

А. А. СИМОНЯН, Б. А. КАЗАРЯН

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЛИПОПРОТЕИНОВОЙ ФРАКЦИИ, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ ПЕЧЕНИ КУРИНОГО ЭМБРИОНА

По мере онтогенетического развития куриного эмбриона структура печени усложняется, появляются новые физиологические функции, жизненно необходимые для дальнейшего роста организма. Уже на 18-й день онтогенеза по своей морфологии и физиологической значимости печень зародыша почти полностью напоминает печень зрелых птиц [2, 3, 6, 12].

В предыдущих исследованиях из печени куриного эмбриона нам удалось выделить отдельную липопротеиновую фракцию [7, 8, 10]. Фракция эта желтого цвета, суспензируется в воде, растворяется в ацетоне, эфире и в других органических растворителях, а также при нагревании. По сравнению с другими компонентами печени эта фракция легкая и при центрифугировании гомогената при $9000 \times g$ собирается на поверхности надосадочной жидкости.

Печень куриного эмбриона в течение онтогенеза по цвету претерпевает ряд изменений: до 13—14-дневного возраста по окраске она напоминает печень зрелых птиц, затем постепенно приобретает желтый цвет и на 17—18 день становится светло-желтой. Эта окраска сохраняется также и в постнатальном периоде—до 10—15-дневного возраста цыпленка. Позже печень постепенно становится коричневой и у 1—2-месячных цыплят приобретает цвет, характерный для зрелых птиц.

Изменение окраски печени куриного эмбриона в течение онтогенетического развития, по-видимому, обусловливается различной концентрацией вышеуказанной липопротеиновой фракции.

Результаты наших исследований согласуются с литературными данными. Так, например, Крок наблюдал накопление липидов в протоплазме печеночных клеток у 9-и дневных куриных эмбрионов [2]. Увеличение жиров в печени утят в эмбриогенезе показал в своих исследованиях Махинько и сотр. [3]. На накопление липидов в организме развивающегося зародыша птиц указывают также Прицкер [5] и Третьяков [11]. В исследованиях Мак Грила [15] показано, что с 14-го по 20-й день инкубации количество эстрагированного эфиром жира из бокового брюшинного тела увеличивается более чем в 8 раз. За этот же период содержание воды в грудных и брюшинных жировых телах уменьшается с 77 до 27% их общего веса. Увеличение количества стерина в плазме крови с 15-го дня инкубации наблюдал Шейде [16]. Следует отметить, что печень молодых крысят также более богата липидами, чем печень старых животных [13].

В наших исследованиях [7, 8] было показано, что в определенном периоде онтогенетического развития процесс накопления жиров и обра-

зования липопротеиновой фракции в печени куриного эмбриона находится в тесной взаимосвязи с окислительным фосфорилированием.

Накопление липидов в печени, по-видимому, имеет значение не только как источник питания для развивающегося эмбриона, как об этом до сих пор отмечалось в литературе. Тем более, что в конце зародышевого цикла и в постнатальном периоде цыпленок имеет такой источник питания, как желточный мешок [17]. Липиды, накопленные в печени, также усваиваются организмом, однако, по сравнению с желточным мешком, они как питательный материал имеют второстепенное значение. В предыдущих исследованиях нами было показано участие липопротеиновой фракции в процессе регуляции свободного и сопряженного окисления в митохондриях мозга и печени [7, 8]. Под влиянием этой фракции количество поглощенного кислорода увеличивалось, однако процесс эстерификации неорганического фосфата подавлялся. Последнее, по-видимому, связано с повышением АТФ-фосфогидролазной активности, а также с действием некоторых липидов.

Методика. Для выделения липопротеиновой фракции печень нескольких эмбрионов гомогенизировали в 0,25 М растворе сахарозы (рН 7,4). Полученный гомогенат центрифугировали при 9000 xg (температура 0—3°C). Выделенную фракцию повторно суспендировали в сахарозе и центрифугировали. При этом высвобождалась относительно чистая, отделенная от компонентов клеток, фракция. Полученную фракцию высушивали фильтровальной бумагой и использовали в опытах.

Подробное описание применяемых методик выделения и определения чистоты митохондриальной фракции мозговой ткани приведено в наших предыдущих сообщениях [1, 9].

