

Н. И. ВИНОГРАДОВА

ИЗУЧЕНИЕ ОБМЕНА ГЛИКОГЕНА МЫШЦ И ПЕЧЕНИ ЛЯГУШЕК С ПОМОЩЬЮ ДЕЙТЕРИЯ

(Представлено академиком А. И. Опариным 5 X 1949)

В 1944 г. Стеттен и Боксер (1), повторяя работы Уссинга (2) по определению свободных гидроксильных групп с помощью тяжелой воды, нашли, что 34% водородных атомов в молекуле гликогена связаны лабильно. Это находится в соответствии с наличием в каждом глюкозном остатке молекулы гликогена трех атомов водорода (из 10) в виде гидроксильных групп. В 1946 г. Д. Стеттен и М. Стеттен (3), выделив производные гексозы, полученные из мочи дейтерированных диабетных кроликов, показали, что дейтерий, вошедший в глюкозу в результате синтетических процессов, содержится в приблизительно одинаковых количествах в каждом из семи положений атомов водорода, связанных стабильно.

Исходя из того, что дейтерий при биологических процессах может входить во все семь стабильных позиций и 34% атомов водорода (или дейтерия) связываются лабильно, можно было заключить, что максимальная концентрация дейтерия, связанного стабильно с углеродом в молекуле гликогена, может приблизиться к 66 ат. % от концентрации его в жидкости тела животного.

Стеттен, Боксер и ряд других исследователей при изучении углеводного обмена установили, что у голодавших крыс (4) процент внедрения дейтерия в гликоген печени выше, чем у крыс на высоко углеводной диете (1), так как при голодании не происходит снижения процентного содержания дейтерия вследствие разведения ранее отложенным гликогеном.

При изучении углеводных предшественников гликогена авторы дейтерировали крыс, голодавших 24 часа. У контрольных животных содержание дейтерия в гликогене их печени составляло 25 ат. % от концентрации его в жидкости тела, в гликогене каркаса 11,9 ат. %.

При питании молочной кислотой гликоген печени содержал 57 ат. % дейтерия, гликоген каркаса 15,4 ат. % (4). При питании *dl*-глицериновым альдегидом в гликогене печени было найдено дейтерия 43 ат. % (5); при введении *dl*-глицериновой кислоты также 43 ат. % (5), при введении диоксиацетона содержание дейтерия в гликогене печени приближалось к такому в опытах с молочной кислотой и составляло 56 ат. % (5).

Из этих работ видно, что в случае образования гликогена печени из трехуглеродных предшественников концентрация дейтерия в нем приближается к максимально возможной.

С. Ф. Кори и Г. Т. Кори (6) было найдено, что адреналин у предварительно голодавших крыс стимулирует анаэробный гликолиз в мышцах, а освобождающаяся при этом молочная кислота утилизируется печенью. Это нашло подтверждение в работах Стеттена (7), который вво-

дил тяжелую воду и адреналин предварительно голодавшим крысам, после чего концентрация дейтерия в гликогене их печени составляла 56,2 ат. %. При образовании гликогена путем прямой утилизации гексоз в нем наблюдалась невысокая концентрация дейтерия. Так, в случае, когда голодным крысам вводили инсулин и глюкозу (7), количество гликогена в мышцах увеличивалось в 7 раз, а содержание дейтерия в нем составляло только 21,2 ат. % от концентрации его в жидкости тела данного животного.

В результате этих работ отчетливо видно, что при образовании гликогена печени из более мелких фрагментов, чем гексоза, содержание дейтерия в нем приближается к максимально возможному. Особенно ярко этот процесс протекает на фоне голодной печени.

Содержание дейтерия в гликогене мышц в этих работах не было высоким, так как 24-часовое голодание не истощает гликогена мышц, и вопрос о предшественниках мышечного гликогена с помощью дейтерия не был выяснен.

