

HELGI ÄKKE

## KÜULIKU ERÜTROTSÜÜTIDE ADENIINNUKLEOTIIDIDE EKSTRAHEERIMISMEETODITE VÕRDLUS

Keskse rolli avastamine, mis adeniinnukleotiidid ATP\*, ADP ja AMP etendavad raku bioenergeetilises ainevahetuses, on põhjustanud suure huvi nende ühendite ja funktsionaalse biokeemia vastu. ATP on ühelt poolt kõigi eluprotsesside ainsaks universaalseks energiadoonoriks, kuid samal ajal ka vaheühendiks, millesse akumulieritakse orgaaniliste ühendite ainevahetusest ammutatud keemiline energia.

Erütrotsüütide adeniinnukleotiide on alles vähe uuritud, mistõttu teadaolevad andmed on küllaltki vastuolulised. Imetaja erütrotsüüt kui hapniku transpordiks diferentseerunud rakk on suhteliselt lihtsa ehitusega: tal puuduvad tuum, mitokondrid, mikrosoomid, endoplasmaatiline retiikulum ja ATP-süsteemi regenereeriv hingamissüsteem (oksüdatiivne fosforileerimine). ATP resüntees toimub neis ainult glükolüüsi ja pentoosfosfaatsükli ainevahetuse kaudu. Sellega seoses on nendes rakkudes täheldatud vastastikust sõltuvust glükolüüsi intensiivsuse, ATP taastootmise ja kontsentratsiooni vahel (Yunis, Yasmineh, 1969). Erütrotsüüt vajab ATP-d oma funktsiooni täitmiseks, s. o. glükolüüsiks, kationide transpordiks, raku iseloomuliku vormi hoidmiseks ja koos 2,3-DPG-ga hemoglobiini hingamisfunktsiooni tugevdamiseks (Brewer, 1969; jt.).

Erütrotsüütides sisalduva ATP hulk on geneetiliselt determineeritud (Brewer, 1969). Suured erinevused tema sisalduses ilmnevad geneetiliste anomaaliatega korral (Rapoport, 1968). ATP individuaalse taseme nihkeid on täheldatud ka seoses endokriinorganite patoloogiaga (Scheibe, 1964), kehalise tööga (Кемень, Антал, 1966) ning siis, kui organism allutata teistele ekstreemalset laadi mõjutustele.

Kuna nukleosiidfosfaadid on keemiliselt väga sarnased ja labiilsed, tuldi nende biokeemias kasutatavate määramismeetodite väljatöötamisega toime alles viimase 20 aasta jooksul. Edu saavutati alles siis, kui nende analüüsamiseks hakati kasutama paberkromatograafiat (Hanes, Isherwood, 1949), ionivahetuskromatograafiat (Cohn, 1950) ja nukleotiidide võimet neelata kindla lainepikkusega UV-d (Holiday, Johnson, 1949).

ENSV TA Eksperimentaalbioloogia Instituudis alustati erütrotsüütide sellesuunalist uurimist kõigepealt meetodilistest küsimustest. On ilmne, et adeniinnukleotiidide labiilsusest tingituna põhjustavad erinevad ekstraheerimisviisid suuri meetoodilisi vigu. Käesolevas töös tehti kindlaks eri-

\* ATP — adenosiin-5-trifosforhappe; ADP — adenosiin-5-difosforhappe; AMP — adenosiin-5-monofosforhappe; GTP — guanosiin-5-trifosforhappe; GDP — guanosiin-5-difosforhappe; 2,3-DPG — 2,3-difosfoglütseriinhappe; EDTA — etüleendiamiintetraatsetaat; TKA — triklooräädikhappe; UV — ultravioletne valgus.



nevuscd, mis vabade nukleosiidfosfaatide kontsentratsioonides esinevad olenevalt sellest, kas küüliku erütrotsüütide ekstraheerimisel kasutati TKÄ-d, etanooli või vett. Saadud andmed olid vajalikud selleks, et välja selgitada põhikatsete jaoks sobivaima adeniinnukleotiidide erütrotsüütidest ekstraheerimise meetodit.

### Materjal ja meetodika

Katseloomadeks olid valge hiiu tõugu samasoolised 18-kuised 3—4-kg-sed küülikud.

Nukleotiidide standardlahused valmistati järgmistest kromatograafiliselt puhastest reaktiividest («Reanal», Ungari): AMP — M = 347,24; ADP — M = 547,21; ATP — M = 623,23; GTP — M = 661,18.

