

могут быть использованы в качестве новых модифицирующих агентов при изучении физиологической роли изоэнзимов фермента и целенаправленном регулировании их активности.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гутова Н. В., Новодарова Г. Н., Колесова Е. М., Вольнин М. Е. Биохимия, 44, 8, 1369—1376, 1979.
2. Давтян М. А. Вопросы биохимии мозга, 4, 231—266, Ереван, 1968.
3. Лукашук Е. П., Кононенко А. А., Захарова Н. И., Рубин А. Б., Новодарова Г. Н., Колесова Е. М., Вольнин М. Е., Биохимия, 45, 2, 73—84, 1980.
4. Скибида Н. П. Журн. физ. химии, 54, 8, 2108—2111, 1980.
5. Трапезникова С. С., Навасардянц Д. Г., Давтян М. А. Биохимия, 47, 2022—2027, 1982.
6. Яцимирский К. Б., Крист Е. Е., Гвяздовская В. Л. В кн.: Константы устойчивости комплексов металлов с биополимерами, Киев, 1979.
7. Bascor Z., Cabello J., Velliz M., Gonzalez A. Biochem. et Biophys. Acta, 128, 149—154, 1986.
8. Carvajal N., Martinez J., Fernandez M. Biochem. et Biophys. Acta, 481, 177—183, 1977.
9. Carvajal N., Martinez J., Montez F., Rodriguez J., Fernandez M. Biochem. et Biophys. Acta, 527, 1—7, 1978.
10. Geyer J. W., Dabich B. Anal. Biochem., 39, 2, 412—418, 1971.
11. Huang W., Askari A. Biochem. et Biophys. Acta, 57, 51—63, 1979.
12. Huang W., Askari A. Biochem. Biophys. Res. Commun., 91, 448—453, 1980.
13. Hyghes M. A. In: The inorganic chemistry of biological processes, N.-Y., 58, 1981.
14. Lowry O. H., Rosenbrough N. S., Farr A. L., Randall R. S. J. Biol. Chem., 193, 275, 1951.
15. Nagurajan B., Gopalakrishna R. J. Sci and Ind. Res., 39, 12, 809—818, 1980.
16. Wells J. A., Werber M. M., Young R. G. Biochemistry, 18, 22, 4803—4809, 1979.

Получено 5.XI 1984 г.

Бюлог. ж. Армения, т. 39, № 5, стр. 393—398, 1986

УДК 616.36+612.396:547.952

## ЭФФЕКТЫ ЭКЗОГЕННЫХ ЦЕРЕБРОЗИДОВ НА КОЛИЧЕСТВЕННОЕ СОДЕРЖАНИЕ АДЕНИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ В ЭРИТРОЦИТАХ КРОВИ

О. П. СОЦКИН, Э. С. СЕКОЯН, Г. М. САРКИСОВА, Ш. Л. ШАХБАТЯН

Ереванский государственный медицинский институт,  
кафедра биофизической и биоорганической химии

**Аннотация** — Изучали количественное содержание адениновых нуклеотидов методом тонкослойной хроматографии на силикагеле, с последующим сканированием на флуоресцентном спектрофотометре. Установлено, что длительное внутрибрюшинное введение беспородным белым крысам cerebrozidov, выделенных из мозговой ткани, сопровождается уменьшением внутриэритроцитарного фонда адениннуклеотидов снижением уровня глюкозы в крови и накоплением гликогена в тканях.

Ամոսուդիս — Աղենիային նուկլեոտիդների քանակական պարունակությունը ուսումնասիրվել է նուրբ շերտային քրոմատոգրաֆիկ եղանակով սիրիկազնյի վրա, զրան հաջորդող ուշադիր հետազոտմամբ ֆլուորեսցենսային սպեկտրոֆոտոմետրի վրա Յույց 1 տրվել, որ ուղեղի հյուսվածքից անչառված ցնրերրոգիզների երկարատև ներորոգվայնային ներմուծումը սպիտակ առնետների ուղեկցվում է աղենիային նուկլեոտիդների ներերթրոցիտար ֆեզի քաջումով, արշան մեղ գլյուկոզայի քանակի նվաղումով և հյուսվածքներում գլիկոզների կուտակմամբ:

**Abstract** — The adenine nucleotides quantitative content has been studied by the method of thinlayer chromatography on the silicagel with following scanning on the fluorescent spectrophotometer. It has been shown that prolonged intraperitoneal application of cerebrozides, isolated from the brain tissue, into white rats is accompanied by the decrease of adenine nucleotides intraerythrocyte fond, lowering of glucose level in blood and accumulation of glycogene in tissues.