В настоящей работе мы хотели узнать, насколько глубоко идет ресинтез гликогена в мышцах из молекул с более короткими, чем гексоза, углеродными цепями, о чем можно судить по внедрению дейтерия. Кроме того, получив дейтерированный гликоген и подвергнув его *in vitro* действию β -амилазы, отщепляющей в молекулах гликогена периферические цепи глюкозных остатков, мы могли, на основании определения содержания дейтерия в полученном апогликогене, судить о том, происходит ли расщепление и ресинтез гликогена мышц в равной степени во всех частях молекулы, или же преимущественно в ее периферических частях.

Для этого мы путем мышечных сокращений вызывали наибольший распад гликогена в мышцах. На этом фоне вводили в жидкость тела животного тяжелую воду и в процессе ресинтеза получали дейтерированный гликоген мышц. Определив в части полученного гликогена концентрацию дейтерия, мы подвергли другую часть *in vitro* ферментативному расщеплению β -амилазой и в оставшемся апогликогене снова определяли концентрацию дейтерия.

В серии предварительных экспериментов нами вырабатывались условия максимального распада и ресинтеза гликогена в мышцах. Для этого брались отборные осенние самцы *Rana temporaria*, им вводилось под язык в грудную полость по 1 мл 0,01% раствора азотнокислого стрихнина. На фоне мышечных судорог через различные промежутки времени определялось количество гликогена в мышцах и печени. Около 0,5 г навески, состоящей из тканей 3 лягушек, гидролизывалось в течение 30 мин. тремя объемами 60% КОН. Выделенный гликоген дважды переосаждали из воды спиртом, затем растворяли в 9 мл воды с добавлением 1 мл 25% HCl и проводили 3-часовой гидролиз на кипящей бане. Раствор нейтрализовали 1 мл 35% КОН, переносили в мерную колбу, соответственно разводили и определяли содержание глюкозы по Хагедорну и Иенсену, пересчитывая на количественное содержание гликогена в мг/г ткани.

Вопрос о времени ресинтеза гликогена в мышцах разрешался следующим образом. Лягушки из той же партии после окончания стрихнинных судорог жили различные промежутки времени, затем у них также определялось содержание гликогена в мышцах и печени.

Найдя условия и время максимального распада гликогена в мышцах (стрихнинные судороги в течение 10 час.) и ресинтеза его (3 суток после окончания стрихнинных судорог), мы приступили к основному опыту.

20 самцам *Rana temporaria* из той же партии весом 40—43 г каждый вводили под язык в грудную полость 0,5 мл 0,02% раствора азотнокислого стрихнина. Мышечные судороги продолжались в течение 10 час. По окончании судорог каждой лягушке под язык в грудную полость

вводилась тяжелая вода из расчета достижения концентрации дейтерия 0,2 ат. % в жидкости их тела. Лягушки помещались во влажную камеру, но без соприкосновения животных с водой, чтобы не было разведения концентрации дейтерия в жидкости их тела. Через трое суток от момента стрихнинных судорог и через 62 часа от момента дачи тяжелой воды лягушки обездвиживались проколом спинного мозга. У них вскрывалась брюшная полость, собиралась жидкость тела — кровь; из печени и мышц задних лап выделялся гликоген по Остерну (8). Очистка гликогена проводилась путем 4-кратного пересаживания из водного раствора спиртом. Полученный препарат высушивался в вакуум-эксикаторе над серной кислотой и Na_2CO_3 . Выделенные препараты гликогена не содержали золы и фосфора. Содержание азота по Кьельдалю составляло 0,018%. Одна часть препарата сжигалась по Шенгеймеру, полученная вода очищалась по Бриско и концентрация дейтерия определялась флотационным методом.

Вторая часть препаратов гликогена расщеплялась β -амилазой следующим образом.

Смесь 80 мл $\approx 0,7\%$ раствора гликогена в свежепрокипяченном и охлажденном ацетатном буфере pH 4,8 с 20 мл раствора β -амилазы высокой активности, полученной из сои по методу Бурн и Пит (9), не содержащей α -амилазы и мальтазы, инкубировалась под толуолом в термостате при 37° 2 суток. Мальтоза определялась по методу Сомогии (10). Расщепление дейтерированного гликогена печени β -амилазой дошло до 43%, гликогена мышц — до 45%.

