

Г. Т. АДУНЦ, Р. Р. НЕРСЕСЯН

О НЕКОТОРЫХ СТОРОНАХ ОБМЕНА ГАММА-АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ В КУРИНОМ ЭМБРИОНЕ

Содержание гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) в различных органах (кроме мозга) животных, стоящих на разных ступенях эволюционного развития, весьма незначительно. Однако до настоящего времени не уделяли достаточного внимания изучению количественных сдвигов ГАМК в эмбриональных тканях в течение онтогенеза. В этом отношении представляет интерес изучение динамики образования и трансформирование ГАМК в различных органах куриного эмбриона в процессе развития.

Метод исследования. Опыты проводились на инкубированных яйцах кур породы Белый леггорн и Ереванян. Исследовались желточный мешок, печень и мозг развивающегося куриного зародыша.

Для определения свободных аминокислот эмбриональные ткани собирались по Робертсу и Френкелю [9]. Содержание ГАМК, глутаминовой (ГК) и аспарагиновой кислот (АК) определяли методом одномерной нисходящей хроматографии. Экстракти свободных аминокислот получали после осаждения белков 75% этиловым спиртом. На хроматографическую бумагу Ленинградская № 2 (быстрая) наносили 50—75 мкл экстракта, соответствовавшего 120—200 мг свежей ткани. В основу хроматографического разделения аминокислот была положена модификация метода Боде и Гири, предложенная Зайцевой и Тюленевой [2]. С целью удаления ионов тяжелых металлов бумагу предварительно промывали 8-оксихинолом. В качестве подвижного растворителя для хроматографии использовали верхний слой смеси—бутанол: уксусная кислота : вода (4 : 1 : 5). Растворитель пропускали через полоску бумаги 3—4 раза. Количественное определение содержания аминокислот производили после выделения их в виде медно-нингидринового комплекса, образующегося в результате реакций аминокислот с нингидрином и ионами меди [3]. Оптическую плотность окраски определяли фотоэлектроколориметром (ФЭК-М), на зеленом светофильтре (длина волны 460—520). В каждом опыте на хроматографическую бумагу одновременно наносили соответствующее количество свидетеля испытуемой аминокислоты.

Трансаминаznую активность определяли по методу Робертса и сотр. [11]. Ткани гомогенизировали в дистиллированной воде гомогенизатором Поттера, из расчета 250 мг свежей ткани на 1 мл. Реакционная смесь состояла: 0,4 мл гомогената (100 мг свежей ткани), 0,7 мл боратного

буфера ($\text{pH}=8,2$), 0,1 мл пиридоксальфосфата (150 мкг) и 0,1 мл растворов, содержащих α -кетоглутаровую кислоту (40 мкмоль) и ГАМК (40 мкмоль). Инкубацию проводили в течение 30 мин. при 38° . Активность трансаминазы определяли по сформированной ГК. Контрольные пробы ставили вышеописанным способом, исключая КГК.

Активность декарбоксилазы ГК определяли по Робертсу [11]. Гомогенат получали тем же способом. Реакционная смесь состояла из 1 мл гомогената (250 мг свежей ткани), 0,3 мл фосфатного буфера ($\text{pH}=6,3$), 0,2 мл 0,5 М раствора ГК ($\text{pH}=7,0$) и 0,2 мл пиридоксальфосфата (ПАЛФ 150 мкг). Инкубацию проводили встряхиванием в атмосфере азота в течение часа при температуре 38° .

Результаты исследований и их обсуждение. В желточном мешке куриного эмбриона максимальное количество ГАМК обнаруживается на 10-й день инкубации и составляет 10,4 мг% (табл. 1). Параллельно с развитием зародыша содержание ГАМК в желточном мешке постепенно снижается, составляя 9,1 мг% на 12-й день инкубации, 4,0 мг% на 14-й, а к 18-му дню она не обнаруживается.

