А. А. СИМОНЯН

СВОБОДНЫЕ АДЕНИНМОНОНУКЛЕОТИДЫ В МОЗГУ КУР В ОНТОГЕНЕЗЕ

Роль свободных нуклеотидов в животном организме значительна и многообразна [9]. Содержание их в ходе эмбрионального развития в связи с интенсивными синтетическими процессами, протекающими при росте и дифференциации его тканей, может быть подвержено значительным колебаниям. Имеющиеся в настоящее время данные позволяют предположить, что функциональное состояние нервной системы в онтогенезе животных связано с содержанием и интенсивностью распада ряда фосфорных соединений [3, 7, 8, 10, 13, 19, 20—22, 24, 25, 27—29, 32—34]. Однако процесс распада аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) изучен весьма недостаточно, особенно в ходе эмбрионального развития.

В течение развития зародыша птиц внутри яйца вследствие окислительно-восстановительных процессов образуется большое количество энергии. Куриное яйцо в течение 21 дня инкубации выделяет 16—23 ккал свободной энергии [12]. Начиная с 13-го дня развития у эмбриона появляются черты, характерные для теплокровных животных. С этого времени температура внутри яйца, постепенно повышаясь, доходит до 40—44° и приближается к температуре тела зрелых птиц. Так, температура на поверхности яйца на 9-ый день развития составляет 38,5°, а внутри—37,6°, доходя на 12-й день на поверхности, до 38,4° и 39,7°—внутри. Увеличиваясь, эта разница составляет 5—7°. Как и каким путем образуется свободная энергия? В наших предыдущих работах было показано, что в течение развития куриного эмбриона в митохондриях, выделенных из мозговой ткани, интенсивность дыхания постепенно возрастает, одновременно уменьшается коэффициент соотношения окисления и фосфорилирования [5, 14—16]. Параллельно с этим стимулируется активность АТФ-азы (КФ 3.6.1.3. АТФ-фосфогидролаза). Вследствие интенсивного расщепления АТФ температура тела цыпленка повышается.

В настоящей работе мы задались целью изучить количественные сдвиги аденинмононуклеотидов (АТФ, АДФ и АМФ), а также креатинфосфата и свободного неорганического фосфата, в мозгу куриного эмбриона в ходе его развития.

Методика. Исследования проводили начиная с плодной стадии развития (с 13-го дня) до вылупления цыпленка, а также на 1—5-дневных цыплятах и зрелых курах. Возраст эмбриона определяли по срокам инкубации и регистрировали по морфологическим таблицам развития куриного эмбриона Лилли и Дювала [23, 26, 30].

Для определения АТФ, АДФ и АМФ замороженный жидким азотом мозг (1 г) растирали в фарфоровой ступке и заливали 4-мя объемами 5% трихлоруксусной кислоты. Экстракцию проводили 15 мин на холоду при частом помешивании. Осадок удаляли центрифугированием. К трихлоруксусному центрифугату добавляли ртутный реактив из расчета 1 мл 20% $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Hg}$ в 2% CH_3COOH на 2 мл центрифугата [18]. Ртутный осадок компонентов адениловой системы отделяли центрифугированием, размешивали в 0,3 мл воды и разлагали сероводородом в течение 10 мин (на холоду). Затем суспензию аэрировали в течение 3 мин, и взвесь удаляли центрифугированием. Центрифугат, содержащий свободные адениловые нуклеотиды, сливали в пробирку и наносили на линию старта бумаги. Кроме опытного раствора, наносили также свидетели—раствор, содержащий АТФ, АДФ и АМФ. Для хроматографического анализа мы использовали отечественную бумагу производства Ленинградской бумажной фабрики № 2 [6]. Бумага позволяла осуществлять разделение изучавшихся нами компонентов за 15—18 часов. Мы применяли нисходящую хроматографию. Для разделения адениновых соединений в качестве растворителя использовали смесь изоамилового спирта и 2,5% цитрата. Выявление адениновых соединений производили в ультрафиолетовом свете с применением ультрамикроскопа Брумберга [4].

Определение креатинофосфата проводили по методу Алексеевой [1, 2]. Навеску в 0,5 г полученного порошка замороженного мозга помещали в пробирку с 10 мл 0,7% раствора $(\text{NH}_4)\text{MoO}_4$ в 1 H_2SO_4 и тщательно перемешивали. Экстракция продолжалась 40 мин. Осаждавшиеся при этом белки отфильтровывали путем центрифугирования и в фильтрате количественно определяли креатинин. Для этого в колбочку на 50 мл брали 1 мл фильтрата, добавляли 1,5 мл 10% NaOH и 8 мл насыщенного раствора пикриновой кислоты. Смесь оставляли на 10 мин для развития окраски, после чего содержимое колбочки доводили водой до метки и колориметрировали. Расчеты производили по кривой, полученной со стандартным раствором креатинина.