Verd võeti küüliku kõrvaveenist jahutatud nõusse, kasutades antikoagulandina hepariini. Nukleosiidfosfaatide hüdrolüüsi piiramiseks toimusid kõik järgnevad protseduurid 4 °C juures. Plasma ja leukotsüüdid eraldati tsentrifuugimise teel. Seejärel pesti erütrotsüüte kolm korda glükoosi (0,1%) sisaldava külma füsioloogilise lahusega. Saadud erütrotsüütide massist ekstraheeriti nukleotiidid kolmel erineval viisil: 1) jahutatud TKÄ-ga ja 2) etanooliga ja 3) veega kuumutades. Kõiki neid võtteid on nukleosiidfosfaatide eraldamiseks kudedest kasutatud varemgi (Pranker, Altman, 1954; Bartlett, 1959; Smith-Kielland, 1964; Brewer, 1969; jt.).

**Ekstraheerimine TKÄ-ga.** 3 mahuosale 10 või 5%-le jääkülmale TKÄ-le lisati tilkhaaval 0,5—2,0 ml erütrotsüüte, segati 5 minutit ning tsentrifuugiti 10 minutit. Ekstrakt eemaldati ja valgu sadet pesti veel kaks korda vastavalt 5 või 2,5%-se TKÄ-ga, mida võeti 1,5-kordses mahus. Valgu korduv pesemine oli tingitud sellest, et esimese ekstrakti nukleotiidide saagis on 65—70, koos teisega aga 95 ning pärast kolmandat pesemist koguni 98% (Bartlett, 1959). Kõik kolm fraktsiooni ühendati ning TKÄ eemaldati, ekstraheerides eetriga neli korda. Lõpuks neutraliseeriti lahus 1—2 tilga 0,5N KOH-ga.

**Ekstraheerimine etanooliga.** 3 mahuosale külmale 50 või 60%-le etanoolile lisati 0,5—2,0 ml erütrotsüüte. Pärast vastavalt 5- või 3-minutist keetmist ja pidevalt segamist jahutati katseklaas. Ekstrakt eraldati 10-minutise tsentrifuugimise teel ning denatureeritud valgu sadet pesti kaks korda 1,5 mahuosa alkoholiga. Saadud ekstraktid ühendati ja filtreeriti.

**Ekstraheerimine veega** toimus analoogiliselt.

Etanooli ja veega ekstraheerimise eeliseks TKÄ-ga võrreldes pidasime seda, et see võimaldas vältida tugeva happelise keskkonna puhul tekkivat nukleosiidfosfaatide hüdrolüüsi, nagu oli selgunud Smith-Kiellandi (1964) poolt sooritatud nukleotiidide kahe ekstraheerimisviisi (50%-se etanooliga 100° ja 0,6N perkloorhappega 0° juures) võrdlusest. Etanooli pole seni erütrotsüütidest nukleotiidide ekstraheerimiseks kasutatud.

Enne paberchromatograafilist eraldamist kontsentreeriti ekstraktid, aurutades nad 3—5 tunni jooksul vaakuumis toatemperatuuril kuivaks. Kuivjääke säilitati 4° juures. Kromatogrammide kandmiseks lahustati nad ekstraktide algsest hulgast 5—10 korda väiksemas veekoguses.

**Paberchromatograafia.** Kuigi paberchromatograafia võimaldab eraldada struktuurilt lähedasi segu komponente, on nukleosiidfosfaatidele kui keemiliselt väga sarnastele ühenditele sobiva solventi leidmine küllaltki raske. Kõige paremad tulemused saadi langeval voolutamisel Hanesi ja Isherwoodi (1949) poolt soovitatud aluselise lahustiga *n*-propanool — NH<sub>4</sub>OH(25%) — H<sub>2</sub>O vahekorras 60:30:10. Kromatografeeritavate segude paremaks eraldamiseks kasutati korduvat kromatografeerimist (4×24 t.) toatemperatuuril. Kirjanduse andmetel (Венкстерн, Баев, 1957) ei põhjusta pikaajalised (2×48 t.) selle solventiga voolutamised nukleotiidide olulist hüdrolüüsi.

Kromatografeerimispaberina kasutati marki «Schleicher & Schüll» nr. 2043b, millest lõigati 25×40 cm suurused lehed, nagu seda soovivad Zaitseva ja Afanasjeva (Зайцева, Афанасьева, 1957). Metallijälgede kõrvaldamiseks pesti kromatografeerimispaberit 0,5%-se EDTA lahusega (Eggleston, Hems, 1952; Венкстерн, Баев, 1957).



Uuritav lahuse kanti kalibreeritud mikropipeti (0,0052 ml) abil paberile 1 cm pikkuse joonena. Ühte punkti kantud ekstrakti hulk oli 0,01—0,07 ml, kusjuures parim nukleotiidide eraldumine saadi 0,02—0,04 ml-se koguse korral. Stardijoonele lisati ekstraktis leiduvate metallioonide sidumiseks 0,001—0,002 ml 0,1M EDTA lahust. Võrdluseks uuritavate ühenditega paigutati igale kromatogrammile ka nukleotiidide standardlahuseid.