Таблица 1
Количество ГАМК в желточном мешке куриного эмбриона, мг %

Дни инкубации									
10	11	12	13	14	15	16	17	18	
10,4 ± 0,11	9,8 ± 0,028	9,11 ± 0,086	7,7 ± 0,43	4,0 ± 0,058	3,05 ± 0,67	2,48 ± 1,7	1,26 ± 0,27	следы	

Интересно отметить, что в печени эмбриона как в зародышевом, так и в предплодном периоде ГАМК не обнаруживается. Она появляется с 16—17 дня инкубации в количестве 3,25; 4,53 мг% (табл. 2). На 19-й день инкубации содержание ГАМК снижается до 1,83 мг%, а на 20-й обнаруживаются только ее следы. В первый день вылупления замечается некоторое повышение количества ГАМК.

Таблица 2
Количество ГАМК в печени куриного эмбриона, мг %

Дни инкубации									
14	15	16	17	18	19	20	21	1	
следы	следы	3,25 ± 0,26	4,53 ± 1,88	2,09 ± 0,59	1,83 ± 0,33	следы	0,38 ± 0,3	0,83 ± 0,043	

В мозге 7-дневного зародыша количество ГАМК составляет 1,9 мг% (табл. 3). Параллельно с развитием эмбриона ее количество постепенно повышается, достигая максимальной величины в конце инкубации. Такой уровень ГАМК сохраняется у однодневных цыплят.

Полученные данные свидетельствуют о том, что содержание ГАМК в различных тканях развивающегося куриного эмбриона не одинаково.

Таблица 3

Количество ГАМК в мозгу куриного эмбриона, мг %

Дни инкубации									
7	8	9	10	11	12	13	14	15	
1,9± 0,15	2,2± 0,26	3,0± 0,26	4,8± 0,61	8,8± 0,35	9,0± 0,06	9,4± 0,95	9,8± 0,02	8,9± 0,17	
Дни инкубации									
16	17	18	19	20	21	1			
8,8± 0,25	13,25± 0,25	15,5± 0,34	10,5± 0,75	10,16± 0,016	14,8± 0,84	14,8± 0,86			

Одновременно из таблиц видно, что в исследуемых тканях ГАМК обнаруживается на разных этапах эмбриогенеза: на 10-й день инкубации, когда ГАМК отсутствует в печени эмбриона, а в мозгу составляет незначительное количество, в желточном мешке она достигает максимальной величины; начиная с 11-го дня инкубации количество ГАМК в желточном мешке постепенно снижается, затем исчезает, а в мозговой ткани, наоборот, резко повышается. Приведенные данные исключают возможность миграции ГАМК из мозговой ткани в желточный мешок, поскольку ее уровень в мозгу в некоторые сроки инкубации значительно ниже, чем в желточном мешке.

ГАМК распадается в основном путем переаминирования с α -КГК, осуществляющейся трансаминазой ГАМК. Образующийся при этом се-миальдегид янтарной кислоты окисляется в янтарную [4], которая включается в цикл трикарбоновых кислот.

Имея определенное представление о распределении ГАМК в тканях куриного эмбриона, интересно было бы проследить за трансаминированием ГАМК—КГК в процессе развития.

В печени куриного эмбриона переаминирование ГАМК—КГК определяли с 14-го дня инкубации, когда наблюдалась самая высокая активность фермента—71 мг% ГК, достигающая максимальных величин у 15-дневного эмбриона—77 мг% ГК (табл. 4). В последующие дни инкубации активность трансаминазы с некоторыми колебаниями снижалась до минимума на 21-й день развития.

Желточный мешок развивающегося куриного эмбриона также обладает ГАМК трансаминазной активностью, которая в этом временном органе зародыша проявляется с 11-го дня инкубации (табл. 5). Максимальная активность фермента в этом случае отмечается на 14-й день развития, после чего постепенно снижается и к моменту вылупления не проявляется.

Была изучена также реакция переаминирования ГАМК с КГК в мозговой ткани развивающегося куриного эмбриона, где трансаминазная

Таблица 4
Активность трансаминазы печени куриного эмбриона
(количество ГК/мг %)

Дни инкубации	Гомогенат	Гомогенат+ГАМК	Гомогенат+ГАМК+КГК	Трансаминазная активность
14	93±8,1	90±4,4	161±6,5	71 (6)
15	64±3,7	58±5,2	135±5,5	77
16	67±2,2	51±1,7	89±3,8	38
17	60±2,2	77±4,6	106±4,3	29
18	76±3,7	80±2,6	125±5,3	45
19	51±3,7	82±9,05	137±8,3	55
20	80±6,0	100±5,2	143±4,6	43
21	90±5,6	127±3,3	145±5,1	18