Для определения аминокислот пробы инкубировали в К-фосфатном буфере (рН 7,4) в течение 1 часа с 10 мин. прединкубацией. Митохондрии, соответствующие 500 мг свежей ткани или 2—3 мг белка, инкубировали в 2,0 мл среды при 26°. В пробы вносили по 100 мг (мокрый вес) липопротеиновой фракции.

В инкубационную среду вносили: К-фосфатный буфер—0,6 мл, сахарозу—0,6 мл (рН 7,4) и 0,5 мл митохондрий, выделенных из мозговой ткани. После инкубации реакцию приостанавливали добавлением 0,5 мл 40% трихлоруксусной кислоты. В трихлоруксусном фильтрате разделение аминокислот производили электрофоретическим [4] и хроматографическим методами. Электрофорез производили при 1—2° (рН 4,1). Использовали буфер, состоящий из 28 мл перегонного пиридина, 105 мл ледяной уксусной кислоты в 3,5 воды. Ленты проявляли 0,5% раствором нингидрина в ацетоне. Для приготовления нингидринового раствора смешивали 95 частей 0,5% раствора нингидрина в ацетоне, 1 часть ледяной уксусной кислоты и 4 части воды. Раствор нингидрина смешивали с уксусной кислотой и водой непосредственно перед определением.

Хроматографию проводили на бумаге ватман № 1. В качестве подвижных растворителей были использованы системы н-бутанол-уксусная кислота—вода в соотношении 4 : 1 : 5. Наиболее четкое разделение изу-

чаемых аминокислот достигалось после 3-кратной хроматографии. Стандартные растворы аминокислот наносили в различных количествах с правой и левой стороны хроматограммы, что облегчало идентификацию аминокислот. Эти стандарты служили для построения калибровочной кривой.

Полученные данные вычисляли из расчета на 1 мг белка, который определяли по Лоури и сотр. [14].

Результаты исследования и обсуждение. Опыты по исследованию аминокислотного состава липопротеиновой фракции показывают, что после гидролиза значительно увеличивается количество свободных аминокислот: глутаминовой и аспарагиновой кислот, лизина и аргинина (табл. 1). При этом количество глутамата по сравнению с контролем увеличивается приблизительно в 7, а лизина и аргинина—2,5 раза.

Таблица 1

Свободные аминокислоты в липопротенновой фракции до и после гидролиза.
Аминокислоты в мкг/500 мг фракции

Показатели	Глутамат	Аспартат	Лизин и аргинин	Нейтральные аминокислоты
До гидролиза	19,5	24,0	98,2	следы
После гидролиза . .	135,0	112,2	244,9	увеличено примерно в 6 раз

Определение аминокислот производили электрофоретическим способом. Гидролиз при 105° в течение 2 суток в 6N HCl. Средние данные из 5 опытов.

После гидролиза значительно возрастает количество нейтральных аминокислот. Так как эти аминокислоты не определяются в условиях нашего опыта, для их идентификации мы пользовались хроматографическим методом (табл. 2). Проведенные опыты показывают, что после гидролиза липопротеиновой фракции количество свободных аминокислот увеличивается.

Таблица 2

Свободные аминокислоты в липопротеиновой фракции до и после гидролиза
(аминокислоты в мг %)*

Аминокислоты	До гидролиза	После 1-суточного гидролиза	После 2-х суточного гидролиза	
			I серия	II серия
Лизин	2,0	6,0	11,5	14,5
Гистидин	—	следы	4,0	3,5
Аспартат	—	6,5	15,5	14,0
Серин	следы	2,0	6,0	6,0
Глицин	следы	1,5	9,0	7,0
Треонин	—	2,2	6,2	8,0
Аланин	—	9,2	19,9	19,5
Тирозин	—	следы	2,8	3,0
Цистеин+цистин	—	—	следы	следы
Глутамат	следы	5,0	12,5	13,0

* Аминокислоты определяли хроматографическим методом. Гидролиз при 105° в течение 1 и 2 суток в 6N HCl.