Свободный неорганический фосфат в мозгу определяли методом Лоури и Лопез [31] в видоизменении Скулачева [17].

Результаты исследований. На различных стадиях развития куриного эмбриона и зрелых кур в мозгу обнаружены три аденинмононуклеотида—аденозинтрифосфат (АТФ), аденозиндифосфат (АДФ) и аденозинмонофосфат (АМФ). Однако как в эмбриогенезе, так и в постнатальном периоде и в мозгу зрелых птиц содержание их разное (табл. 1). Начиная с 13-го и до 16-го дня содержание АТФ почти не меняется. С 17-го дня содержание АТФ в мозгу постепенно начинает возрастать (1,18 мкмоль на 1 г влажной ткани) и в день вылупления составляет 1,43 мкмоль. Этот процесс с подобной динамикой протекает также в постнатальном периоде развития в мозгу 1—5-дневных цыплят (количество АТФ соответственно—1,55 и 1,86 мкмоль). В мозгу зрелых кур содержание АТФ составило 1,76 мкмоль на 1 г влажной ткани. Из данных, приведенных в табл. 1, видно, что по ходу развития эмбриона аналогичным изменениям подвергается также образование АДФ и АМФ. Сумма изученных трех нуклеотидов начиная с 13-го дня увеличивается, и после вылупления в мозгу 5-дневных цыплят их содержание по сравнению с началом плодного периода возрастает почти в 2,5 раза.

Представляет интерес изучить в течение эмбриогенеза кур динамику соотношения АТФ/АДФ. В этом отношении данные, приведенные в табл. 1, показывают, что в течение эмбриогенеза, начиная с 13-го дня, коэффициент АТФ/АДФ постепенно уменьшается. Например, по сравнению с 13-м днем в мозгу 5-дневных цыплят соотношение АТФ/АДФ со-

Таблица 1

Содержание свободных адениновых рибонуклеотидов в мозгу курицы и развивающихся куриных эмбрионов, мкмоль на 1 г влажной ткани, $M \pm m$

День развития	АМФ	АДФ	АТФ	АТФ/АДФ	Сумма
13	0,090 $\pm$ 0,022 (9)	0,211 $\pm$ 0,014 (12)	1,015 $\pm$ 0,030 (12)	4,81	1,316
14	0,097 $\pm$ 0,022 (10)	0,242 $\pm$ 0,038 (10)	1,042 $\pm$ 0,058 (10)	4,30	1,381
15	0,138 $\pm$ 0,002 (4)	0,267 $\pm$ 0,028 (4)	0,997 $\pm$ 0,010 (4)	3,73	1,402
16	0,100 $\pm$ 0,014 (12)	0,281 $\pm$ 0,017 (12)	0,938 $\pm$ 0,093 (12)	3,33	1,721
17	0,120 $\pm$ 0,014 (8)	0,354 $\pm$ 0,024 (11)	1,189 $\pm$ 0,062 (8)	3,35	1,663
18	0,194 $\pm$ 0,017 (14)	0,451 $\pm$ 0,028 (14)	1,290 $\pm$ 0,046 (14)	2,86	1,935
19	0,186 $\pm$ 0,020 (6)	0,598 $\pm$ 0,022 (6)	1,371 $\pm$ 0,059 (6)	2,29	2,155
20	0,141 $\pm$ 0,017 (12)	0,564 $\pm$ 0,017 (12)	1,400 $\pm$ 0,038 (12)	2,48	2,105
21	0,206 $\pm$ 0,010 (6)	0,705 $\pm$ 0,014 (6)	1,433 $\pm$ 0,028 (6)	2,03	2,344
1-дневные цыплята	0,250 $\pm$ 0,014 (10)	0,757 $\pm$ 0,031 (10)	1,515 $\pm$ 0,031 (10)	2,00	2,522
5-дневные цыплята	0,257 $\pm$ 0,028 (4)	1,136 $\pm$ 0,030 (4)	1,864 $\pm$ 0,047 (4)	1,64	3,257
Куры	0,216 $\pm$ 0,022 (4)	0,351 $\pm$ 0,050 (4)	1,766 $\pm$ 0,049 (4)	5,03	2,333

Данные рассчитаны по аденину.

кращалось почти в 3, а у 21-дневных эмбрионов—2,4 раза. Эти данные показывают, что несмотря на активный синтез, АТФ в мозгу эмбриона одновременно интенсивно расщепляется.

Данные содержания креатинфосфата в мозгу показывают, что параллельно развитию эмбриона количество его уменьшается (табл. 2). Так, например, количество креатинфосфата на 13-й день составило 1,36 мкмоль на 1 г влажной ткани, а затем, уменьшаясь, на 21-й день доходило до 0,7. В мозгу кур содержание креатинфосфата составляет 0,76 мкмоль.