Таблица 5
Активность трансаминазы желточного мешка куриного эмбриона
(количество ГК/мг %)

Дни инкубации	Гомогенат	Гомогенат+ГАМК	Гомогенат+ГАМК+КГК	Трансаминазная активность
11	45±4,2	45±4,5	64±3,8	19 (6)
12	53±2,8	54±4,3	76±5,1	22
13	57±3,7	58±3,3	86±4,5	28
14	81±5,7	82±5,4	126±5,0	44
15	60±4,5	59±4,3	81±4,5	22
16	44±3,4	51±5,2	74±2,1	23
17	34±4,0	35±3,3	51±3,8	16
18	31±2,8	40±3,7	51±4,7	11
19	23±3,8	30±3,6	39±4,2	9
20	15±2,6	31±3,3	34±5,7	3

активность проявляется на 11-й день инкубации, составляя 11 мг ГК (табл. 6).

На протяжении всей инкубации в мозгу эмбриона трансаминазная активность постепенно возрастает, достигая максимума на 19-й—20-й день инкубации (58—61 мг% ГК); у однодневных цыплят активность фермента снижается до 26 мг% ГК.

Следует отметить, что выявление трансаминазной активности совпадает с бурным развитием зародыша и периодом дифференциации нейронов.

В настоящее время основным путем образования ГАМК считается декарбоксилирование ГК. Эта реакция необратима и осуществляется специфическим пиридоксалевым ферментом—декарбоксилазой ГК. По данным Робертса [10], количество ГАМК, а также активность декарбоксилазы ГК в мозгу зародыша увеличивается в основном с 11-го дня развития, достигая максимума у однодневного цыпленка. Активность этого фермента не была установлена нами в желточном мешке.

В печени куриного эмбриона активность декарбоксилазы ГК выражена слабо и проявляется на 14—15 день инкубации (0,30—0,48 мг% ГАМК). Хотя ГАМК в этом органе в те же дни не обнаруживается. На 16-ый день с появлением ГАМК активность декарбоксилазы ГК проявляется и остается на низком уровне до вылупления цыпленка. У однодневного журнала Армении, XXII, № 5--2.

Таблица 6

Активность трансаминазы головного мозга куриного эмбриона
(количество ГК/мг %)

Дни инкубации	Гомогенат	Гомогенат+ГАМК	Гомогенат+ГАМК+ГК	Трансаминазная активность
11	47±5,3	46±7,3	57±5,0	11 (8)
12	57±6,2	57±4,6	70±3,6	13
13	50±3,8	50±3,7	73±4,5	23
14	96±6,4	63±4,6	100±5,0	37
15	60±6,1	52±5,2	90±4,6	38
16	64±5,0	46±3,6	90±5,0	44
17	74±4,4	59±4,8	103±8,4	49
18	83±6,3	72±4,7	129±8,0	57
19	90±5,0	66±3,8	122±9,8	58
20	91±4,8	81±4,2	142±7,1	61
21	116±7,5	100±5,6	126±6,4	26

дневного цыпленка активность фермента несколько повышается, составляя 0,51 мг% ГАМК. По ходу исследований нами было обнаружено, что превращение ГК в печени куриного зародыша имеет главным образом тенденцию к образованию АК, нежели ГАМК. Например, в контрольных опытах количество АК в печени на 12-й день развития составляет 85 мг%, а при добавлении ГК возрастает до 99 мг%.

Таблица 7

Активность декарбоксилазы глутаминовой кислоты в печени куриного эмбриона, мг %

Дни инкубации	Без добавления	С добавлением ГК и ПАЛФ	
		кол-во ГАМК в гомогенате	прирост ГАМК
14	—		0,3±0,001
15	—		0,48±0,0018
16	2,6±0,16		2,99±0,023 $P < 0,001$ $P > 0,005$
17	3,48±0,23		3,8±0,005 $P > 0,010$ $P < 0,025$
18	1,83±0,024		1,97±0,013 $P = 0,4$
19	1,52±0,065		1,6±0,002 $P > 0,2$ $P < 0,4$
20	—		0,2 ± 0,007
21	0,34±0,014		0,53±0,0025 $P < 0,001$
1	0,64±0,007		1,15±0,015 $P > 0,2$ $P < 0,4$

