

А. И. РАДЗИНСКАЯ, И. С. НИКОЛЬСКАЯ, В. С. ФАУСТОВ

ДЕЙСТВИЕ ОСНОВАНИЙ И НУКЛЕОЗИДОВ НА УРОВЕНЬ АТФ И ДЫХАНИЕ ЗАРОДЫШЕЙ МОРСКОГО ЕЖА

(Представлено академиком Б. Л. Астауровым 8 VIII 1972)

При развитии зародышей насекомых, иглокожих, амфибий и рыб наряду с возрастанием интенсивности дыхания наблюдается уменьшение содержания АТФ (¹⁻⁵). В связи с этим было высказано предположение, что одним из механизмов, регулирующим дыхание зародышей, может быть система адениннуклеотидов и, в частности, АТФ (¹⁻⁵). Связь содержания АТФ и дыхания зародышей можно показать, изменяя содержание АТФ в зародышах. Одним из факторов, кратковременно меняющих содержание АТФ, могут быть предшественники биосинтеза адениловых нуклеотидов. В настоящей работе определяли соотношение дыхания и АТФ в зародышах морского ежа при воздействии аденина, аденозина и предшественников других трифосфатов.

Работу проводили на зародышах морского ежа *Strongylocentrotus drobachiensis* в Мурманском морском биологическом институте (Баренцево море, Дальние Зеленцы). Половые продукты получали от естественно созревших особей. Были использованы зародыши на стадии ранней бластулы, так как в это время у эмбрионов морского ежа еще не происходит заметного изменения уровня дыхания и АТФ (^{1, 6}). Дыхание измеряли в аппарате Варбурга при 6°. В сосуды помещали 3 мл суспензии яиц (10–20 тыс.). Отсчеты производили каждый час. Результаты выражали в микролитрах O₂ в 1 час на 1000 зародышей и в процентах по отношению к контролю. Измерение АТФ проводили люминесцентным методом Стреллера и Мак-Элроя (⁶). Метод фиксации зародышей для определения АТФ описан ранее (⁷). В качестве системы люциферин — люцифераза использовали экстракт светящихся органов *Luciola mingrelica*, приготовленный на 0,1 M трисс-H₂SO₄. Люминесценцию регистрировали на установке, сконструированной в нашей лаборатории (⁸). В качестве предшественников АТФ использовали аденин и аденозин. Для выявления возможного действия других трифосфатов на дыхание исследовали также их предшественники: урацил, тимин, тимидин, цитозин и цитидин, а также аналог аденина — кофеин (хроматографически чистые, фирм «Реанал» и «Кальбиохем»). Растворы веществ готовили на морской воде. Зародыши морского ежа хорошо проницаемы для исследованных веществ (⁹).

По нашим наблюдениям, использованные вещества в применяемых нами концентрациях не нарушают развитие зародышей морского ежа на ранних стадиях. Ранее Крисчат показал (¹⁰), что аденин и аденозин в концентрации 1 ммол/л не влияли на развитие амфибий до стадии нейрулы. По данным Лилли (¹¹), аденозин не нарушает развитие эмбрионов морского ежа на ранних стадиях. Эти данные позволяют полагать, что в наших опытах изменения дыхания и АТФ за 3 часа инкубации не связаны с нарушением развития. На стадии ранней бластулы дыхание зародышей *Strongylocentrotus drobachiensis* в норме составляло 0,90 мл/час на 1000 зародышей (0,52–1,15 в отдельных партиях), АТФ — 1,5 мкг на 1000 зародышей.

Наибольший интерес представляет исследование действия пуринов — предшественников биосинтеза АТФ. При инкубации зародышей морского

ежа на стадии ранней бластулы в 0,5 мМ аденине наблюдали отчетливое изменение уровня АТФ и дыхания (табл. 1, рис. 1). Через 1–2 часа содержание АТФ увеличивалось до 112–115% и через 3 часа возвращается к исходному уровню. Дыхание к 1–2 часу значительно угнетается (74–77% по отношению к контролю), но к 3 часу практически возвращается к норме. При использовании меньших концентраций аденина, 0,05 ммол/л, происходит такое же возрастание содержания АТФ: 112% после часа и 114% после 2 час. инкубации.

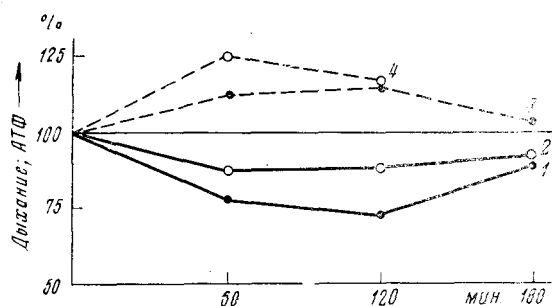


Рис. 1. Влияние аденина и аденозина на уровень дыхания и содержание АТФ в зародышах морского ежа на стадии ранней бластулы. Действие на дыхание аденина (1), аденозина (2); действие на АТФ аденина (3), аденозина (4)

0,5 мМ аденозин оказывал менее выраженное действие на дыхание, угнетая его до 90% по отношению к контролю через 1–2 часа (табл. 1, рис. 1). Однако его влияние на АТФ выражено очень четко — содержание АТФ достигает 125% через час и 116% через 2 часа воздействия.

0,5 мМ инозин вызывает повышение уровня АТФ через 1–2 часа (118% по отношению к контролю).

