

Г. В. КАМАЛЯН, Л. Р. КАНАЯН, А. М. КАРАДЖЯН

ИНДУЦИРОВАННЫЕ МОНОЭТАНОЛАМИНОМ ИЗМЕНЕНИЯ ФОСФОЛИПИДОВ В ЛИПОПРОТЕИДАХ ЯИЧНОГО ЖЕЛТКА КУР

В наших работах по изучению роли моноэтаноламина в обменных процессах организма животных [2, 3] было установлено улучшение инкубационных качеств яиц, что выразилось, в частности, в увеличении выводимости цыплят. При этом было показано увеличение липоидного фосфора в желтке неоплодотворенных яиц. Указанные факты привели к необходимости более детального изучения фосфолипидов в яичном желтке неоплодотворенных яиц для выяснения сдвигов базисного состояния их. Это дает возможность в дальнейшем проследить изменения фосфолипидов в эмбриогенезе. С этой целью в 1969 году нами был проведен ряд опытов.

Изучению были подвергнуты в первую очередь фосфолипиды, входящие в состав липопротеидного комплекса (связанные), а также «свободные» фосфолипиды желтка.

Необходимость такого исследования диктуется, с одной стороны, ролью липопротеидного комплекса как при оплодотворении [1], так и при последующем развитии зародыша (достаточно сказать, что липопротеиды составляют примерно 31% сухого вещества желтка [6]), с другой,— фосфолипиды, являясь биологически весьма активными соединениями, составляют довольно высокий процент в липопротеидном комплексе, а именно в липовителлине их содержится 16—18%, а в липовителленине— 36—41% [6—11]. Вполне вероятно, что изменение этого компонента отразится на поведении всего комплекса в процессе эмбриогенеза. Высокую активность фосфолипидов в обменных процессах, в свете современных представлений об их биологической роли, трудно переоценить. Более того, фосфолипиды, без которых не строится ни одна клеточная структура и не может протекать ни один клеточный процесс, надо ставить на один уровень с биологической значимостью белков [4].

Очевидно, что изучение фосфолипидов, как «связанных», т. е. входящих в состав липопротеидов желтка, так и «свободных», представляет интерес, особенно в случае индуцированных изменений.

Материал и методика. Материалом для наших исследований служили липопротеиды, а именно липовителлин и липовителленин, выделенные из желтка интактных яиц и яиц от кур, получавших с кормом стимулирующую дозу моноэтаноламина (5 мг на 1 кг

живого веса). Куры контрольной и опытной групп русской белой породы находились в клеточных условиях содержания. Кормление велось по нормам, разработанным ВНИИП.

Липопротейды выделяли из смеси нескольких желтков после тщательного перемешивания их.

Липовителлин выделяли по методу Олдертона и Феволда [5], желток растворяли в охлажденном дистилляте (1:2) и подвергали скоростному центрифугированию в рефрижераторной центрифуге; при этом он образует плотный осадок.

Липовителленин выделяли по методу Феволда и Лаустен [6] из центрифугата, полученного при осаждении липовителлина удалением из него «свободных» липидов, что достигалось обработкой охлажденным эфиром, освобожденным от перекисей. Оба липопротейда затем обрабатывали охлажденным эфиром до полного удаления остатков свободных липидов.

Полученный материал по основным параметрам был близок к описанному указанными авторами. Общий азот липовителлина и липовителленина, по Феволду, составляет 13 и 9,9—10% соответственно, а в нашем материале—12,4 и 9,7%.

Фосфолипиды, по Феволду, составляют в липовителлине—16—18%, а в липовителленине—36—41%. У нас соответственно получено 17,5 и 52%. Несколько повышенный процент фосфолипидов в нашем материале обусловлен тем, что Феволд экстрагировал фосфолипиды алкоголем (потому в его исследованиях речь идет о алкогольрастворимых фосфолипидах), тогда как мы экстрагировали метанол-хлороформенной смесью, что обычно дает более высокий выход их.

Метанол-хлороформенный раствор фосфолипидов наносили на бумагу, пропитанную кремневой кислотой и хроматографировали по методу Маринетти и Стотца [7, 8].

«Свободные» фосфолипиды получали при выделении липовителленина и обработке липопротейдов эфиром. После удаления эфира фосфолипиды растворяли в метанол-хлороформенной смеси и хроматографировали, как указано выше.

Полученные фракции экстрагировали 0,5 н раствором HCl на метаноле, минерализовали, и фосфор определяли спектрометрически при длине волны 820 мμ.

Результаты исследований. Полученные данные (табл. 1) показывают, что под действием моноэтаноламина в процессе овогенеза происходит значительное и достоверное увеличение «связанных» фосфолипидов, в расчете как на 1 г сухого вещества желтка (19,2%), так и на 1 г сухого вещества липопротейдов (19%). При этом наблюдается уменьшение «свободных» фосфолипидов (19%).