На 16-й день инкубации количество АК в печени равняется в норме 108 мг%, а при добавлении ГК оно составляет 142 мг%. Такая закономерность наблюдается до конца инкубации. Полученные данные говорят

Таблица 8
Количество АК в печени куриного эмбриона,
мг %

Дни инкубации	Гомогенат	Гомогенат+ГК
12	85± 6,08	99± 6,7
14	103±10,68	142±12,25
16	99± 7,6	202±19,3
18	85± 5,2	156± 6,48
20	80±10,3	148± 5,7
21	72± 6,1	140± 7,6

о том, что при добавлении ГК к гомогенатам печени куриного эмбриона с большой интенсивностью происходит превращение ее в АК.

Ряд авторов [6, 7] отмечает превращение в мозгу млекопитающих ГК главным образом в АК и только 8—10% ее количества, декарбоксилируясь, переходит в ГАМК, что нашло свое подтверждение и в работах Бунятия [1].

Интересно отметить тот факт, что печень развивающегося куриного эмбриона содержит большое количество АК, несколько превалирующее над ГК.

Таблица 9
Количество аспарагиновой и глутаминовой
кислот в печени куриного эмбриона, мг %

Дни инкубации	АК	ГК
14	103±10,6	93±8,1
16	99± 7,6	67±2,2
18	85± 5,2	76±8,7
20	80±10,3	80±6,0
21	72± 6,1	90±5,6

На 14-й день инкубации количество АК составляет 103 мг %, а ГК—93 мг %. Такое соотношение сохраняется до 19-го дня, затем отмечается постепенное повышение уровня ГК, во время вылупления цыпленка количественно превалирующее над АК.

В литературе имеются данные о том, что общее содержание АК в развивающемся яйце в 1,5 раза больше, чем уровень ГК. Этот факт некоторые авторы объясняют тем, что в эмбриогенезе птиц АК играет ту же функциональную роль, что и ГК во взрослом организме, и что в начальном периоде эмбрионального развития АК легко ассимилируется развивающимся зародышем.

Результаты наших исследований показали, что на ранних этапах эмбриогенеза в желточном мешке, печени и мозгу эмбриона образуется ГАМК, обменяемость которой в этих органах протекает с неодинаковой интенсивностью. Это говорит о том, что, по всей вероятности, ГАМК имеет определенное значение в обменных процессах куриного эмбриона и является необходимой аминокислотой для его развития.

Интересно отметить, что среди изученных органов декарбоксилазная

активность в отношении ГК проявляется только в мозговой ткани с 11-го дня развития. По-видимому, путь образования ГАМК из ГК нельзя считать единственным, поскольку при отсутствии декарбоксилазы ГК обнаруживается ГАМК в желточном мешке и печени. Наряду с декарбоксилированием ГК, являющимся основным механизмом образования ГАМК, существуют и другие пути ее синтеза. В литературе имеются данные о том, что ГАМК может образоваться из γ -гуанидиномасляной кислоты и орнитина [5, 8]. В пользу этого предложения говорят также исследования Робертса и сотр. [11], показавших, что декарбоксилазная активность ГК в мозговой ткани развивающегося зародыша проявляется только с 11-го дня инкубации, тогда как ГАМК обнаруживается в этой ткани уже с 4-го дня развития.

Наши исследования показывают, что в мозгу и печени куриного эмбриона ГК в значительной степени переходит в АК. Эти данные коррелируют с исследованиями других авторов, которые показали, что ГК в мозговой ткани взрослых животных преимущественно превращается в АК.

Институт биохимии
АН АрмССР

Поступило 18.V 1968 г.

