

П. Д. УЛИТИНА и Б. А. КУДРЯШОВ

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АНАЛОГОВ ВИТАМИНА К

(Представлено академиком Я. О. Парнасом 5 X 1948)

В 1941 г. нами был опубликован в предварительной форме метод биологического испытания препаратов витамина К на крысах (¹). Этот метод, впоследствии несколько усовершенствованный, был применен нами для изучения активности ряда аналогов витамина К. Путем точной оценки активности изучаемых препаратов в крысиных единицах были получены сравнительные данные по следующему соединению: 2-метил-1,4-нафтохинону, 2-метил-1,4-нафтохинон-3-сульфокалию и бисульфитному соединению 2-метил-1,4-нафтохинона (⁵)*.

Материал и методика. Для изучения биологической активности препаратов витамина К использовались крысы с весом тела от 150 до 200 г. У животных в асептических условиях перевязывался желчный проток. Через 10—12 дней после операции у крыс систематически бралась кровь из яремной вены при помощи шприца. Перед взятием крови в шприц набиралось 0,05 мл 0,1 М раствора оксалата натрия на объем крови, равный 0,45 мл. Оксалатная кровь центрифугировалась, и отделенная от форменных элементов плазма пускалась в анализ. Количество протромбина определялось в плазме при помощи методики, описанной ранее (¹, ²). С целью получения в разных опытах сравнимых результатов в анализах использовался стандартизованный препарат тромбопластина, приготовленный из мозга крыс. Такой препарат при использовании в реакции определения концентрации протромбина в нормальной плазме крысы обеспечивает образование сгустка в 13—14 сек. С разбавленной же в три раза физиологическим раствором оксалатной плазмы крысы стандартный препарат тромбопластина дает образование сгустка в 17—18 сек. Жирорастворимый препарат витамина К вводился животным внутримышечно в спиртовом растворе. Водорастворимые вещества инъецировались в мышцы в физиологическом растворе.

Определение понятия крысиной единицы активности препаратов витамина К. На основании предварительных данных, полученных в предшествующих исследованиях (¹, ²), были даны два варианта определения крысиной единицы витамина К. После проведенной проверки в экспериментах более чем на 1000 животных нами принята окончательная формулировка этого определения. Под условной крысиной единицей витамина К мы подразумеваем минимальное количество вещества, которое способно после однократной внутримышечной инъекции желтушной крысе поднять процент протромбина в крови через 18—24 часа после введения с 5—25% до 85—100%. Для подсчета берется среднее не менее чем от 5 крыс с весом тела от 150 до 200 г.

* Все указанные препараты были получены от М. М. Шемякина.

Результаты эксперимента. С 1939 г. известно (3), что 2-метил-1,4-нафтохинон обладает биологической активностью витамина К. Это вещество, растворимое в жирах и жирорастворителях, используется в клинических условиях в качестве заменителя естественных витаминов К (4). При изучении активности 2-метил-1,4-нафтохинона в экспериментальных условиях нами были получены следующие результаты (табл. 1, А). Из приведенных данных следует, что крысиной единице соответствует навеска 2-метил-1,4-нафтохинона, равная 10γ чистого вещества.

По сравнению с 2-метил-1,4-нафтохиноном, 2-метил-1,4-нафтохинон-3-сульфоокислый калий проявил в несколько раз меньшую активность (табл. 1, Б); крысиной единице соответствует навеска 2-метил-1,4-нафтохинон-3-сульфоокислого калия, равная 100γ.

Таблица 1

Средняя концентрация протромбина в плазме желтушных крыс (в процентах)

Число животных	Доза в γ	До введения препарата	После введения препарата через часов									
			18	42	66	90	114	138	162	186	210	234

А. 2-метил-1,4-нафтохинон

12	2	16	51	38	29	21	—	13	10	9	7	—
12	5	10	71	46	35	25	16	15	13	11	10	10
12	8	10	79	65	46	30	24	21	17	17	16	14
12	10	12	94	84	66	44	—	38	35	30	25	17
65	1000	14	84	91	90	80	80	71	63	59	48	34

К о н т р о л ь

12	1 мл 60° алког.	21	20	19	17	17	13	12	—	—	—	—
----	-----------------	----	----	----	----	----	----	----	---	---	---	---

Б. 2-метил-1,4-нафтохинон-3-сульфоокислый калий

6	10	12	18	24	22	18	16	12	9	—	—	—
6	15	14	27	23	21	16	15	11	—	—	—	—
12	50	14	72	55	45	33	23	—	19	16	13	13
12	75	12	80	69	54	36	—	21	20	11	—	—
11	100	12	90	69	48	—	28	—	23	—	—	—
26	1000	13	88	91	85	73	50	49	46	43	—	—

В. Бисульфитный комплекс 2-метил-1,4-нафтохинона

12	2	15	45	28	23	20	—	15	12	—	—	—
12	5	13	69	50	42	33	22	19	17	15	—	12
13	8	14	83	67	53	—	38	21	18	17	15	13
12	10	15	91	72	63	54	34	25	22	19	17	15
38	1000	16	83	90	94	89	86	78	73	65	51	41