Количество неорганического фосфата по ходу развития эмбриона постепенно увеличивается (табл. 3).

Как показывают результаты наших исследований, на различных стадиях онтогенетического развития кур в мозгу содержатся АМФ, АДФ и АТФ. При этом на различных стадиях развития содержание их неодинаково. В начале плодной стадии содержание АТФ низкое и повышается в последние дни инкубации. Такому же изменению подвергается и содержание АДФ и АМФ. Сдвиг содержания АТФ, АДФ и АМФ на различных стадиях развития куриного эмбриона полностью совпадает с литературными данными [34]. Аналогичный количественный сдвиг адениновых рибонуклеотидов Лызлова и Ле Ван Лиен наблюдали в сердечных и скелетных мышцах куриного эмбриона [11].

Таблица 2

Содержание креатинфосфата в мозгу кур в онтогенезе, мкмоль на 1 г влажной ткани, $M \pm m$

День развития	КФ	
13	1,362 $\pm$ 0,038	(8)
14	1,446 $\pm$ 0,055	(8)
15	1,388 $\pm$ 0,038	(4)
16	1,410 $\pm$ 0,001	(8)
17	1,486 $\pm$ 0,020	(8)
18	1,223 $\pm$ 0,170	(12)
19	1,203 $\pm$ 0,140	(4)
20	1,229 $\pm$ 0,067	(8)
21	0,707 $\pm$ 0,010	(8)
1-дневные цыплята	0,742 $\pm$ 0,030	(8)
5-дневные цыплята	1,057 $\pm$ 0,340	(6)
Куры	0,769 $\pm$ 0,043	(4)

Таблица 3

Содержание свободного фосфата в мозгу кур в онтогенезе, мкмоль на 1 г влажной ткани, $M \pm m$

День развития	Рнеорганический
13	1,389 $\pm$ 0,086 (12)
14	2,467 $\pm$ 0,090 (6)
15	2,814 $\pm$ 0,039 (6)
16	3,308 $\pm$ 0,038 (18)
17	3,291 $\pm$ 0,059 (12)
18	3,783 $\pm$ 0,405 (18)
19	3,464 $\pm$ 0,068 (6)
20	4,120 $\pm$ 0,854 (12)
21	4,225 $\pm$ 0,040 (6)
1-дневные цыплята	4,340 $\pm$ 0,413 (18)
5-дневные цыплята	4,020 $\pm$ 0,447 (18)
Куры	3,160 $\pm$ 0,014 (6)

Количество креатинфосфата рассчитано по креатинину.

Таким образом, начиная с плодной стадии (13-го дня) развития в мозгу куриного эмбриона количество адениннуклеотидов (АТФ, АДФ и АМФ) постепенно возрастает и достигает своего максимума после вылупления у 5-дневных цыплят. Соотношение АТФ/АДФ постепенно уменьшается по ходу эмбрионального развития и в постэмбриональном периоде. Содержание креатинфосфата и свободного фосфата в течение эмбрионального развития возрастает. Показанная динамика количественных сдвигов изученных макроэргических соединений в мозгу кур в эмбриогенезе и в постнатальном периоде, по-видимому, соответствует скорости и физиологической особенности дифференциации мозговой ткани на данных стадиях развития.

Институт биохимии
АН АрмССР

Поступило 25.XI 1970 г.

Ա. Ա. ՍԻՄՈՅԱՆ

ԱԶԱՏ ԱՒԵՆԻՆՄՈՆՈՆՈՒԿԼԵՈՏԻՖԵՐԸ ՀԱՎԻ ՈՐԳԱՆՈՒԾ ՕՆՏՈԳԵՆԵՑՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Զարգացման տարրեր ստադիաներում հավի սաղմի, ինչպես նաև հասուն հավերի ուղեղում ուսումնասիրվել է ազատ ադենինմոնոնուկլեոտիդների՝ ադենոզիննոֆոսֆատի (ԱՏՖ), ադենոզիներկֆոսֆատի (ԱԴՖ) և ադենոզինմեկֆոսֆատի (ԱՄՖ) պարունակության դինամիկան: Տույց է տրվել, որ ինչպես էմբրիոգենեզում, այնպես էլ վաղ հետծննդյան շրջանում նրանց քանակությունը փոփոխվում է: Սկսած զարգացման 13-րդ օրից մինչև 16-րդ օրը ԱՏՖ-երի քանակությունը գրեթե նույնն է: 17-րդ օրից ԱՏՖ-երի պարունակությունն