**Ключевые слова:** цереброзиды, эритроциты, адениннуклеотиды.

Одной из актуальных задач современной биологии и медицины является установление роли липидов в процессах жизнедеятельности клеток. Учитывая широкий спектр липидов клеточных мембран, на современном этапе особенно актуальным становится вопрос селективного изучения роли отдельных классов липидов и их индивидуальных представителей в механизмах осуществления клеточных функций. В указанном плане наименее изученными являются представители мембранных липидов — гликосфинголипиды.

Все возрастающее число данных свидетельствует о том, что последние, и в особенности ганглиозиды, обладают значительной биологической активностью. Так, в опытах *in vitro* показана их способность подавлять субстратное окисление и снижать эффективность окислительного фосфорилирования [7], влиять на активность транспортной АТФ-азы [13]. Методом флуоресцентных зондов выявлено, что в основе указанных эффектов гликосфинголипидов лежит их способность встраиваться в мембранные структуры клеток, вызывая конформационные перестройки [8]. Существенно, что гликосфинголипиды вызывают функциональные и метаболические сдвиги и в условиях *in vivo*. Так, при их введении животным обнаружены значительные изменения в энергетическом и холинестериновом обменах [14, 19], функциональном состоянии кровь — сосудистая стенка [15]. Полученные данные представляют значительный интерес с точки зрения возможности использования гликосфинголипидов в качестве транспортеров для доставки лекарственных препаратов в составе липосом, а также средств для терапии некоторых неврологических заболеваний [16, 20].

Приведенные данные свидетельствуют об актуальности и научной значимости исследований по изучению влияния гликосфинголипидов на процессы тканевого метаболизма.

В настоящей работе приведены результаты изучения количественного содержания адениннуклеотидов (АТФ, АДФ, АМФ), характеризующих энергообеспечение эритроцитов, уровень глюкозы в крови, а также гликогена в печени и миокарде при введении цереброзидов.

**Материал и методики.** Опыты проведены на белых беспородных крысах—самцах массой 150—180 г, разделенных на две группы. Животным опытной группы в течение 3—4 месяцев интубационно вводили эмульсию цереброзидов, приготовленную на смеси этанол-физиологический раствор в соотношении 1:40 (в объемах) в количестве 0,5 мл из расчета 5 мг цереброзидов на 1 кг массы; контрольной группе—0,5 мл изотонической смеси, не содержащей цереброзиды.

Цереброзиды выделяли из мозга крупного рогатого скота по методу Флауруса [17] с последующей очисткой из колонки с силикагелем марки «Л» фирмы «Хемпел» (ЧССР).

Кровь забивали декапитацией. Кровь собирали в пробирках, содержащих 3,8%-ный раствор цитрата натрия. Эритроциты отделяли от плазмы центрифугированием на рефрижераторной центрифуге К-23 при 1000х<sub>г</sub> в течение 15 мин, с последующей трехкратной промывкой изотоническим раствором трис-HCl буфера (pH 7,4).