Кофеин в концентрации 0,5 ммол/л оказывал заметное действие на уровень АТФ, который возрастал до 160% через 1 час и до 147% через 2 часа инкубации. Как известно, кофеин — физиологически активное вещество, широко применяемое в фармакологии; было бы интересно связать наблюдаемый нами эффект с механизмом его действия.

Таблица 1

Влияние пуринов и пиримидинов на дыхание зародышей морского ежа (стадия ранней бластулы)

	Время действия, часы	Дыхание, % от контроля	Число измерений		Время действия, часы	Дыхание, % от контроля	Число измерений
Аденин	1	77,3±6,6	37	Цитидин	1	121,0±9,3	17
	2	73,8±6,0	25		2	112,0±7,0	19
	3	90,3±6,9	30		3	110,0±4,1	19
Аденозин	1	85,8±5,5	40	Цитозин	1	96,0±6,6	10
	2	82,1±6,6	37		2	108,0±3,3	16
	3	90,3±5,3	41		3	98,0±3,3	17
Урацил	1	101,0	19	Тимин	1	105,5±5,0	13
	2	97,3	14		2	103,0±2,1	10
	3	94,1	20		3	98,0±3,3	15
				Тимидин	1	99,0±2,0	15
					2	91,0±5,1	13
					3	83,0±5,4	18

Исследованные нами пиримидиновые предшественники трифосфатов — урацил, тимин, тимидин, цитозин и цитидин — не вызвали достоверных изменений дыхания (табл. 1) и АТФ на стадии бластулы при воздействии растворами 0,05 ммол/л в течение 3 час. Возможно, указанные пиримидиновые предшественники подвергаются в зародышах морского ежа воздействию ферментативных систем, разрушающих их до включения в соответствующие трифосфаты. Не исключена, однако, и другая возможность: предшественники включаются и могут кратковременно сдвигать уровень соот-

ветствующих трифосфатов, которые, однако не играют существенной роли в регуляции дыхания зародышей.

Следовательно, из испытанных веществ только пуриновые предшественники изменяют количество АТФ и уровень дыхания зародышей морского ежа. Подобное изменение дыхания и АТФ при действии аденина и аденозина отметила ранее Данчева (¹²) в ядрах зубной железы. Под влиянием этих веществ количество АТФ возрастало почти вдвое, а дыхание несколько угнеталось после 1 часа инкубации.

Как уже упоминалось, соотношение уровня дыхания и АТФ реципрокно изменяется при зародышевом развитии животных различных классов (¹⁻⁵). Кратковременные изменения этих показателей могут также наблюдаться в отдельные моменты развития. Так, например, процесс оплодотворения у морского ежа сопровождается возрастанием дыхания, АТФ при этом снижается на 17% (^{13, 14}). Интересно, что при оплодотворении у костистых рыб ни уровень дыхания, ни количество АТФ не изменяются (^{6, 13}).

Таким образом, показано, что изменение уровня дыхания и содержания АТФ во время развития зародышей, при оплодотворении и при действии предшественников адениловых нуклеотидов носят реципрокный характер. Это позволяет полагать, что система адениловых нуклеотидов участвует в регуляции дыхания зародышей.

Наряду с этим не исключено, что в механизме регуляции дыхания зародышей могут иметь значение и другие факторы (морфологическая и биохимическая дифференцировка митохондрий, изменение их количества, активность АТФаз и т. д.). Нужно также отметить, что существует зависимость между уровнем адениловых нуклеотидов, дыханием и биосинтезом нуклеиновых кислот в зародышах. В частности, показано, что факторы, влияющие на биосинтез нуклеиновых кислот (облучение, ингибиторы синтеза), приводят к повышению уровня АТФ и угнетению дыхания в зародышах быка (¹⁵) и морского ежа (^{7, 16}).

Институт биологии развития
Академии наук СССР
Москва

Поступило
20 VI 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. С. Фаустов, А. И. Зотин и др., Журн. эволюцион. биохимии и физиологии, 4, № 3, 224 (1968). ² A. I. Zotin, V. S. Faustov et al., J. Embryol. Exp. Morphol., 181, 333 (1967). ³ Л. И. Радзинская, И. С. Никольская, Онтогенез, 3, № 6 (1972). ⁴ T. Hultin, Exp. Cell Res., 12, 413 (1957). ⁵ S. Tagushi, Ann. Zool. Japon., 35, № 2, 51 (1962). ⁶ B. L. Strehler, W. D. McElroy, Methods in Enzymol., 3, 871 (1957). ⁷ А. И. Зотин, Л. С. Мильман, В. С. Фаустов, Журн. эволюцион. биохим. и физиол., 3, № 1, 76 (1967). ⁸ Л. С. Мильман, Ю. Г. Даниюков, Цитология, 7, 731 (1965). ⁹ M. Nemer, J. Biol. Chem., 237, № 1, 143 (1962). ¹⁰ G. Kriszat, Exp. Cell Res., 3, 584 (1952). ¹¹ R. Ballier, Exp. Cell Res., 29, № 1, 119 (1963). ¹² K. Dancheva, Докл. Болгарск. АН, 18, № 5, 469 (1965). ¹³ Л. Ротшильд, Оплодотворение, ИЛ, 1958. ¹⁴ В. А. Horwitz, Exp. Cell Res., 38, 620 (1965). ¹⁵ И. С. Никольская, В. А. Грудницкий, ДАН, 194, № 2, 478 (1970). ¹⁶ G. Giudice, V. Mutolo, G. Donatu, Wilhelm Roux, Arch., 161, № 2, 118 (1968).