Kõiki kromatogramme analüüsiiti Brumbergi ultrahemiskoobil ning tulemuste täpsustamiseks (Боброва, Степаненко, 1962) fotografeeriti UV-s kontaktmeetodil (Markham, Smith, 1949), kasutades bakteritsiidset lampi БУВ-30 ja kontaktfotopaberit.

UV-s fikseeritud laigud lõigati kromatogrammist välja ja pärast peenestamist elueeriti kahekaupa 5 ml 0,01N HCl-ga 37° juures 2 tunni kestel. Selgitati, et pikemaajasel elueerimisel toatemperatuuril ei ole eeliseid, võrreldes 2-tunnise elueerimisega 37° juures. Paberikiududest vabastamiseks tsentrifuugiti eluaate 15—20 minutit.

Kromatogrammidel eraldunud nukleotiidide identifitseerimine toimus puhastest ühenditest saadud võrdluskromatogrammide järgi, lähtudes vastavate eluaatide neeldumisspektrite kujust ja maksimumist. Samal eesmärgil arvutati eluaatide optiliste tiheduste suhted lainepikkustel  $E_{250}/E_{260}$ ,  $E_{280}/E_{260}$  ja  $E_{290}/E_{260}$  (Боброва, Степаненко, 1962; jt.).

**Nukleotiidide kvantitatiivne määramine eluaatides.** Kõikide lahuste optilised tihedused mõõdeti vastava lainepikkuse juures spektrofotomeetril СФ-4А 10-mm-se läbimõõduga kvartsküvetites.

Nukleotiididesisaldus eluaatides arvutati optiliste tiheduste vahe järgi UV maksimaalse neeldumise (260 nm) ja 290 nm juures, kasutades kirjanduses esitatud molaarse ekstinktsiooni koefitsiente (Венкстern, Баев, 1957; Barlett, 1959; Боброва, Степаненко, 1962).

Puriinaluste kontsentratsioon määrati pärast 60-minutist hüdrolyüüsi 1N HCl-ga 100° juures Vischeri-Chargaffi (1948) diferentsiaalse ekstinktsiooni meetodil.

Riboosisisaldus tehti kindlaks Zaitseva ja Afanasjeva järgi (Зайцева, Афанасьева, 1957).

Üldfosfor määrati eluaatides Venksterni ja Bajevi (Венкстern, Баев, 1957) poolt modifitseeritud Lowry' meetodil.

Anorgaanilise fosfori sisaldus erütrotsüütide algeekstraktides tehti kindlaks Skulatšovi (Скулачев, 1962) poolt modifitseeritud Lowry' ja Lopezi meetodil.

Kõigi analüüside puhul tehti 2—3 paralleelmääramist.

## Tulemused ja arutelu

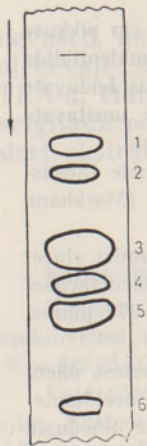
Kolmel erineval ekstraheerimismeetodil (50%-se etanooliga, 10%-se ТКÄ-ga ja veega) küüliku erütrotsüütide nukleotiidide kohta saadud andmed on esitatud tabelis 1. Arvulised suurused on esitatud nukleotiidide, adeniini ja riboosi keskmiste väärtustena. Et kasutatud solvendist tingituna paikneb anorgaaniline fosfaat ADP ja AMP vahel neid osaliselt kattes (Eggleston, Hems, 1952; Wood, 1961; Венкстern, Баев, 1957) ja et küüliku erütrotsüütides hulgaliselt leiduv 2,3-DPG ühtib guanosiinfosfaatide asukohaga kromatogrammil (Wood, 1961), siis oli nukleotiidide fosforit võimalik korrektselt määrata ainult ATP eluaatides.

Erütrotsüütide ekstraktid erinesid üksteisest ka välimuselt: happega saadud olid alati värvitud ja selged, alkohol- ja vesiekstraktid aga kollaka värvusega. Suuri erinevusi esines ka nende anorgaanilise fosfori sisalduses: alkoholekstraktides oli seda 2 korda, vesiekstraktides isegi 10 korda rohkem kui ТКÄ-ga saadud lahustes. See viitab deproteineerimise puudulikkusele kahel viimasel juhul.

Pärast ekstrakti komponendid eraldamist ja kromatogrammi fotografeerimist UV-s paiknesid nukleotiidid joonisel näidatud järjestuses.