Գ. Թ. ԱԴՈՒՆ, Բ. Ռ. ՆԵՐՍԵՍՅԱՆ

ԳԱՄԿ-ԱՄԻՆԱԿԱՐԱԳԱԹԹՎԻ ՓՈԽԱՆԱԿՈՒԹՅԱՆ ՄԻ ՔԱՆԻ ԿՈՂՄԵՐԸ ՀԱՎԻ ՍԱՂՄԻ ՀՅՈՒՍՎԱԾՔՆԵՐՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո ւ մ

Գամա-ամինակարագաթթվի (ԳԱԿԹ) քանակը զարգացման տարրեր աստիճանների վրա կանոնած կենդանիների օրգաններում (բացառությամբ ուղեղի) աննշան է:

Սաղմի զարգացման ընթացքում ԳԱԿԹ-ի քանակության փոփոխությունները գեռած լրիվ ուսումնասիրված չեն: Այդ պատճառով հետաքրքիր էր ուսումնասիրել ԳԱԿԹ-ի առաջացման և տրանսամինացման դինամիկան հավի սաղմի զարգացման ընթացքում:

Մեր կողմից ստացված տվյալներից պարզվել է՝

1. Զվի գեղնուցային պարկում ԳԱԿԹ-ի զգալի քանակություն հայտնաբերվել է ձվի ինկուբացիայի 9-րդ օրը: Նրա քանակը սաղմի զարգացման զուգընթաց պակասել է և 17—18-րդ օրը անհետացել:

Հավի սաղմի լարդում ԳԱԿԹ հանդես է գալիս զարգացման 16-րդ օրից, հետագա օրերի ընթացքում նրա քանակը նվազում է, իսկ ձտի գուրս գալու շրջանում այն չի հայտնաբերվում:

Հավի սաղմի ուղեղում ԳԱԿԹ հայտնաբերվել է սաղմի զարգացման 4-րդ օրից: Նրա քանակը սաղմի աճին զուգընթաց շատանում է՝ իր առավելագույն մակարդակին հասնելով 17—18-րդ օրը:

2. Հավի սաղմի գեղնուցային պարկում ինկուբացիայի ամբողջ ժամանակաընթացքում α -գլուտամինաթթվային դեկարբոքսիլազայի ակտիվություն չի

հայտնաբերվել, չնայած այդ հյուսվածքում հայտնաբերվել է զգալի քանակությամբ ԳԱԿԹ:

3. Հավի սաղմի գեղնուցային պարկը ինկուբացիայի 11-րդ օրից ցուցաբերում է տրանսամինազային ակտիվություն ԳԱԿԹ-ի և α-կետովուտարաթթվի միջև, որը 14—15-րդ օրը հասնում է իր մաքսիմումին, որից հետո այն աստիճանաբար ինակտիվանալով անհետանում է:

Սաղմի լյարդում ԳԱԿԹ-ի տրանսամինազային ակտիվությունը հանդես է գալիս զարգացման 14—15-րդ օրը:

Հավի սաղմի ուղեղում ԳԱԿԹ-ն ենթարկվում է տրանսամինացման ինկուբացիայի 11-րդ օրից:

4. Սաղմի լյարդում գլուտամինաթթուն մեծ ինտենսիվությամբ վերափոխվում է ասպարագինաթթվի, քան ԳԱԿԹ-ի:

5. Հավի սաղմի լյարդում մինչև ինկուբացիայի 18-րդ օրը ասպարագինաթթվի քանակը գերազանցում է գլուտամինաթթվի քանակին, մինչդեռ ճոփուրս գալու շրջանում՝ 20—21-րդ օրը, գլուտամինաթթվի քանակը շատանում է, գերազանցելով ասպարագինաթթվի քանակին:

Л И Т Е Р А Т У Р А

- Бунягян Г. Х. Журнал Всесоюз. Хим. Общества им. Д. И. Менделеева, 9, 412, 1964.
- Зайцева Г. И. и Тюленева Н. П. Лабораторное дело, 3, 24, 1958.
- Пасхина Т. С. Методические письма, М., 1958.
- Albers R. W., Salvador R. T. Science, 128, 359, 1958.
- Guggenheim M. Die Biogen Amine, Basel-New York, S. 252, 1951.
- Haslam B. J., Krebs H. A. Biochem. J., 88, 566, 1963.
- Krebs H. A., Bellamy D. Biochem. J., 75, 523, 1960.
- Pisano J. J. Nature, 180, 1125, 1957.
- Roberts E., Frankel S. J. Biol. Chem., 187, 55, 1950.
- Roberts E., Lowe J. P., Guth L., Jelinek B. J. Expl. Zoology, 18, 313, 1958.
- Roberts E., Sisken B., Sano K. J. Biol. Chem., 236, 2, 1961.