Полученные апогликогены осаждались двойным объемом спирта, освобождались от примеси мальтозы и остатков фермента растворением в холодной 5% трихлоруксусной кислоте с трехкратным пересаживанием из водного раствора спиртом. Затем препараты апогликогенов выделялись, высушивались, сжигались по Шенгеймеру, полученная вода очищалась по Бриско и концентрация дейтерия определялась флотационным методом.

Высокая концентрация дейтерия в полученных нами препаратах гликогена говорит о том, что предшественниками гликогена не только печени, но и мышц в условиях нашего опыта являются углеродные цепи более короткие, чем у гексозы.

Концентрация дейтерия в гликогене печени лягушек составляет 31,9 ат. % от концентрации его в жидкости их тела, т. е. половину максимально возможного, что говорит о том, что гликоген печени на фоне общей количественной убыли во время ресинтеза гликогена в мышцах (табл. 2) продолжает обмениваться. Апогликоген печени лягушек не

Таблица 1

Изменение содержания гликогена в печени и мышцах лягушек при стрихнинных судорогах. (Содержание гликогена в мг/г ткани по Хагедорну и Иенсену)

Навеска ткани	Контроль	Продолжительность стрихнинных судорог в часах		
		2	5	10
Печень	183	104	100,5	115,3
Отводящая мышца бедра	141,8	65	57,7	48,7
Икроножная мышца	113	100,5	70,3	56

Таблица 2

Изменение содержания гликогена в печени и мышцах лягушек после стрихнинных судорог. (Содержание гликогена в мг/г ткани по Хагедорну и Иенсену)

Навеска ткани	Контроль	Время, прошедшее после стрихнинных судорог, в сутках		
		1	2	3
Печень	156,5	49,8	59,3	24,2
Икроножная мышца	91,6	87,5	119	128

содержит дейтерия. Это говорит о том, что процесс обмена в гликогене печени в условиях нашего опыта идет только в наружных ветвях молекулы.

Содержание дейтерия в ресинтезированном гликогене мышц задних лап составляет 59,4 ат. %, т. е. приближается к теоретически максимальному количеству, ранее никем не полученному. Содержание дейтерия в наружных ветвях ресинтезированного гликогена мышц составляет $59,4 - 28,7 = 30,7$ ат. % от концентрации его в жидкости тела, т. е. количество новообразованной массы полисахарида в наружных ветвях молекул гликогена мышц и печени приблизительно одинаково, хотя по условиям опыта количество гликогена в печени убывало, а в мышцах — возрастало. 28,7 ат. % стабильно связанного дейтерия в мышечном гликогене стоит во внутренней части молекулы.

Таким образом, в результате этой работы с помощью дейтерия было показано, что предшественниками мышечного гликогена, ресинтезированного после мышечных судорог, являются молекулы с более короткой углеродной цепью, чем гексоза. Процесс обмена при мышечном сокращении идет не только в периферической части молекулы гликогена мышц, но в равной степени и во внутренней ее части. Несмотря на то, что гликоген печени в момент ресинтеза гликогена мышц количественно убывает, процесс ресинтеза его продолжается, причем он идет только в периферических частях молекул.

Таблица 3
Концентрация дейтерия в препаратах гликогена и апогликогена лягушек

Препараты	Содержание дейтерия	
	В ат. %	В % от концентрации его в жидкости тела
Жидкость тела .	0,235	100
Гликоген печени	0,075	31,9
Апогликоген печени	0	0
Гликоген мышц задних лап	0,140	59,4
Апогликоген мышц задних лап	0,068	28,7

Считаю своим долгом выразить благодарность проф. Б. Н. Степаненко за руководство работой.

Лаборатория физиологической химии
Академии наук СССР

Поступило
3 X 1949

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ D. Stetten Jr. and G. E. Boxer, J. Biol. Chem., 155, 231 (1944).
² H. H. Ussing, Skand. Arch. Physiol., 77, 85 (1937). ³ D. Stetten Jr. and M. R. Stetten, Journ. Biol. Chem., 165, 147 (1946). ⁴ G. E. Boxer and D. Stetten, Jr., Journ. Biol. Chem., 155, 237 (1944). ⁵ D. Stetten Jr. and B. V. Klein, Journ. Biol. Chem., 165, 157 (1946). ⁶ C. F. Cori and G. T. Cori, Journ. Biol. Chem., 79, 309 (1928). ⁷ D. Stetten Jr. and B. V. Klein, Journ. Biol. Chem., 159, 123 (1945). ⁸ P. Ostern u. St. Hubl, Acta biolog. exper., 13, No. 8, 89 (1939). ⁹ E. Bourne and S. Peat, Journ. Chem. Soc., 882 (1945). ¹⁰ M. Somogyi, Journ. Biol. Chem., 160, 61 (1945); 160, 69 (1945).