Ekstraheerimisviisist sõltuvalt ei esinenud kromatogrammil olevate nukleotiidide paigutuses olulisi erinevusi, välja arvatud nõrga lisalaigu





Küüliku erütrotsüütides sisalduvate nukleotiidide asetus kromatogrammil. 1 — GTP, 2 — GDP, 3 — ATP, 4 — identifitseerimata fosforiühend, 5 — ADP, 6 — AMP.

olemasolu solvendi frondi lähedal TKÄ-ekstrakti puhul. Tõenäoliselt kuulub see laik happelise hüdroolüüsi tulemusena tekkinud adenosiinile (Венкстern, Баев, 1957). Peale tuntud nukleotiidide laike esines erütrotsüütides kõigil ekstraheermisviisidel saadud ekstraktide kromatogrammidel ATP ja ADP vahel küllaltki tugev UV-d neelava fosforiühendi laik, mida ei läinud korda identifitseerida. Fluorestsentspildi järgi on seega kõik kolm ekstraheerimismeetodit üksteisega võrdväärsed.

Kromatogrammide kvantitatiivse analüüsi andmeil leidub ekstraktides kõige enam ATP-d, vähem ADP-d ja minimaalselt AMP-d (tab. 1). Ühe ja sama nukleotiidi osas täheldati aga ekstraheerimisviisist sõltuvalt olulisi erinevusi. ATP-sisaldus vähenes järjekorras etanool > TKÄ > vesi, ADP ja AMP kontsentratsioonid aga järjestusid vastassuunaliselt. Seetõttu saadi iga ekstraheerimisvõttega erinevad adeniinnukleotiidide suhted, mis tulenesid ATP hüdroolüüsi erinevatest astmetest ekstraheerimise kestel. Kriteeriumiks adeniinnukleotiidide määramismeetodite hindamisel peetakse ATP ja ADP koguste suhet, mis kirjanduse andmetel (Pranker, Altman, 1954; Bartlett, 1970) on küüliku erütrotsüütide puhul 2—8. Selle suhte järgi otsustades andis kõige usutavama pildi 50%-se etanooliga ekstraheerimine, mis keskmiseks väärtuseks annab 3. TKÄ ja veega ekstraheerides oli keskmine väärtus vastavalt 2,56 ja 1,53. Samal ajal püsis adenosüüfosfaatide summaarne näitaja ligikaudu samal tasemel, mis viitab ATP-sisalduse vähenemisele hüdroolüüsi tagajärjel.

Alkoholimeetodi eeliseid happelise ees on selgitanud Smith-Kielland (1964). Sellele vaatamata esineb ka alkoholiga ekstraheerimisel ilmselt küllalt suur ATP kadu, millega andmete hindamisel tuleb arvestada.

Et kindlaks teha ATP-sisalduse muutuste tõelist suurust olenevalt ekstraheerimistingimustest, koostati nukleotiididest vastava koosseisuga segu ja ekstraheeriti seda käesolevas katses kasutatud kolmel viisil, varieerides lisaks etanooli kontsentratsiooni ja ekstraheerimisaega ning TKÄ kontsentratsiooni. Samuti selgitati ka nukleosiidfosfaatide kadude suurust nende paberchromatograafilisel eraldamisel Hanesi-Isherwoodi voolutamislahuse kasutamise puhul.

Ilmnes, et adeniinnukleotiidide kogusaagis pärast pikaajalist ( $4 \times 24$  t.) toatemperatuuril voolutamist oli mõlema solvendi puhul 92—93% algkogusest. Lähtudes eluaatide näitudest 260 nm juures ning riboosisisaldusest, saadi *n*-propanooli kasutamisel tagasi 100,47, *i*-propanooli puhul aga 99,29% paberile kantud adenosüüfosfaatide kogusest (tab. 2). Üksikute nukleotiidide, eriti ATP ja ADP suhtes ei vältinud kumbki solvent 13—18%-list hüdroolüüsi, mida oli täheldanud ka Ivanova oma kaastöötajatega (Иванова jt., 1962). *n*-propanooli asendamine solvendis *i*-propanooliga viis GTP hüdroolüüsi tunduvalt vähenemisele (tab. 3). Adeniinnukleotiidide suhtes oli mõlema solvendi toime ühesugune.

Venksterni ja Bajevi (Венкстern, Баев, 1957) järgi on Hanesi-Isherwoodi solvendiga GTP ja GDP lahutamine kromatogrammidel raskendatud. Käesolevas töös oli nende eraldumine enamasti rahuldav. Kuna aga täheldati voolutamislahuse segavat mõju nende vahekorrale, siis piiruti ainult summaarse näitajaga.



