

Б. Н. СТЕПАНЕНКО и Е. М. АФАНАСЬЕВА

О СТРОЕНИИ ГЛИКОГЕНОВ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ *

(Представлено академиком А. И. Опариным 8 V 1953)

Современные представления о строении гликогена сложились, главным образом, на основании работ Мейера (1), детально исследовавшего гликоген моллюсков. Данные, полученные при изучении этого гликогена, в дальнейшем без достаточных к тому оснований были перенесены на гликогены других животных.

Со времени упомянутых работ Мейера накопилось большое количество данных как зарубежных, так и в особенности нашей лаборатории (2, 3) о разнообразии и изменчивости гликогенов, о необходимости замены термина «гликоген» термином «гликогены». Однако прямые данные о химических различиях гликогенов в литературе немногочисленны. До самого последнего времени в литературе приводятся данные о молекулярных весах различных гликогенов, либо дается такая общая характеристика гликогенов, как «единица цепи» (т. е. число глюкозных остатков, входящих на 1 концевой неальдегидный остаток (см., например, (4)). При этом, как правило, исследования молекулярных весов и «единицы цепи» производятся различными авторами, что затрудняет сопоставление данных. Необходимо также подчеркнуть, что, кроме упомянутой выше работы (1), ни в одном исследовании авторы не изучали строения центральных частей молекулы гликогена — их «ядер», получающихся после отщепления периферических цепей глюкозных остатков β -амилазой.

В настоящем исследовании мы поставили следующие задачи.

1. Изучив строение как центральной, так и периферической части молекул некоторых гликогенов установить, применима ли упомянутая выше схема строения гликогена, выведенная при изучении гликогена моллюсков, к гликогенам других видов животных.

2. Установить, имеются ли и какие именно конкретные особенности строения различных гликогенов.

3. По возможности установить связь между особенностями строения и свойствами различных гликогенов в отношении иодной реакции.

Исследованиям подвергались гликогены кроликов и гликогены лягушек как представителей теплокровных и холоднокровных животных, к тому же ранее изучавшиеся нами в отношении иодной реакции и расщепляемости β -амилазой (5-7). Исследовались гликогены, выделенные по возможности в различное время года. В большинстве случаев одна часть каждого препарата гликогена использовалась для определения молекулярного веса и единицы цепи, а также для снятия абсорбционной кривой соединения с иодом. Другая часть препарата подвергалась расщеплению β -амилазой; при этом определялась степень расщепления β -амилазой

* Доложено 4 XII 1952 г. на заседании секции биохимии Московского общества физиологов, биохимиков и фармакологов (Москва).

и препаративно выделялись β-декстрины, которые тщательно очищались и использовались для определения молекулярного веса, единицы цепи и снятия абсорбционных кривых их соединений с иодом. Гликогены выделялись из тканей, как описывалось ранее (5), и тщательно очищались. Они не содержали золы и фосфора, содержание N 0,02—0,04 %.

Молекулярные веса полисахаридов определялись по методу (8) (после тщательного диализа) путем окисления динитросалициловой кислотой. Этот метод, по точности не уступающий физико-химическим, в последние годы приобрел широкое применение в химии полисахаридов (9).

В табл. 1 мы приводим по 2 значения молекулярных весов, представляющих крайние пределы колебаний при повторных определениях (включающих диализ). Молекулярные веса β-декстринов можно вычислить, исходя из молекулярных весов исходных гликогенов и их расщепляемости β-амилазой. Определив экспериментально молекулярные веса β-декстринов, мы могли их сравнить с вычисленными. Как видно из таблицы, найденные величины близки к вычисленным. Молекулярные веса, найденные нами для различных гликогенов, 475 000—1 134 000.

Таблица 1

Средние молекулярные веса и данные о строении различных гликогенов и их β-декстринов

№ препарата	Препарат	Средн. мол. вес (a)	Коэффициент полимеризации (b)	Средн. единица цепи (N)	Средн. число точек ветвления в мол. (c)	Расщепляемость β-амилазой в % (d)	Средн. длина наружных ветвей (число глюкоз. остатков) (N _н)	Средн. длина внутренних ветвей (число глюкоз. остатков) (N _{вн})
1	Гликоген кролика печеночный, 26 X 1946	511 000	3170	13,5	228	48,7	8,1	(4,4)
2	Его β-декстрин	475 000						
		найд. 265 000	1550	8,2	200	0	(1,5)	4,9
		выч. 250 000						
3	Гликоген кролика печеночный (част. гидролиз.)	247 000	1450	14	103	51	8,6	(4,4)
4	Его β-декстрин	225 000						
		найд. 115 000	700	—	103	0	(1,5)	4,3
		112 000						
		выч. 115 000						
5	Гликоген кролика печеночный, 23 X 1947	1 134 000	7000	14	—	—	—	—
6	То же, 16 IV 1945	—	—	13	—	—	—	—
7	Гликоген лягушки печеночный, 20 XI 1948	485 000	3100	11	281	47,5	6,7	(3,3)
8	Его β-декстрин	522 000						
		найд. 239 000	1650	—	281	0	(1,5)	3,3
		304 000						
		выч. 262 000						
9	Гликоген лягушки печеночный, 8 I 1948	—	—	11,5	—	—	—	—