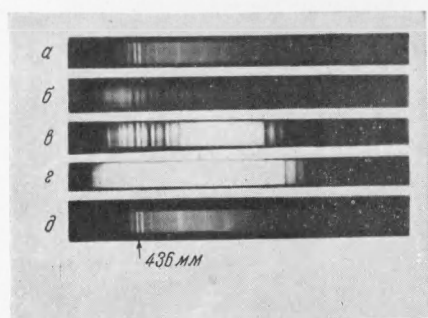


Рис. 2. Спектр поглощения сернокислого уранила при температуре $\sim -185^\circ$: б — при экспозиции 15 сек.; в — при экспозиции 2 мин.; г — при экспозиции 5 мин.; а и д — спектры криптоновой лампы

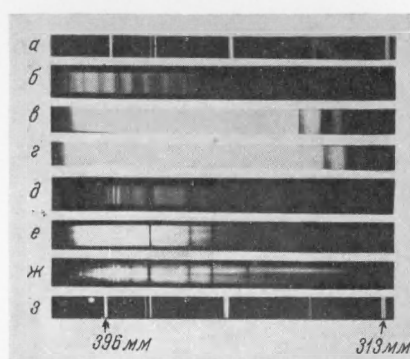


Рис. 3. Спектры поглощения микрокристаллов. б, в и г — калийуранилсульфат при температуре $\sim -185^\circ$ и разных экспозициях; д — азотнокислый самарий при комнатной температуре; е — ж — азотнокислый самарий при температуре $\sim -185^\circ$ и разных экспозициях; а и з — спектры ртутной лампы

К статье М. Г. Крицман и К. В. Дружининой, стр. 569

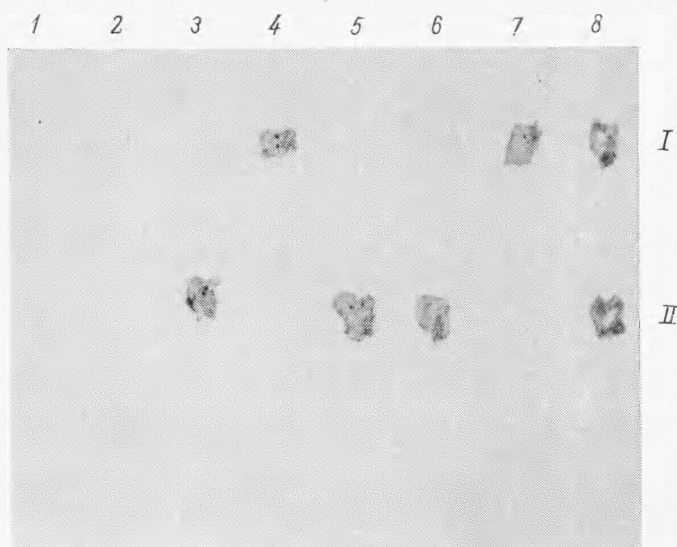


Рис. 1. Синтез аминокислот в изотонических гомогенатах печени. 1, 2 — контроль: 1 — гомогенат + буфер + NH_4Cl , 2 — гомогенат + буфер + кето- или оксикислота, 3—7 — опыт: 3 — гомогенат + пировиноградная к-та + NH_4Cl , 4 — гомогенат + α -кетоглутаровая к-та + NH_4Cl , 5 — гомогенат + молочная к-та + NH_4Cl , 6 — то же + арсенит, 7 — гомогенат + оксиглутаровая к-та + NH_4Cl , 8 — стандартная смесь аминокислот: I — аланин, II — глутаминовая кислота