Tabel 1

Kolmel erineval ekstraherimismeetodil määratud küüliku erütrotsüütide nukleotiidid ( $10^3 \cdot \mu\text{mooli/ml}$ )  
(a — algandmed; b — korrigeeritud väärtused)

Küüliku nr.	AMP		ADP		ATP		Adeninnukleotiidide summa		ATP/ADP		GTP + GDP	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
50%-se etanoooliga												
1	164 ± 13	132	251 ± 17	220	929 ± 26	1232	1344	1584	3,70	5,60	176 ± 10	204
2	154 ± 8	124	226 ± 9	198	843 ± 2	1095	1223	1417	3,73	5,53	216 ± 23	251
3	119 ± 10	96	174 ± 14	153	684 ± 7	888	977	1137	3,93	5,80	107 ± 17	124
4	173 ± 4	159	249 ± 26	218	600 ± 9	779	1022	1136	2,47	3,57	177 ± 15	205
5	256 ± 36	206	478 ± 12	419	673 ± 4	874	1407	1499	1,61	2,09	209 ± 20	243
6	171 ± 9	138	363 ± 10	318	984 ± 39	1278	1518	1734	2,71	4,02	197 ± 22	229
Keskmine	173 ± 19	139	290 ± 38	254	787 ± 60	1024	1257 ± 65	1463	3,06 ± 0,35	4,03	183 ± 16	212
10%-se T K A-ga												
1	204 ± 7	138	257 ± 23	200	865 ± 7	1286	1326	1624	3,37	6,43	131 ± 20	170
2	179 ± 2	121	219 ± 12	171	733 ± 3	1089	1131	1381	3,35	6,37	166 ± 18	216
3	174 ± 5	118	258 ± 7	201	642 ± 13	954	1074	1273	2,49	4,75	163 ± 23	212
4	182 ± 9	123	310 ± 29	242	531 ± 53	789	1024	1154	1,71	3,26	151 ± 17	196
6	202 ± 8	137	460 ± 14	333	861 ± 11	1285	1523	1765	1,87	3,86	184 ± 19	239
Keskmine	188 ± 6	127	301 ± 60	229	726 ± 64	1075	1216 ± 90	1499	2,56 ± 0,36	4,69	164 ± 9	213
Destilleeritud veega												
1	238 ± 2	151	311 ± 6	248	745 ± 34	907	1294	1306	2,32	3,66	172 ± 4	215
2	224 ± 5	142	347 ± 10	277	615 ± 9	749	1186	1168	1,77	2,70	177 ± 25	221
3	233 ± 5	148	419 ± 6	335	516 ± 26	628	1168	1111	1,23	1,87	121 ± 4	151
5	361 ± 12	229	553 ± 10	442	600 ± 9	731	1514	1402	1,08	1,65	202 ± 49	252
6	253 ± 8	160	571 ± 10	460	703 ± 28	856	1527	1500	1,23	1,86	197 ± 21	246
Keskmine	262 ± 28	166	440 ± 59	352	636 ± 47	774	1338 ± 105	1375	1,53 ± 0,22	2,20	174 ± 89	217



Tabel 2

## Solvendi mõju adeniinnukleotiidide hüdroolüüsile kromatografeerimisel

	Paberile kantud nukleotiidide kogus, $\mu\text{mooli} \cdot 10^3$	<i>n</i> -propanool—NH <sub>4</sub> OH—H <sub>2</sub> O (60:30:10)		<i>i</i> -propanool—NH <sub>4</sub> OH—H <sub>2</sub> O (60:30:10)	
		Saagis, $\mu\text{mooli} \cdot 10^3$	Saagis, %	Saagis, $\mu\text{mooli} \cdot 10^3$	Saagis, %
AMP	52,000	62,791 ± 2,620	120,75	58,925 ± 1,758	113,46
ADP	52,000	44,316 ± 0,981	85,22	45,119 ± 0,290	86,77
ATP	104,000	84,719 ± 4,127	81,46	90,407 ± 4,113	86,93
Adeniin	—	17,153 ± 3,208	—	11,914 ± 3,236	—
K o k k u	208,000	208,979	100,47	206,365	99,29

Tabel 3

## Solvendi mõju GTP hüdroolüüsile kromatografeerimisel

(GTP standardlahuse kontsentratsioon 0,9  $\mu\text{mooli/ml}$ . Tulemused on antud  $\mu\text{moolides}$  1 ml alglahuse kohta)

<i>n</i> -propanool—NH <sub>4</sub> OH—H <sub>2</sub> O (60:30:10)				<i>i</i> -propanool—NH <sub>4</sub> OH—H <sub>2</sub> O (60:30:10)			
GDP	GTP	Summa	Saagis, %	GDP	GTP	Summa	Saagis, %
50%-se etanooliga, 5 min							
0,436	0,088	0,524	58,22	0,257	0,518	0,775	86,11
60%-se etanooliga, 3 min							
0,446	0,060	0,506	56,22	0,254	0,451	0,705	78,33
60%-se etanooliga, 5 min							
0,341	0,068	0,409	45,44	0,182	0,443	0,625	69,44
5%-se TKÄ-ga							
0,243	0,368	0,611	67,90	0,332	0,458	0,790	87,78
10%-se TÄK-ga							
0,325	0,073	0,398	44,22	0,237	0,455	0,692	76,89
Destilleeritud veega							
0,468	0,147	0,615	68,33	0,196	0,525	0,721	80,11

