

А. М. КУЗИН, Г. А. ГАРЗУНОВА и Я. В. МАМУЛЬ

ОБ УЧАСТИИ КОМПЛЕКСНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ В УГЛЕВОДНОМ ОБМЕНЕ

(Представлено академиком А. И. Опариным 10 VII 1953)

За последние годы появилось значительное число работ, указывающих на физиологическую активность различных комплексных полисахаридов (1). На эти полисахариды не действуют ферменты типа амилаз или фосфорилаз, и потому вопрос участия этих соединений в общем углеводном обмене совершенно неясен. Непосредственное изучение обмена этих веществ весьма затруднено вследствие того, что они обычно находятся в тканях в очень небольших количествах.

Нам казалось небезынтересным попытаться подойти к этому вопросу с использованием метода меченых атомов. Действительно, если интересующие нас вещества принимают участие в общем обмене углеводов, то введение в организм глюкозы, меченой C^{14} по всей углеродной цепи, должно иметь следствием появление радиоактивности у названных соединений. Интенсивность этого внедрения должна соответствовать интенсивности обмена указанных веществ в данном органе. С этой целью и были предприняты приводимые ниже эксперименты.

Экспериментальная часть

1. Глюкоза, меченая по всей углеродной цепи C^{14} , была получена путем фотосинтеза. Трижды перекристаллизованная глюкоза имела активность 2100 имп/мин · мг при измерении на торцовом счетчике на расстоянии 1 мм от окна счетчика.

2. Белой крысе весом в 76 г под уретановым наркозом было введено интравенозно в *v. jugularis externa* 340 мг радиоактивной глюкозы, растворенной в 1,5 мл воды. Через каждые 20 мин. из хвостовой вены бралась кровь в количестве

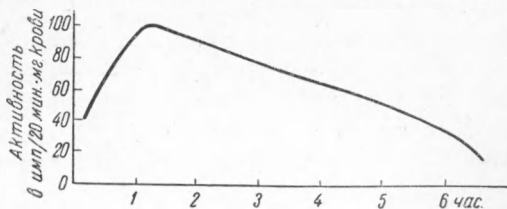


Рис. 1. Активность крови, взятой из хвостовой вены в течение опыта

2—4 мг, распределялась на стандартную площадь счетных тарелочек, высушивалась, взвешивалась и ее активность определялась на торцовом счетчике. Полученные данные представлены на рис. 1.

По прошествии 6,5 час. от начала эксперимента, когда в крови обнаруживалось лишь $1/5$ максимальной активности, крыса была декапитирована. Все внутренние органы крысы тотчас помещались в смесь сухого ацетона с твердой CO_2 . Ацетон многократно сменялся в течение 3 суток, чем достигалось полное высушивание ткани. Высушенные органы и ткани растирались до порошкообразного состояния, после чего подвергались длительной экстракции серным эфиром. После удаления эфиром липои-

дов, ткани высушивались в вакуум-эксикаторе до постоянного веса, определялся общий вес полученной ткани и ее активность. Для определения активности навески тщательно растертой ткани (2—3 мг) распределялись равномерно на дисках диаметром 1 см и измерялись в течение 20 мин. на торцовом счетчике на расстоянии 1 мм от окна счетчика. Определения проводились с 3 навесками и полученные средние величины после вычета фона и перерасчета на 1 мг умножались на число миллиграммов данной ткани (см. табл. 1).

Так как нас интересовало внедрение глюкозы (или ее продуктов распада) в высокомолекулярные компоненты ткани, то для удаления свободной глюкозы и ее низкомолекулярных метаболитов исследуемые ткани подвергались экстракции 80% этиловым спиртом до полноты извлечения веществ, обладающих радиоактивностью (6 повторных экстракций). После извлечения 80% спиртом ткани вновь высушивались и снова определялась их радиоактивность. Разность могла быть отнесена за счет свободной глюкозы и ее низкомолекулярных метаболитов.

Таблица 1

Исследуемый орган	Кол-во, сухой обезжир. ткани, взятой в опыт	Суммарная активн. в имп/мин на общий вес ткани	Активн. 100 мг данной ткани в имп/мин
Кровь	270	1377	510
Мозг	90	747	830
Печень	640	5120	800
Кишечник	410	4879	1190
Селезенка	80	800	1000
Легкие	100	580	580
Почки	130	1404	1080
Сердце	50	235	470
Мышцы	1050	3255	310

Материал, не извлекаемый 80% этиловым спиртом, суспендировался в ацетатном буфере при pH 5 и обрабатывался при 37° в течение 4 час. препаратом амилазы, выделенной из солода, для разрушения гликогена. По истечении этого времени нерастворившаяся часть была отделена центрифугированием и многократно извлекалась 80% этиловым спиртом, после чего высушивалась в вакуум-эксикаторе и определялась ее радиоактивность. Разность относилась за счет гликогена. Остаток многократно экстрагировался 4% трихлоруксусной кислотой при 0°. Нерастворившаяся часть отделялась от экстракта центрифугированием и промывалась 96% спиртом. После высушивания в вакуум-эксикаторе определялась ее активность. Разность можно было отнести за счет комплексных полисахаридов, извлекаемых из тканей этим методом. Оставшийся белок подвергался гидролизу 1 M HCl в течение 4 час. Негидролизовавшиеся белки удалены. Активность гидролизата отражает интенсивность внедрения углерода глюкозы в глюकोпротеиды. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Как видно из данных табл. 2, основная масса углерода введенной глюкозы во всех органах обнаружена в виде низкомолекулярных соединений