Во второй части работы нами изучалось влияние липопротеиновой фракции на процесс утилизации свободных аминокислот в митохондриях мозговой ткани куриного эмбриона (табл. 3). Добавленная липопротеиновая фракция не оказывает действия на процесс утилизации глутамата,

Таблица 3

Влияние липопротеиновой фракции на утилизацию свободных аминокислот в митохондриях мозга куриного эмбриона при 26° (аминокислоты в мкг/мг белка, средние данные из 5 опытов)

Инкубационная смесь	Глутамат	Аспартат	ГАМК	Лизин и аргинин	Глутатион
К-фосфатный буфер+митохондрии (до инкубации)	11,7	3,4	3,5	2,4	7,1
К-фосфатный буфер+митохондрии (после инкубации)	10,0	10,8	3,8	3,0	6,9
К-фосфатный буфер+липопротеиновая фракция (до инкубации)	1,8	2,5	0,8	2,8	1,5
К-фосфатный буфер+липопротеиновая фракция (после инкубации) . .	1,8	1,6	0,9	2,0	1,2
К-фосфатный буфер+липопротеиновая фракция+митохондрии (до инкубации)	13,6	4,1	4,3	5,8	7,0
К-фосфатный буфер+липопротеиновая фракция+митохондрии (после инкубации)	12,2	12,4	4,6	7,5	6,0

В инкубационную смесь входили: К-фосфатный буфер 0,6 мл (рН 7,4), липопротеиновая фракция 0,6 мл (соответствующая 100 мг выделенной фракции) и митохондрии, выделенные из мозговой ткани куриного эмбриона, соответствующие 2—3 мг белка. Инкубацию производили при 26° в течение 1 часа с 10-мин. прединкубацией.

а также не влияет на превращения гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), аспартата, лизина, аргинина и глутатиона.

Имея в виду важное значение температурного фактора в утилизации свободных аминокислот в мозговой ткани, мы испытывали воздействие липопротеиновой фракции на утилизацию свободных аминокислот также при 37°. Данные, приведенные в табл. 4, показывают, что при инкубировании митохондрий мозга в этих условиях глутаминовая кислота несколько усваивается. Однако при участии липопротеиновой фракции утилизация глутамата подавляется, и в среде происходит новообразование глутамата. После инкубации происходит новообразование аспарагиновой кислоты. При этом прирост аспартата превышает убыль глутаминовой кислоты. Можно допустить, что часть аспарагиновой кислоты образуется за счет других источников. Под влиянием липопротеиновой фракции усиливается процесс новообразования аспарагиновой кислоты и увеличивается ее количество по сравнению с пробами без фракции.

Процесс превращений гамма-аминомасляной кислоты, лизина и аргинина, а также глутатиона по сравнению с контролем после инкубации существенных изменений не претерпевает.

Таблица 4

Влияние липопротеиновой фракции на утилизацию свободных аминокислот в митохондриях мозга куриного эмбриона при 37° (аминокислоты в мкг/мг белка, средние данные 5 опытов)

Инкубационная смесь	Глутамат	Аспартат	ГАМК	Лизин и аргинин	Глутатион
К-фосфатный буфер+митохондрии (до инкубации)	10,0	3,4	1,9	4,0	5,6
К-фосфатный буфер+митохондрии (после инкубации)	9,2	5,9	1,5	4,5	3,3
К-фосфатный буфер+липопротеиновая фракция (до инкубации)	0	0,2	0	1,3	0
К-фосфатный буфер+липопротеиновая фракция (после инкубации) . .	0,5	0,5	0	1,3	0
К-фосфатный буфер+митохондрии+липопротеиновая фракция (до инкубации)	12,5	3,2	2,3	5,6	4,6
К-фосфатный буфер+митохондрии+липопротеиновая фракция (после инкубации)	14,3	7,6	1,5	6,4	3,7

В инкубационную смесь входили: К-фосфатный буфер 0,6 мл (рН 7,4), липопротеиновая фракция 0,6 мл (соответствующая 100 мг выделенной фракции) и митохондрии, выделенные из мозговой ткани, соответствующей 2—3 мг белка. Время инкубации 1 час.

Институт биохимии
АН АрмССР

Поступило 5.II 1967 г.