Tabelist 4 nähtub, et ATP minimaalseima kao (2,07%) tagas antud tingimustes veega ekstraheerimine, kusjuures saagis pärast kromatograafilist eraldamist oli 82%. Järgnes 50%-ne etanool vastavalt 7,20 ja 77%, 5%-ne TKÄ 11,03 ja 73%, 60%-ne etanool, ekstraheerimise kestus 3 min., 15,74 ja 68%, 10%-ne TKÄ 16,91 ja 67% ning kõige lõpuks 60%-ne etanool, ekstraheerimise kestus 5 min., 23,70 ja 60,5%.

Esitatud andmetest selgub, et puhaste nukleotiidide korral ei põhjusta vesi olulist ATP hüdroolüüsi. See on täiesti vastupidine erütrotsüütide ekstraheerimise tulemustele. Põhjuseks on siin ilmselt fosfohüdrolaaside vabanemine erütrotsüütidest hemolüüsi käigus ja nende termilise inaktiveerumise liiga aeglane kulg. Etanoolmeetodil aga inhibeeritakse fermente alates hemolüüsist ja lõpetades kuumutamise, mis tingibki 50%-se alkoholi efektiivsuse nii standardlahuste segu kui ka erütrotsüütide puhul.



Tabel 4

## Adeniinnukleotiidide standardsegu erinevate ekstraheerimismeetodite võrdlus

(1 ml nukleotiidide alglahust sisaldab 1,0 µmooli AMP-d, 0,7 µmooli ADP-d ja 2,4 µmooli ATP-d. Tulemused on antud µmoolides 1 ml alglahuse kohta.

D — meetodi suhteline viga %-des.)

	AMP	ADP	ATP	Summa	Keskmine
50%-se etanooliga, 5 min					
Saagis	1,157±0,005	0,693±0,004	1,848±0,027	3,698	—
Saagis, %	115,70	99,00	77,0	—	90,20
D	0,984	1,313	3,191	—	1,829
60%-se etanooliga, 3 min					
Saagis	1,031±0,006	0,640±0,005	1,643±0,023	3,299	—
Saagis, %	103,07	91,43	68,46	—	80,46
D	1,443	1,860	3,186	—	2,163
60%-se etanooliga, 5 min					
Saagis	0,995±0,008	0,703±0,007	1,450±0,014	3,148	—
Saagis, %	99,51	100,40	60,50	—	76,78
D	1,873	2,181	2,060	—	2,038
5%-se TK A-ga					
Saagis	1,103±0,010	0,703±0,011	1,756±0,042	3,562	—
Saagis, %	110,30	100,40	73,17	—	86,88
D	2,031	3,338	5,347	—	3,572
10%-se TK A-ga					
Saagis	1,191±0,028	0,793±0,021	1,615±0,037	3,599	—
Saagis, %	119,12	113,30	67,29	—	87,78
D	4,883	6,022	5,143	—	5,349
Destilleeritud veega					
Saagis	1,294±0,013	0,771±0,005	1,971±0,016	4,036	—
Saagis, %	129,37	110,14	82,13	—	98,44
D	2,184	1,515	1,789	—	1,829

Tabel 5

Adeniinnukleotiidid küüliku nr. 6 erütrotsüütides (10<sup>3</sup>·µmooli/ml) erinevate ekstraheerimismeetodite puhul

(a — algandmed; b — korrigeeritud väärtused)

AMP		ADP		ATP		Summa		ATP/AMP		ATP/ADP	
a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
50%-se etanooliga, 5 min											
171±9	138	363±10	318	984±39	1278	1518	1734	5,75	9,26	2,71	4,02
60%-se etanooliga 3 min											
151±7	136	345±16	324	879±15	1284	1375	1744	5,82	9,44	2,55	3,96
5%-se TK A-ga											
188±8	136	377±14	327	971±11	1295	1536	1758	5,16	9,52	2,58	3,96
10%-se TK A-ga											
202±2	137	460±11	333	861±54	1285	1523	1755	4,26	9,38	1,87	3,86



Kõrvutades erineva kestusega ekstraheerimistel saadud tulemusi 50%-se etanooliga ekstraheerimisel saadutega, selgub, et 60%-ne etanool kiirendab küll valkude denatureerumist, kuid samas põhjustab ka olulist nukleotiidide hüdroolüüsi.