Единица цепи полисахаридов определялась периодатным методом (10), который, как известно, по точности не уступает методу метилирования (9). При истолковании полученных при применении этого метода данных и при расчетах мы опирались на тот факт, что поиски в разнообразных гликогенах иных связей, кроме $\alpha = 1,4$ и $\alpha = 1,6$, привели к отрицательному результату. Единица цепи вычислялась по формуле для сильно ветвистых полисахаридов: $N = m/162 : n$, где m — навеска гликогена, 162 — эквивалент глюкозного остатка и n — число эквивалентов образовавшейся муравьиной кислоты.

Расщепление β-амилазой производилось при помощи этого фермента, тщательно очищенного от α-амилазы и мальтазы в оптимальных условиях ее действия.

β -декстрины выделялись осаждением спиртом. В отношении каждого препарата мы на основании контрольных опытов имели уверенность в полноте расщепления.

Абсорбционные кривые соединений полисахаридов с иодом снимались в условиях методики, разработанной нами ранее (5) (рис. 1). На основании определения молекулярных весов мы могли вычислить коэффициент полимеризации. Зная коэффициент полимеризации и среднюю единицу цепи, мы вычисляли среднее число точек ветвления в молекуле. Средние длины наружных цепей (т. е. число содержащихся в них глюкозных остатков) можно вычислить, исходя из средних единиц цепи гликогенов и расщепляемости β -амилазой с учетом того, что «культи» наружных цепей, остающиеся после действия β -амилазы, содержат 1 или 2 (в среднем 1,5) глюкозных остатка (4): $N_n = \frac{Nd}{100} + 1,5$ (обозначения см. в табл. 1). Среднюю длину внутренних ветвей можно приближенно вычислить путем вычитания из единицы цепи длины наружной цепи, а также единицы (т. е. остатка, представляющего точку ветвления): $N_{вн} = N - (N_n + 1)$. Вычисленные таким образом длины внутренних цепей приведены в последнем столбце таблицы в скобках.

Однако, располагая рядом экспериментальных данных о β -декстринах, мы могли проверить эти величины, рассчитывая длины внутренних цепей по формуле $N_{вн} = \frac{b' - c - (3 \cdot 0,5 c)}{c} = \frac{b' - 2,5 c}{c}$. В этой

формуле b' — коэффициент полимеризации β -декстрина; c — число точек ветвления (практически равное числу концевых групп); коэффициент 3 — среднее число глюкозных единиц, остающихся связанными с каждой периферической точкой ветвления после действия β -амилазы; $0,5 c$ — число всех периферических точек ветвления (практически равное, по правилам дихотомического ветвления, половине общего числа точек ветвления). Значения $N_{вн}$, вычисленные по этой формуле, приведены в последнем столбце таблицы без скобок. Вычисленные обоими способами данные, как видно из таблицы, совпадают или почти совпадают.

Схемы строения гликогенов кролика и лягушки на основании полученных данных представлены на рис. 2. Учитывая сферическую форму молекул гликогена (2), мы придаем схемам общие очертания сектора окружности.

Проведенные исследования дают все основания считать, что тип строения исследованных гликогенов моллюсков (1), кролика и лягушки одинаков: наружные его ветви длиннее внутренних. Однако мы видим и некоторые различия изученных нами гликогенов, заключающиеся в том, что как наружные, так и внутренние ветви гликогенов кролика длиннее таковых лягушки. Эти различия строения проявляются в свойствах, в первую очередь, в отношении иодной реакции (рис. 1).