Ս. Ս. ՄԻՄՈՆՅԱՆ, Բ. Ա. ԴԱԶԱՐՅԱՆ

ՀԱՎԻ ՍԱՂՄԻ ԼՅԱՐԴԻՅ ԱՆՋԱՏՎԱԾ ԼԻՊՈՊՐՈՏԵԻՆԱՅԻՆ ՖՐԱԿՑԻԱՅԻ ՄԻ ՔԱՆԻ ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏՎՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Մեր նախընթաց հետազոտություններում մեզ հաջողվել է հավի սաղմի Լյարդի հոմոգենատից անջատել լիպոպրոտեինային մի ֆրակցիա [7, 8]: Այդ ֆրակցիայի մասնակցությամբ *in vitro* փորձերում ուղեղի և Լյարդի միտոքոնդրիաներում օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացումը ճեղքվում է՝ շնչառությունը ինտենսիվանում է, իսկ անօրգանական ֆոսֆատի էսթերիֆիկացումը՝ ճնշվում: Այդ երևույթը, հավանաբար, կապված է ԱՏՖ-ֆոսֆոհիդրոլազայի ակտիվության մեծացման, ինչպես նաև օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացման վրա որոշ լիպիդների ներգործության հետ: Ելնելով միտոքոնդրիաներում օքսիդացման պրոցեսներում նշված ֆրակցիայի կարևոր մասնակցությունից, այս աշխատության մեջ մեր նպատակն է եղել հետազոտել նրա բաղադրությունը և ազդեցությունը ուղեղում մի քանի ազատ ամինաթթուների քանակական տեղաշարժերի ու փոխանակության վրա:

Հետազոտությունների արդյունքները ցույց են տալիս, որ հավի սաղմի լյարդից անջատված լիպոպրոտեինային ֆրակցիան 6N HCl-ի մեջ 150°-ում հիդրոլիզելուց հետո անջատվում են մի շարք ամինաթթուներ՝ գլուտամինաթթու, ասպարագինաթթու, լիզին և արգինին, հիստիդին, սերին, գլիցին, տրեոնին, ալանին, տիրոզին, ցիստեին, ինչպես նաև ցիստին ու գլուտատիոն: Նշված ամինաթթուները համապատասխան լիպիդների հետ միասին կազմում են լիպոպրոտեինային ֆրակցիան:

Փորձերը ցույց են տալիս, որ ուղեղի միտոքոնդրիաները 26°-ում, ինկուբացնելու դեպքում լիպոպրոտեինային ֆրակցիայի ազդեցությամբ գլուտամատի, ասպարտատի, գամա-ամինակարագաթթվի, լիզինի և արգինինի, ինչպես նաև գլուտատիոնի յուրացման պրոցեսը փոփոխության չի ենթարկվում: 37°-ում լիպոպրոտեինային ֆրակցիան արգելակում է գլուտամատի յուրացումը, սակայն մյուս ամինաթթուների քանակական տեղաշարժերի վրա չի ազդում:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бунятян Г. Х., Симонян А. А. ДАН АрмССР, т. 41, 2, 97, 1965.
2. Крок Г. С. Тр. Харьковского вет. ин-та, т. 20, 42, 1949.
3. Махинько В. И., Перепелица Р. Г., Потапенко Л. М., Шейн С. А. Материалы симпозиума по основным проблемам возрастной физиологии и биологии. Изд. ХГУ, 237, 1965.
4. Пасхина Т. С. Биохимия, 19, 702, 1954.
5. Прицкер И. Я. ДАН СССР, т. 28, 4, 381, 1940.
6. Рагозина М. Г. Развитие зародыша домашней курицы. Изд. АН СССР, М., 1961.
7. Симонян А. А. Изв. АН АрмССР (сер. биол.), т. 18, 11, 1965.
8. Симонян А. А. ДАН АрмССР, т. 41, 5, 1965.
9. Симонян А. А. Изв. АН АрмССР (сер. биол.), т. 18, 9, 1965.
10. Симонян А. А. Окислительное фосфорилирование в митохондриях мозга и печени куриного эмбриона в течение эмбриогенеза и постэмбриональном периоде. Автореферат канд. диссерт., Ереван, 1966.
11. Третьяков Н. П. Инкубация, Сельхозгиз, М., 1953.
12. Шмидт Г. А. Эмбриология животных, ч. I. Общая эмбриология, М., 1951.
13. Bernhard K., Lindlar F. Helv. physiol. et pharmacol. acta, 14, 1, 113, 1956.
14. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
15. McGreal R. D. Poultry Sci., 35, 5, 1066, 1956.
16. Schjeide O. A. J. Biol. Chem., 214, 1, 315, 1955.
17. Witschi E. Development of vertebrates. Philadelphia—London, 226, 1956.