁺.

Выводы

Проведенные нами исследования показывают, что с середины плодной стадии эмбрионального развития в печени куриного эмбриона образуется липоидо-белковая фракция, которая сохраняется у 4—5-дневного

цыпленка. Затем постепенно уменьшаясь, липоидо-белковая фракция полностью исчезает у одно-полуторамесячных цыплят.

Предварительные данные показывают, что основную часть этой фракции составляют липиды. Под действием липоидо-белковой фракции окислительное фосфорилирование митохондрий мозга куриного эмбриона глубоко разобщается. Такое же влияние она оказывает и на митохондрии мозга кроликов и белых крыс (зрелые животные). При участии этой фракции интенсивно активизируется АТФ-аза как митохондрий мозга куриного эмбриона, так и митохондрий мозга кроликов и белых крыс.

Институт биохимии
АН АрмССР

Поступило 14.VII 1965 г.

Ա. Ա. ՍԻՄՈՆՅԱՆ

ՀԱՎԻ ՍԱՂՄԻ ԼՅԱՐԴԻՑ ԱՆՁԱՏՎԱԾ ԼԻՊՈՒԴՈ-ՍՊԻՏԱԿՈՒՑԱՅԻՆ,
ՖՐԱԿՑԻԱՅԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՈՒՂԵՂԻ ՄԻՏՈՔՈՆՆԵՐԻԱՆԵՐԻ
ՕՔՍԻԴԱՅԻՈՆ ՖՈՍՖՈՐԻԼԱՑՄԱՆ ՎՐԱ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Հավի սաղմի լյարդի հոմոգենատը $C-3^{\circ}$ -ի պայմաններում մինչև $9000 \times g$ արագությամբ ցենտրիֆուգելիս մենք անջատել ենք մի լիպոիդո-սպիտակուցային ֆրակցիա: Այդ ֆրակցիան սաղմի լյարդում երևան է գալիս էմբրիոնալ զարգացման պտղային շրջանի երկրորդ կեսից, այսինքն՝ 16—17-րդ օրից, և սկսում է շատանալ 18—21-րդ օրը. այն պահպանվում է նաև ճափ դուրս գալուց հետո մինչև նրա 4—5 օրական հասակը, այնուհետև աստիճանաբար պակասում է և մեկից-մեկուկես ամսական ճտերի մոտ իսպառ վերանում: Այդ ֆրակցիայի քիմիական կազմի ուսումնասիրությունը ցույց տվեց, որ նրա 74,5% -ը կազմում են լիպիդները, իսկ 25,4% -ը՝ սպիտակուցներ և սպիտակուցանման նյութեր: Լիպոիդո-սպիտակուցային ֆրակցիայի ազդեցության տակ հավի սաղմի, ինչպես նաև մեկ օրական ճտերի ուղեղի միտոքոնդրիաների օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացումը ճեղքվում է՝ էսթերիֆիկացված ֆոսֆատի քանակը պակասում է, իսկ շնչառությունը ուժեղանում: Այդ ֆրակցիայի համանման ազդեցություն դիտվում է նաև ճագարների ու սպիտակ առնետների (հասուն կենդանիների) ուղեղի միտոքոնդրիաներում: Լիպոիդո-սպիտակուցային ֆրակցիայի մասնակցությամբ ինտենսիվ ակտիվանում է ինչպես հավի սաղմի և մեկ օրական ճտերի, այնպես էլ ճագարների և սպիտակ առնետների ուղեղի միտոքոնդրիաների ադենոզինտրիֆոսֆատազան:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Скулачев В. П. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи. М., 1962.

2. Умбрейт В. В., Буррис Р. Х., Штауффер Дж. Ф. Манометрические методы изучения тканевого обмена, М., ИЛ., 1951.
3. Lowry O. H., Lopez J. A. J. Biol. Chem., 162, 421, 1946.
4. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
5. Mandel P., Borkowski T., Harth S. and Mardell R. J. Neurochem., 8, 126, 1961.
6. Wattenberg L. W. and Leong J. L. J, Histochem, Cytochem., 8, 296, 1960.