50%-le etanoolile lähedase ATP kao — 11,03% — põhjustas 5%-ne TKÄ, kusjuures viimase eeliseks on täielik vabanemine valkudest. 10%-se TKÄ poolt tekitatud ATP kadu oli 16,9%.

Standardlahuste analüüsil esinenud nukleosiidfosfaatide kadude suurus võimaldasid erütrotsüütides leitud nukleotiidide väärtusi vastavaid kaokoeffitsiente kasutades tõelistele lähedasteks korrigeerida. 1 ml erütrotsüütide kohta saadi järgmised tulemused  $\mu\text{moolides}$ : ATP — 1,075 (0,779—1,295), ADP — 0,241 (0,153—0,419), AMP — 0,133 (0,096—0,206) ja GTP + GDP — 0,181 (0,124—0,239). Veega ekstraheerimise korral ei olnud võimalik tulemusi korrigeerida, kuna eespool märgitud feremendid avaldasid segavat toimet. Võrdlev ülevaade algselt saadud ja korrigeeritud adenosinfosfaatide sisalduse kohta sama küüliku erütrotsüütides on esitatud tabelis 5. Näeme, et korrigeerimisel suurenevad ATP ning vähenevad ADP ja AMP väärtused. Selle tulemusena suurenevad ja ühtlustuvad suhted ATP/ADP ja ATP/AMP, mistõttu neid võib pidada ligikaudselt normile vastavaiks.

Suur erinevus üksikute nukleotiidide esinemises erütrotsüütides mõjub tulemuste täpsust nende määramisel ühes ja samas proovis. ATP ja ADP korral on paralleelselt toimunud määramiste tulemuste kokkulangevus hea, kõige suuremad erinevused aga ilmnevad AMP ja GTP puhul, kuna nende nukleotiidide kontsentratsioon eluaatides on madal. Kui aga silmas pidada, et erütrotsüütides esinevate fosforiühendite vahekorra ning sisalduse muutuste uurimisel on põhilise tähtsusega võrreldavad väärtused, siis peaks kasutatud meetodika püstitatud ülesannete lahendamisel andma rahuldavaid tulemusi.

### Kokkuvõte

1. Vabade adeniinnukleotiidide sisalduse määramine tuumata erütrotsüütides nende paberchromatograafilise lahutamise ning järgneva UV-analüüsiga annab tegelikkusega võrreldes mõnevõrra moonutatud näite, mis on tingitud nende ühendite hüdroolüüsist analüüsi käigus. Adenosinfosfaatide ekstraheerimise kolmest kasutatud meetodist annavad kõige paremaid tulemusi ekstraheerimine 50%-se etanooli ja 5%-se triklooräädikhappega, kusjuures viimasel on eelmisega võrreldes eeliseid. Nukleotiidide ekstraheerimine erütrotsüütidest veega tingib ATP väga suure kao.

2. Küüliku erütrotsüütide adenosinfosfaatide analüüsil esinevaid kadusid saab korrigeerida, arvestades kaoprotsenti, mis esineb vastavate standardlahustega äraproovitud meetodi puhul.

3. Erütrotsüütide nukleotiidide paberchromatograafilisel eraldamisel Hanesi-Isherwoodi solvendiga on otstarbekas asendada *n*-propanool *i*-propanooliga, mis tunduvalt pidurdab eriti labiilse GTP hüdroolüüsi.

### KIRJANDUS

- Bartlett G. R., 1959. Human red cell glycolytic intermediates. *J. Biol. Chem.* **234** : 449—458.
- Bartlett G. R., 1970. Patterns of phosphate compounds in red blood cells of man and animals. *Advances in experimental medicine and biology* **6**. Red cell metabolism and function. New York—London : 245—256.
- Brewer G. J., 1969. Adenosine triphosphate. *Biochemical methods in red cell genetics*. New York—London : 202—229.