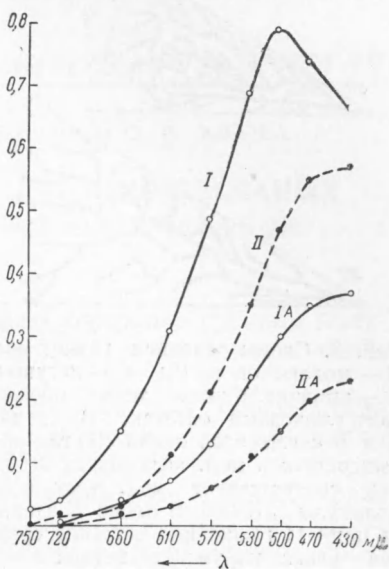


Рис. 1. Абсорбционные кривые соединений с иодом гликогенов и их β -декстринов. I — кривая иод-гликогена кролика; II — то же лягушки; IA — кривая иод- β -декстрина гликогена кролика; IIA — то же лягушки. 8,1 мг препарата растворено в 25 мл фосфатного буфера, pH 6,8. В кювете 5 μ экв. J_2 и 2 μ экв. глюкозных остатков гликогена

Более длинные наружные ветви молекул обуславливают иное положение максимума абсорбции. Как было показано нами ранее (6), расщепление гликогенов кролика β -амилазой на 16,8% (т. е. укорочение наружных цепей приблизительно на 1—2 глюкозных остатка) приводит к перемещению максимума в ту же область, в которой находится максимум иодгликогена лягушки. Более короткие внутренние ветви гликогена лягушки обуславливают более низкое расположение кривой, что особенно ярко видно на иод- β -декстринах (рис. 1).

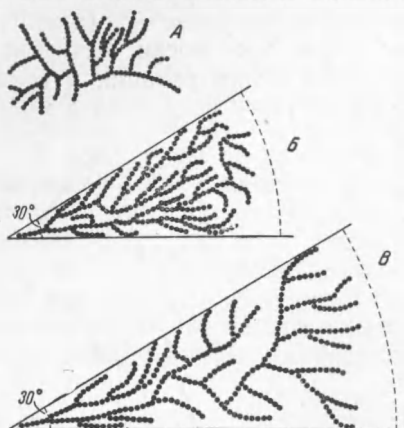


Рис. 2. Схемы строения гликогенов: А — моллюсков по (1); Б — лягушки; В — кролика. Каждая точка обозначает глюкозный остаток. В схемах Б и В содержится около 300 глюкозных остатков мол. веса около 48 000, что соответствует мол. весу всей молекулы 570 000. В схеме Б единица цепи 11 глюкозных остатков, средняя длина наружных ветвей 6—7 остатков, внутренних около 3; в схеме В эти величины равны, соответственно, 14, 8—9 и 4—5

цепи, равную 11, и мы никогда не видели столь высокого расположения кривых иодгликогенов лягушек, какое характерно для кроликов. Повидимому, молекула гликогена лягушек, как правило, более компактна по сравнению с молекулой гликогенов кроликов.

Если сравнить абсолютные размеры глюкозного остатка (6,5 Å) и молекулы иода (6,3 Å), то делается совершенно понятным, что малые различия в длинах внутренних цепей (равные 1 глюкозному остатку) действительно могут играть большую роль. Естественно, что небольшие изменения длины внутренних цепей могут существенно влиять на условия адсорбции иода.

Найденные нами отличия строения различных гликогенов, повидимому, не являются абсолютно стабильными, о чем можно судить как по некоторым определениям единиц цепи (не включенным в таблицу), так и по некоторым изменениям иодных кривых животных в различных условиях содержания. Однако нам никогда не приходилось находить у кроликов единицу

Лаборатория физиологической химии
Академии наук СССР

Поступило
25 II 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ К. Меуер, Adv. Enzymol., 3, 122 (1943).
- ² Б. Н. Степаненко, А. Н. Петрова, Е. Л. Розенфельд, Изв. АН СССР, сер. биол., № 1, 89 (1951).
- ³ Е. Л. Розенфельд, О существовании различных гликогенов и их соединений с белками, Диссерт., М., 1952.
- ⁴ D. Bell, D. Mappers, J. Chem. Soc. London, 3641 (1952).
- ⁵ Б. Н. Степаненко, Е. М. Афанасьева, Биохимия, 12, 111 (1947).
- ⁶ Б. Н. Степаненко, Е. М. Афанасьева, ДАН, 63, 415 (1948).
- ⁷ Б. Н. Степаненко, Е. М. Афанасьева, Биохимия, 14, 317 (1949).
- ⁸ К. Меуер, J. Phys. Coll. Chem., 53, 319 (1949).
- ⁹ Б. Н. Степаненко, Е. Л. Розенфельд, А. Н. Петрова, Усп. совр. биол., 32, в. 2 (5), 193 (1951).
- ¹⁰ A. Potter, W. Hassid, J. Am. Chem. Soc., 70, 3488, 3774 (1948).