К о н т р о л ь

17	1 мл физиол. раств.	21	20	20	17	17	16	—	—	—	—	—
----	---------------------	----	----	----	----	----	----	---	---	---	---	---

При изучении активности бисульфитного комплекса 2-метил-1,4-нафтохинона было установлено (табл. 1, В), что крысиной единице соответствует навеска бисульфитного комплекса 2-метил-1,4-нафтохинона, равная 100 γ. Таким образом, это вещество по степени своей биологической активности тождественно 2-метил-1,4-нафтохинону и в 10 раз более активно по сравнению с 2-метил-1,4-нафтохинон-3-сульфокислым калием.

Нас интересовал вопрос: какое время требуется для максимального подъема концентрации протромбина в крови подопытных животных после инъекции аналогов витамина К? Определение процента протромбина в крови желтушных крыс через короткие периоды времени после введения препаратов позволило нам получить следующие данные (табл. 2).

Таблица 2

Средняя концентрация протромбина в плазме желтушных крыс (в процентах)

Число животных	Доза в γ	До введения препарата	После введения препарата через часов													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	18	24
2-метил-1,4-нафтохинон																
10	10	15	—	21	21	64	74	84	92	92	91	92	90	86	—	85
2-метил-1,4-нафтохинон-3-сульфокислый калий																
12	75	12	16	20	31	40	—	67	67	—	74	—	—	—	18	—
11	100	12	—	—	25	31	60	69	80	90	90	90	90	90	—	85
Бисульфитный комплекс 2-метил-1,4-нафтохинона																
11	10	13	—	19	22	37	56	67	74	90	90	90	90	90	—	90

Как видно из табл. 2, организм животных сравнительно быстро реагирует на введение препаратов витамина К, и через 7—8 час. после инъекции в крови восстанавливается максимальный уровень протромбина, который удерживается до 24 и более часов, в зависимости от дозы и степени активности препарата.

Три указанные выше вещества были испытаны на безвредность на большом числе животных. Токсической дозой 2-метил-1,4-нафтохинона при внутримышечном введении является навеска 20 мг на 200 г веса тела крысы. 2-метил-1,4-нафтохинон-3-сульфокислый калий в тех же условиях обладает той же степенью токсичности в навеске 10 мг, а бисульфитный комплекс 2-метил-1,4-нафтохинона — в навеске 60 мг.

Введение нормальным крысам сублетальных доз бисульфитного комплекса 2-метил-1,4-нафтохинона, как правило, повышало концентрацию протромбина в крови подопытных животных сверх физиологического уровня, однако это явление не оказывало заметного влияния на скорость общей свертываемости крови и не вызывало образования внутрисосудистых тромбов. Повышение концентрации протромбина сверх нормы, при инъекции 50 мг бисульфитного комплекса 2-метил-1,4-нафтохинона на 200 г веса тела крысы, как видно из табл. 3, в среднем не

превышало 130%, в отдельных же случаях оно достигало 150% и через 160 час. после инъекции снижалось до физиологического уровня.

Таблица 3

Средняя концентрация прогормбина в плазме нормальных крыс (в процентах)

Число животных	Доза в γ	До введения препарата	После введения препарата через часов												
			2	6	7	9	24	48	72	96	120	144	168	192	216
18	50 000	97	103	119	121	127	125	123	118	110	110	108	100	98	100
К о н т р о л ь															
10	1 мл физиол. раствора	102	103	96	100	—	107	103	100	100	100	100	100	100	100

Изложенные материалы свидетельствуют, что наиболее ценным в практическом отношении является бисульфитный комплекс 2-метил-1,4-нафтохинона, хорошо растворяющийся в воде, обладающей высокой активностью витамина К и отличающийся крайне низкой токсичностью по сравнению с двумя другими изученными веществами.

Институт зоологии
Московского государственного университета
им. М. В. Ломоносова

Поступило
7 VII 1948

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ Б. А. Кудряшов, П. Д. Улитина и А. А. Пугачева, Бюлл. эксп. биол. и мед., **9**, 99 (1941); **9**, 510 (1941). ² Б. А. Кудряшов, Сов. здравоохран. Туркмении, **1**, 31 (1942). ³ H. J. Almquist and A. A. Klose, J. Am. Chem. Soc., **61**, 1923 (1939); S. Ansbacher and E. Fernholz, *ibid.*, **61**, 1924 (1939). ⁴ Б. А. Кудряшов, Усп. совр. биол., **14**, 466 (1941). ⁵ Д. А. Бочвар, Л. А. Щукина, А. С. Чернышев, Н. Г. Семенов и М. М. Шемякин, J. Am. Chem. Soc., **65**, 2162 (1943); А. В. Палладин, Достижения сов. мед. в годы Отечественной войны, **2**, **72**, М., 1944; Н. В. Моог, J. Am. Chem. Soc., **63**, 2049 (1941).