Азенинуклеотиды экстрагировали из эритроцитарной массы 6%-ным раствором HClO<sub>4</sub> из расчета 1 мл массы—2 мл раствора HClO<sub>4</sub>. Белки осаждали посредством центрифугирования (16000 об/мин, 2°C, 30 мин). Надосадочную жидкость нейтрализовали сухим K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, чтобы не изменить объем. Перхлорат калия удаляли центрифугированием. Надосадочную жидкость, содержащую азенинуклеотиды, наносили микрошприцем в виде пятен на пластинки для ТСХ «Кизильгель 60 F<sub>254</sub>» фирмы «Мерк» (ФРГ) на расстоянии 15 мм от нижнего края пластинки в конечном объеме 10 мкл. В качестве свидетелей использовали препараты АТФ, АДФ, АМФ фирмы «Сигма» (США). После нанесения образцов и свидетелей на пластинки последние помещали в хроматографическую камеру, предварительно насыщенную парами растворителей. Из рекомендованных систем растворителей наиболее эффективной оказалась система ди-оксалат—вода—11 и вымывка, взятая в соотношении 6:4:1 (в объемах). Хроматографирование проводили при комнатной температуре. Хроматограммы подвергали сканированию в отраженном свете на флуоресцентном спектрофотометре MRF-2 А фирмы «Хятачи» (Япония) с использованием сканирующей приставки от спектрофлуориметра MRF-4 той же фирмы при длине волны 260 нм [3]. Апертуру сканирующего устройства настраивали с учетом диаметра пятен, выявляемых на пластинках с помощью хроматоскопа. Площади пиков отдельных компонентов на денситограммах рассчитывали по [12].

Концентрацию глюкозы в крови определяли по цветной реакции с ортотолуидином с помощью набора реактивов (СССР) и выражали в мг/%. Содержание гликогена в печени и миокарде определяли по [1] и выражали в мг% глюкозы на 1 г влажной ткани.

Полученные результаты обрабатывали общепринятым методом с оценкой достоверности по критерию Стьюдента.

**Результаты и обсуждение.** Как видно из данных, представленных в табл. 1, длительное введение цереброзидов сопровождается снижением большинства показателей, характеризующих энергетический об-

Таблица 1. Сдвиги в содержании азениновых нуклеотидов в эритроцитах при длительном введении цереброзидов, ммоль/100 мл эритроцитарной массы ( $M \pm m$ )

| Показатель | Группа             |                      | Показатель | Группа             |                      |
|------------|--------------------|----------------------|------------|--------------------|----------------------|
|            | контрольная (n=15) | опытная (n=24)       |            | контрольная (n=15) | опытная (n=24)       |
| АТФ        | 1.21±0.04          | 0.83±0.04<br>p<0.001 | АН         | 2.13±0.04          | 1.65±0.04<br>p<0.001 |
| АДФ        | 0.60±0.02          | 0.45±0.02<br>p<0.001 | АТФ:АДФ    | 2.17±0.13          | 2.06±0.19<br>p=0.5   |
| АМФ        | 0.32±0.01          | 0.35±0.02<br>p=0.5   | ЭЗ         | 0.69±0.01          | 0.64±0.02<br>p>0.05  |

Примечание: АН—азенинуклеотиды, ЭЗ—энергетический заряд, n—число опытов.

мен эритроцитов, по сравнению с контрольными. Так, концентрация АТФ и АДФ в эритроцитах снижается на 27,3 и 25% соответственно, в то время как концентрация АМФ возрастает незначительно. Вследствие падения концентраций АТФ и АДФ в эритроцитах крыс, получавших цереброзиды, уменьшается фонд аденинуклеотидов (АН), на 22,5%. Однако величина молярного соотношения АТФ/АДФ—показатель энергетического уровня адениловой системы клетки—из-за пропорционального уменьшения концентраций АТФ и АДФ почти не изменяется. Не претерпевает особых изменений и коэффициент Аткинсона (ЭЗ), величина которого, как известно, определяет ход многих метаболических процессов в клетках [18]. Отсутствие выраженных изменений в энергетическом заряде, возможно, свидетельствует о незначительной роли аденилатдезаминазы в изменении содержания АМФ в эритроцитах в условиях длительного введения цереброзидов [11].

Не исключается, что в этих условиях может иметь место активация 5-нуклеотидазы, под действием которой АМФ, дефосфорилируясь, превращается в аденозин, вследствие чего не происходит его адекватного увеличения в эритроцитах при расщеплении АДФ.