В желтке интактного яйца (контроль) «связанными» оказываются примерно половина всех фосфолипидов, что совпадает с данными Феволда и Лаустен [6].

Хроматографический анализ фосфолипидов, как входящих в липопротейды, так и «свободных», выявил 5 фракций, которые были идентифицированы (считая от стартовой линии): лизолецитин, монофосфоинозитид, сфингомиелин, лецитин, этаноламинфосфатид.

В процентном отношении к общей сумме «связанных» фосфолипидов фракции распределялись следующим образом: наибольшая—лецитин (67,8—70,5%), затем этаноламинфосфатид (20,3—21,5%), остальные фракции составили по 3—4% каждая. В «свободных» фосфолипидах лецитин оказалось 70—71%, этаноламинфосфатида—23,2—23,7%, сфингомиелина—2,2—2,37%, монофосфоинозитида—1,95—2,18% и лизолецитина—1,48—1,59%.

Таким образом, «свободные» фосфолипиды отличаются от «связанных» несколько большим содержанием лецитина и этаноламинфосфати-

Таблица 1

Содержание фосфора „связанных“ и „свободных“ фосфолипидов,
мг на 1 г сухого вещества

	В 1 г сухого вещества желтка				В 1 г сухого вещества липопротеидов	
	связанные		свободные		связанные	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
1	11,56	13,5	8,02	7,75	28,7	33,9
2	10,50	12,5	9,41	7,77	27,1	31,3
3	10,30	13,4	9,90	9,31	25,6	33,5
4	12,30	13,3	10,84	8,88	30,7	33,4
5	11,15	13,9	—	—	28,0	34,9
Среднее	11,16	13,3/119,2%	10	8,1/81%	28,0	34,4/119%
Достоверность	P<0,02		P<0,05		P<0,05	

да (1—2%) и меньшим содержанием остальных фракций: сфингомиелина—на 0,5—1,2%, монофосфоинозотида—на 1—1,3%, лизолецитина—на 2,2—2,4%. При анализе фракционного состава фосфолипидов по отдельным липопротеидам (табл. 2) выяснилось, что при одинаковом наборе

Таблица 2

Фракционный состав фосфолипидов, входящих в липопротеиды (в среднем),
мг фосфора в 1 г сухого вещества

Фракции фосфолипи- дов	Л и п о п р о т е и д ы							
	липовителлин				липовителленин			
	контроль	опыт	% к контролю	достоверность	контроль	опыт	% к контролю	достоверность
	мг фосфора	мг фосфора			мг фосфора	мг фосфора		
Лизолецитин . . .	0,29	0,30	103,4	p>0,05	0,85	1,02	120	p<0,05
Монофосфоинозитид	0,25	0,24	96,0	p>0,05	0,73	0,71	97,2	p>0,05
Сфингомиелин . . .	0,26	0,25	96,1	p>0,05	0,72	0,69	95,8	p>0,05
Лецитин	4,96	5,61	113,1	p<0,02	14,50	17,75	122,4	p<0,02
Этаноламинфосфатид	1,55	1,75	112,9	p>0,05	4,27	5,00	117,0	p<0,05
Сумма	7,30	8,10	114,0	p<0,05	21,07	25,17	119	p<0,05

фосфолипидов, входящих в липовителлин и липовителленин, имеет место изменение отдельных фракций его. Эти изменения не одинаковы и в большей степени затрагивают липовителленин, т. е. липопротеид, более богатый фосфолипидами. Так, в липовителлине увеличиваются 2 фракции

(лецитин—на 13,1 и этаноламинфосфатид—на 12,9%, причем достоверно увеличивается только лецитин), а в липовителленине достоверно увеличиваются 3 фракции: (лецитин—на 22,4, лизолецитин—на 20 и этаноламинфосфатид—на 17%; при этом, как видим, % увеличения во втором липопротенде выше, чем в первом).

В «свободных» фосфолипидах отмечается достоверное уменьшение всех фракций в сумме на 19%.

Полученные данные показывают, что моноэтаноламин вызывает определенные изменения в распределении фосфолипидов в желтке неоплодотворенного яйца, а именно увеличение «связанных» и уменьшение «свободных». Этот факт сам по себе уже примечателен. Не пытаясь заранее предсказать возможное влияние его на ход эмбриогенеза, хотим отметить, что уменьшение «свободных» фосфолипидов наблюдается в такой биологически ответственный момент, как оплодотворение и первые минуты после него [10].

Иначе говоря, фосфолипиды вовлекаются в обмен с самых начальных и чрезвычайно ответственных стадий развития. Возможно, что измененное соотношение фосфолипидов (в нашем опыте) будет иметь определенное значение в дальнейшем развитии.