- Cohn W. E., 1950. The anion-exchange separation of ribonucleotides. *J. Am. Chem. Soc.* **72** : 1471—1478.
- Eggleston L. V., Hems R., 1952. Separation of adenosine phosphates by paper chromatography and the equilibrium constant of the myokinase system. *Biochem. J.* **52** : 156—160.
- Hanes C. S., Isherwood F. A., 1949. Separation of the phosphoric esters on the filter paper chromatogram. *Nature* **164** : 1107—1112.
- Holiday E. R., Johnson E. A., 1949. Location of paper chromatogram spots of purine and pyrimidine derivatives in ultraviolet light. *Nature* **163** : 216—217.
- Markham R., Smith J. D., 1949. Chromatographic studies of nucleic acids. A technique for the identification and estimation of purine and pyrimidine bases, nucleosides and related substances. *Biochem. J.* **45** : 294—298.
- Pranker T. A. J., Altman K. I., 1954. A study of the metabolism of phosphorus in mammalian red cells. *Biochem. J.* **58** : 622—633.
- Rapport S., 1968. *Angewandte Biochemie in der Erforschung der Anämien. Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für experimentelle Medizin 17. Angewandte Biochemie und Histochemie in der Hämatologie — Pathophysiologie der Leber — Moderne Methoden der klinischen Chemie.* Berlin : 15—28.
- Scheibe O., 1964. *Das Adenylsäuresystem nach Eingriffen an der Schilddrüse. Schilddrüsenhormone und Körperperipherie — Regulation der Schilddrüsenfunktion.* Berlin : 171—174.
- Smith-Kielland I., 1964. A comparison between two procedures for extracting the nucleotide pool of *Escherichia coli*. *Acta Chem. Scand.* **18** : 967—972.
- Vischer E., Chargaff E., 1948. The separation and quantitative estimation of purines and pyrimidines in minute amounts. *J. Biol. Chem.* **176** : 703—714.
- Wood T., 1961. A procedure for the analysis of acid-soluble phosphoric compounds and related substances in muscle and other tissues. *J. Chromatog.* **6** : 142—154.
- Yunis J. J., Yasmineh W., 1969. *Glucose metabolism in human erythrocytes. Biochemical methods in red cell genetics.* New York—London : 1—49.
- Боброва Л. Н., Степаненко Б. Н., 1962. Методы выделения и исследования нуклеотидов. *Успехи биол. химии* **4** : 134—156.
- Венкстерн Т. В., Баев А. А., 1957. Нуклеотидный состав ядерных эритроцитов. *Биохимия* **22** : 1043—1055.
- Зайцева Г. Н., Афанасьева Т. П., 1957. Количественное определение углеводов методом нисходящей хроматографии на бумаге. *Биохимия* **22** : 1035—1042.
- Иванова Т. Н., Правдина Н. И., Рубель Л. Н., 1962. О свободных нуклеотидах ткани головного мозга и скорости обновления их фосфатных групп. *Биохимия* **27** : 293—302.
- Кемень Т., Антал М., 1966. Значение энергетической системы эритроцитов в адаптации организма. В кн.: *Проблемы биохимической адаптации* (под ред. А. А. Покровского). М. : 51—55.
- Скулачев В. П., 1962. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи. М.

*Eesti NSV Teaduste Akadeemia  
Eksperimentaalsooalbioloogia Instituut*

Toimetuse saanud  
9. VIII 1971

ХЕЛЬГИ ЭККЕ

### СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА МЕТОДОВ ЭКСТРАГИРОВАНИЯ АДЕНИННУКЛЕОТИДОВ ИЗ ЭРИТРОЦИТОВ КРОЛИКА

Резюме

Экстрагирования адениновых нуклеотидов из эритроцитов кролика проводились методом осаждения белков трихлоруксусной кислотой, этиловым спиртом и водой с одновременным нагреванием. Экстракты разделялись одномерной нисходящей хроматографией с использованием пропанолового растворителя Хейнса—Ишервуда. Установлено, что наиболее подходящими способами во избежание расщепления АТФ являются метод 50%-ного этанола и 5%-ной трихлоруксусной кислоты, при помощи которых полного прекращения гидролиза АТФ все-таки достичь не удалось.



Исходя из данных анализа чистых адениннуклеотидов, были рассчитаны коэффициенты их потерь, с помощью которых вводились соответствующие поправки в исходные данные.

Для торможения гидролиза особо лабильного ГТФ целесообразно в растворе Хейнса—Ишервуда заменить *n*-пропанол *i*-пропанолом.

Институт экспериментальной биологии  
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию  
9/VIII 1971

HELGI AKKE

## A COMPARATIVE STUDY OF PROCEDURES FOR EXTRACTING ADENINE NUCLEOTIDES OF THE RABBIT ERYTHROCYTES

### Summary

A comparison has been made between adenine nucleotide content of three extracts of rabbit erythrocytes obtained by treating the cells with trichloroacetic acid, ethanol and water at simultaneous heating. The nucleotides in red cell extracts were separated by means of one-dimensional descending paper chromatography; the alkaline solvent recommended by Hanes and Isherwood was used. It has been found that the most suitable methods for avoiding a degradation of ATP were the procedures with 50 per cent ethanol and preferably with 5 per cent trichloroacetic acid. It was not possible to achieve a complete interruption of hydrolysis of ATP in both cases.

The primary results were corrected by using the respective loss coefficients obtained from analysis with pure nucleotides.

In order to prevent a decomposition of particularly labile GTP, it is advisable to replace *n*-propanol with *i*-propanol in the solvent.

Academy of Sciences of the Estonian SSR,  
Institute of Experimental Biology

Received  
Aug. 9, 1971