Следует отметить, что ранее нами было показано подавление энергетического обмена в клетках печени при длительном введении цереброзидов, что объясняется их способностью как *in vivo*, так и *in vitro* воздействовать на функциональное состояние дыхательной цепи митохондрий путем выраженного подавления окисления сукцината [7, 9].

Как известно, в безъядерных эритроцитах многоконтинирующих превращение глюкозы под влиянием сложной системы ферментов и кофакторов является основным источником энергии, используемой для поддержания многообразных функций. Следовательно, интенсивность метаболизма в эритроците, в частности образования макроэргов, зависит от содержания глюкозы в плазме [2]. В связи с этим с целью выяснения причины снижения концентрации АТФ в эритроцитах крыс, получавших цереброзиды, определяли уровень глюкозы в крови. Полученные результаты свидетельствуют о снижении ее уровня в крови на 18,7%. Так, если у животных контрольной группы он составлял  $72,84 \pm 1,5$  мг%, то у животных опытной—снижался до  $59,22 \pm 1,1$  мг% ( $P < 0,01$ ). При этом обращает на себя внимание отсутствие прямой количественной зависимости между степенью падения концентрации АТФ в эритроцитах (на 27,3%) и снижением уровня глюкозы в крови (на 18,7%). Указанное несоответствие дает основание предположить, что при введении цереброзидов кроме снижения уровня глюкозы в крови действуют и другие факторы, влияющие на синтез АТФ в эритроцитах. В связи с выявлением у цереброзидов гипогликемического эффекта уместно отметить, что аналогичное свойство было обнаружено и у ганглиозидов, выделенных из мозговой ткани при их интравенном введении крысам с экспериментальным диабетом [4].

Для выяснения причин столь выраженного снижения концентрации глюкозы в крови мы сочли целесообразным определить содержание гликогена в тканях, в частности в печени, гликоген которой, как известно, участвует в поддержании стационарного уровня глюкозы в крови.



Это тем более обоснованно, что снижение фонда АП в тканях не может не отразиться на биосинтетических процессах, протекающих с утилизацией энергии макроэргов. Учитывая это обстоятельство, мы имели основание ожидать, что в условиях сниженного фонда АН должно иметь место уменьшение количества гликогена в тканях и, в первую очередь, в печени. Однако результаты проведенных исследований позволили выявить диаметрально противоположный эффект—выраженное накопление гликогена, причем не только в печени, но и миокарде (табл. 2). Так, уровень гликогена в печени оказался повышенным почти на 100%, а в сердечной мышце—на 29,31%.

Таблица 2. Влияние длительного введения цереброзидов на содержание гликогена в печени и миокарде, мг% глюкозы/г влажной ткани ( $M \pm m$ )

| Группы           | Печень                       | Сердечная мышца            |
|------------------|------------------------------|----------------------------|
| Контрольная (20) | 3295.25±139.75               | 305.72±9.84                |
| Опытная (20)     | 6612.4±188.88<br>$p < 0.001$ | 395.32±23.04<br>$p < 0.05$ |

( )—число исследований.

Касаясь возможных механизмов реализации выявленных сдвигов, на основании полученных данных можно отметить одну из причин повышенного содержания гликогена в тканях в условиях дефицита АТФ—превалирование подавления гликогенолитических процессов над гликогенсинтетическими. В то же время накопление гликогена в печени может быть одним из факторов снижения концентрации глюкозы в крови животных, получавших цереброзиды. Однако в силу ограниченности запасов гликогена в печени его роль в поддержании уровня глюкозы в крови в условиях нормального функционирования печени сравнительно мала [6].

Несомненно, однако, что в снижении уровня глюкозы в крови в условиях длительного введения цереброзидов играют роль и другие факторы (нарушение всасывания в кишечнике, повышенный захват тканями и др.). В связи с этим необходимо отметить также способность гликоэффинголипидов, в частности ганглиозидов, связывать моносахариды и усиливать окисление глюкозы тканевыми срезами [5, 10].