В доступной нам литературе мы не обнаружили работ относительно фосфолипидного состава липопротендов. Что касается цельного желтка, то кроме трех, постоянно фигурирующих фракций—лецитин, этаноламинфосфатид и сфингомиелин—хроматографическим методом выявлено еще 2—фосфатидилсерин и дифосфотидилглицерол [9]. Нами же обнаружены лизолецитин и монофосфоинозитид, которые идентифицированы по их R_f в крови. Результаты опытов показали, что под действием моноэтаноламина происходит значительное увеличение в липопротенидах таких фракций фосфолипидов, как лецитин, этаноламинфосфатид и лизолецитин. В свете существующих представлений относительно роли лизолецитина в яичном желтке оплодотворенного яйца как биологически активного соединения с высокой скоростью обмениваемости, а не лизирующего фактора, наличие его в желтке неоплодотворенного яйца может представлять интерес. В данном случае речь идет об образовании из лизолецитина ацетилхолина после оплодотворения, что показано Нуманом [1] на гомогенате яиц морского ежа при добавлении сперматозондов. Вообще же образование активного холина, т. е. фосфохолина, через распад лизолецитина, может оказаться в первые часы развития зародыша более экономичным, нежели фосфорилирование имеющегося в желтке холина. С другой стороны, лизолецитин может быть рассмотрен и как промежуточный продукт на пути синтеза лецитина.

Գ. Ո. ՔԱՄԱԼՅԱՆ, Լ. Ռ. ԿԱՆԱՅԱՆ, Ա. Մ. ՂԱՐԱԶՅԱՆ

ՖՈՍՖՈԼԻՊԻԴՆԵՐԻ ՓՈՓՈԽՈՒԹՅՈՒՆԸ ՀԱՎԻ ԶՎԻ ԴԵՂՆՈՒՅԻ
ԼԻՊՈՊՐՈՏԵԻՆԵՐԻ ՄԵՋ ՄՈՆՈԷՔԱՆՈԼԱՄԻՆԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՄԲ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Մոնոէթանոլամին ստացող և չստացող հավերի ձվի դեղնուցում հետազոտվել է «կապված», այսինքն՝ լիպոպրոտեինների մեջ մտնող, և «ազատ» ֆոսֆոլիպիդների փոփոխությունը:

Հայտնաբերված է ինչպես «կապված», այնպես էլ «ազատ» ֆոսֆոլիպիդների 5 ֆրակցիա՝ լիդոլեցիտին, մոնոֆոսֆոնոզիտիդ, սֆինգոմիելին, լեցիտին և էթանոլամինֆոսֆատիդ:

Զբեղմնավորված ձվի դեղնուցի «ազատ» ֆոսֆոլիպիդները տարբերվում են «կապվածներից» լեցիտինի և էթանոլամինֆոսֆատիդի բարձր, իսկ մյուս ֆրակցիաների՝ ցածր բաղադրությամբ: Մոնոէթանոլամինի ազդեցության տակ զգալի ավելանում են «կապված» և պակասում են՝ «ազատ» ֆոսֆոլիպիդները:

Որոշակի փոփոխություն է նկատվում նաև ֆոսֆոլիպիդների առանձին ֆրակցիաների հարաբերության մեջ: Այդ փոփոխություններն ավելի ակնհայտ են արտահայտվում լիպոլիտելենին ֆրակցիայում, որտեղ, բացի լիցիտինից և էթանոլամինֆոսֆատիդից, ավելանում է նաև լիդոլեցիտինը:

Այս փաստը դրսևում է որպես հնարավոր նախադրյալ ձվի բեղմնավորման ժամանակ լիդոլեցիտինից ացետիլխոլինի կամ լեցիտինի առաջացման համար:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Дорфман В. А. Физико-химические основы оплодотворения, М., 1963.
2. Камалян Г. В. Коламин и его биологическое значение. Ереван, 1960.
3. Камалян Г. В. Коламин как новый стимулятор роста животных и растений. Ереван, 1965.
4. Кренис Е. М. Фосфолипиды клеточных мембран нервной системы в развитии животного мира, Л., 1967.
5. Alderton G., Fevold H. L. Arch. Biochem., 8, 415, 1945.
6. Fevold H. L. and Lausten Adele. Arch. of Biochem., New-York, 1946.
7. Marinetty G. W. a. Stotz E. Biochem., Biophys. Acta, v. 137, 571, 1960.
8. Marinetty G. W. J. of Lipids Res., v, 3, 1, p. 20, 1962.
9. Noble a. Moore. Canad. J. of Biochem., v. 43, 10, 1965.
10. Ricotta C. M. B. Experientia, 12, 104—105, 1956.
11. Yung J. and Finney G. J. of Biol. Chem., 193, 73, 1951.