սկսում է աստիճանաբար աճել և իր առավելագույն շափերին հասնել ձվից ձտի դուրս գալուց հետո՝ 5 օրական ձտերի ուղեղում: Սաղմնային զարգացման ընթացքում քանակական նման տեղաշարժի ենթարկվում են նաև ԱԴՖ-ը և ԱՄՖ-ը: Ինչ վերաբերում է ԱՏՖ-ի և ԱԴՖ-ի հարաբերությանը, ապա այն էմբրիոգենեզում աստիճանաբար փոքրանում է:

Կրեատինֆոսֆատի պարունակությունը հավի սաղմի ուղեղում զարգացմանը զուգընթաց պակասում է, իսկ ազատ ֆոսֆատի քանակությունը աստիճանաբար մեծանում: Ուսումնասիրված մակրոէրգային միացությունների քանակական նման տեղաշարժը հավի սաղմի էմբրիոգենեզում հավանաբար համապատասխանում է զարգացման տարբեր ստադիաներում տվյալ հյուսվածքի գիֆերենցման արագությանը և նրա ֆիզիոլոգիական առանձնահատկությանը:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Алексеева А. М. Биохимия, 16, 97, 1951.
2. Алексеева А. М. Биохимия, 21, 243, 1956.
3. Бабский Е. Б. Тезисы 13-го совещания по физиол. пробл. посвящ. памяти И. Павлова, 13, 1948.
4. Брумберг Е. М. ДАН СССР, 72, 885, 1950.
5. Бунятян Г. Х., Симонян А. А. ДАН АрмССР, 41, 2, 97, 1965.
6. Венкстерн Т. В., Баев А. А. Биохимия, 22, 6, 1043, 1957.
7. Владимиров Г. Е. Физиол. журн., 39, 3, 1953.
8. Владимиров Г. Е., Рубель Л. И. ДАН СССР, 96, 1021, 1954.
9. Котельникова А. В. Усп. биол. химии, 3, 206, 1958.
10. Крепс Е. М., Смирнова А. А., Четвериков Д. А. Сб. Биохимия нервной системы. Изд. АН УССР, 125, 1954.
11. Лызлова С. Н., Ле Ван Лиен. Укр. биохим. журн., 5, 493, 1968.
12. Отрыганьев Г. К., Хмыров В. А., Колобов Г. М. Инкубация. Изд. «Колос», 77, 1964.
13. Палладин А. В. Сб. Биохимия нервной системы. Изд. АН УССР, 7, 1954.
14. Симонян А. А., Степанян Р. А. Вопросы биохимии мозга. Изд. АН АрмССР, 2, 104, 1966.
15. Симонян А. А. Окислительное фосфорилирование в митохондриях мозга и печени куриного эмбриона в течение эмбриогенеза и постнатальном периоде. Автореферат канд. диссертации. Ереван, 1966.
16. Симонян А. А. Некоторые стороны энергетического обмена в онтогенезе кур. Изд. АН АрмССР, 68, 1970.
17. Скулачев В. П. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи. Изд. АН СССР, 1962.
18. Сытинский И. А. Биохимия, 21, 3, 359, 1956.
19. Шапот В. С., Громова К. Г. Сб. Биохимия нервной системы. Изд. АН УССР, 139, 1954.
20. Baker W. W., Newburgh R. W. Biochem. J., 89, 510, 1963.
21. Carinci P., Manzoll F. A., Manzoli-Guidotti L. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 42, 202, 1966.
22. Dawson R. M. C., Richter O. Amer. J. Physiol., 160, 203, 1950.
23. Duval M. Atlas d'embryologie. Paris, 1889.
24. Edel S., Poirel G. Bull. Soc. Chim. biol. (Paris), 48, 935, 1966.
25. Garrigan O. W., Chargaff E. Biochim. biophys. Acta, 70, 452, 1963.
26. Hamilton H. Lillies development of the chick. N. Y., 1952.

27. *Ishida J., Taguchi S., Maruyama K.* quoted by Mandel P., *Prog. nucleic Acid Res. mol. Biol.*, 3, 299, 1959.
28. *Klein R., Olsen H. J.* *Biol. Chem.*, 167, 747, 1947.
29. *Leslie I., Davidson J. N.* *Biochim. biophys. Acta*, 7, 413, 1951.
30. *Lillie F. R.* *The development of the chick.* N. Y., 1930.
31. *Lowry O. H., Lopes J. A. J.* *Biol. Chem.*, 162, 421, 1946.
32. *Manzoli F. A., Carini P.* *Boll. Soc. Ital. Biol. sper.*, 41, 1467, 1966.
33. *Stone W. E. J.* *Biol. Chem.*, 149, 29, 1943.
34. *Wegelin I., Manzoli F. A. J.* *Neurochem.*, 14, 1161, 1967.