Другим подтверждением возможного участия гликоэффинголипидов в процессах транспорта моносахаридов через клеточные мембраны, захвата их тканями является выявление прямой связи между уменьшением содержания ганглиозидов в тканях и повышением концентрации глюкозы в крови животных с экспериментальным диабетом.

Таким образом, в экспериментальных условиях длительное введение цереброзидов сопровождается уменьшением количества аденинуклеотидов в эритроцитах, снижением уровня глюкозы в крови при одновременном повышении содержания гликогена в печени и миокарде.

# ЛИТЕРАТУРА

1. Асагiani В. С. В кн.: Биохимическая фотометрия, 45, М., 1957.
2. Атауллахоков В. И., Витвицкий А. М., Жаботинский А. В. и др. Биохимия, 49, 1, 104—110, 1984.
3. Зарубина Н. В., Криворучко Б. И. Укр. биохим. журн., 34, 4, 437—439, 1982.
4. Исаев Э. И., Саатов Т. С. ДАН СССР, 278, 6, 1485—1487, 1984.
5. Исаев Э. И., Саатов Т. С., Турачулов Я. А. ДАН СССР, 264, 5, 1257—1259, 1982.
6. Мак-Мюррей У. Обмен веществ у человека, 189, М., 1980.
7. Мхоян Э. Е., Соцкий О. П., Секоян Э. С. Вопросы биохимии мозга, 9, 227—232, Ереван, 1974.
8. Мхоян Э. Е., Соцкий О. П., Баджигян С. А., Акопов С. Э. Биофизика, 25, 4, 638—642, 1980.
9. Мхоян Э. Е., Соцкий О. П., Габриелян В. О. Укр. биохим. журн., 48, 2, 184—189, 1976.
10. Мхоян Э. Е., Шахбатьян Ш. Я. Тез. докл. II Всесоюз. симп. «Структура, биосинтез и превращение липидов в организме животного и человека», 180, 1, 1975.
11. Пеккель В. А. Успехи совр. биол., 89, 3, 377—394, 1980.
12. Перри С., Атос Р., Брюер В. В кн.: Практическое руководство по жидкостной хроматографии, 171, М., 1974.
13. Соцкий О. П., Акопов С. Э., Саркисова Г. М., Чухаджян Г. А. Укр. биохим. журн., 86, 6, 642—646, 1984.
14. Соцкий О. П., Саркисова Г. М., Чухаджян Г. А. Биолог. ж. Армении, 48, 25—29, 1985.
15. Соцкий О. П., Акопов С. Э., Саркисова Г. М., Чухаджян Г. А. Бюлл. эксп. биол. и мед., 4, 387—388, 1984.
16. Торчилян В. П., Смирнов В. Н., Чазов Е. Н. Вopr. мед. химии, 28, 1, 3—14, 1982.
17. Флауерс Г. М. В кн.: Методы выделения углеводов, 344—348, М., 1975.
18. Atkinson D. E. Biochem. J., 11, 4030—4034, 1968.
19. Carroll K. J. Lipid. Res., 1, 171, 1960.
20. Lipparini R., Broccoli P. L. et al. Min. Med., 60, 3774—3784, 1975.

Поступило 12.11.1986 г

Биолог. ж. Армении, т. 39, № 5, стр. 398—401, 1986

УДК 612.6

## ОСОБЕННОСТИ АММИАКООБРАЗОВАТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ МОЗГА ПТИЦ В РАЗНЫЕ ВОЗРАСТНЫЕ ПЕРИОДЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ УДЛИНЕННОЙ СВЕТОВОЙ ЭКСПОЗИЦИИ

М. Б. НАЗАРЯН, С. Ш. МАРТИРОСЯН, А. А. ПЕТРОСЯН, Г. В. АПРИКЯН

Институт физиологии им. Л. А. Орбели АН Армянской ССР

**Аннотация** — Показано, что содержание свободного аммиака, аммиакообразование и ферментативная активность в больших полушариях головного мозга кур под действием дополнительного освещения находятся на более высоком уровне во всех возрастных группах по сравнению с контрольными.

**Ключевые слова** — Аммиакообразование, ферментативная активность, дополнительное освещение, головной мозг кур.