Таблица 2

Исследуемый орган	Общая активн.	Активность в % от общей (имп/мин)				
		своб. глюк.	гликоген	компл. полисахариды	легкогидр. часть белков	в белк. трудно гидр. (по разности)
Кровь	1377	35,0	5,0	6,1	53,0	0,9
Мозг	747	81,8	2,9	1,3	14,0	0
Печень	5120	60,7	7,4	0,5	25,7	6,0
Кишечник	4879	58,9	18,6	2,9	19,0	0,6
Селезенка	800	70,2	4,2	9,8	12,0	3,8
Легкие	580	57,0	0,2	0	39,0	3,8
Почки	1404	78,5	2,8	3,1	14,2	1,4
Сердце	235	55,7	15,6	4,7	24,1	0
Мышцы	3255	73,4	17,0	0,09	8,8	0,71

нений (от 35 до 82%). Эта фракция, повидимому, содержит и глюкозу распавшегося гликогена за время, потраченное для выделения внутренних органов крысы. После удаления низкомолекулярных метаболитов и нераспавшегося гликогена ткани обладают значительной радиоактивностью. За 6 час. опыта углерод введенной глюкозы внедрился в комплексные полисахариды. Как видно из табл. 2, включение C^{14} глюкозы в высокомолекулярные соединения наиболее интенсивно прошло в кишечнике, в селезенке и крови, т. е. тканях, наиболее богатых комплексными полисахаридами. Такие ткани, как мышцы, содержат значительно меньше комплексных полисахаридов и, соответственно, имеют наименьшую активность. Значительно более интенсивно идет внедрение углерода глюкозы в глюкпротеиды. Это особенно характерно для крови, где 53% всей активности падает на эту фракцию.

3. Для обнаружения обмена углерода введенной глюкозы с глюкпротеидами костной ткани, богатой, как известно, хондроитин-серной кислотой, исследовалась большая берцовая кость опытной крысы. Берцовая кость отделялась от мышцы, фиксировалась 20% раствором формалина в течение 36 час., декальцинировалась в течение 24 час. в 5% азотной кислоте, после чего в течение 2 дней промыва-

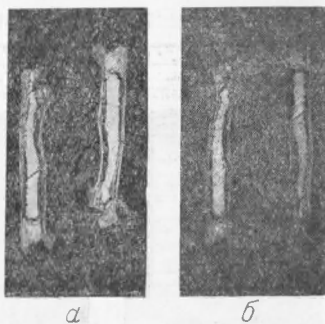


Рис. 2. Радиоавтографы срезов кости

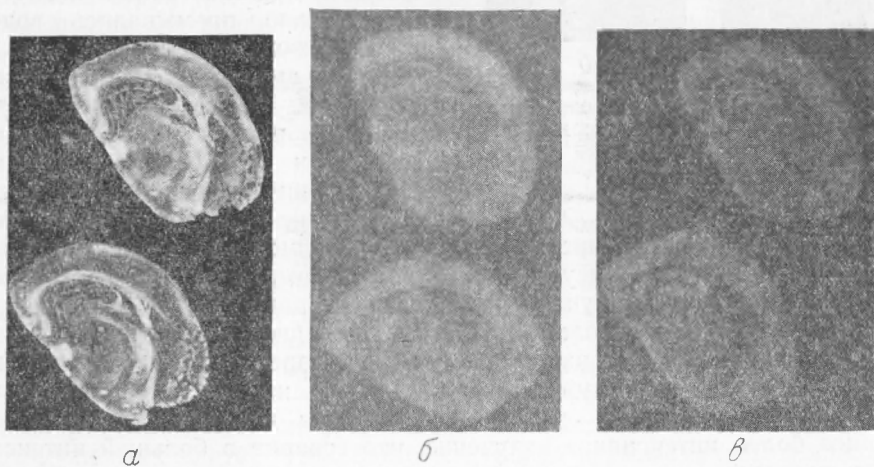


Рис. 3. а — фотография срезов мозга крысы, взятых для радиоавтографии; б — радиоавтографии со срезов; в — радиоавтографии срезов после обработки их амилазой

лась в проточной воде. Такая обработка гарантировала удаление всех низкомолекулярных радиоактивных веществ. Декальцинированная кость обезжировалась проведением через спирты восходящей концентрации. Из смеси абсолютного спирта с эфиром (1:1) кость помещалась на 10 дней в 2% целлоидин, затем в хлороформ, а после хлороформа — в смесь парафина с хлороформом (при 37°) и, наконец, в чистый парафин. Срезы толщиной в 10μ получены на микротоме. Продольный срез освобождался от парафина ксилолом, покрывался целлоидиновой пленкой в 1μ толщиной и поступал на контактную радиоавтографию (безэкранный рентгеновский пленка, чувствительность 34 г^{-1} , срок экспозиции 30 дней). Полученный радиоавтограф представлен на рис. 2. Как видно из рис. 2,

углерод введенной глюкозы за 6 час. опыта значительно внедрился в высокомолекулярные соединения кости.

4. Как мы уже сообщали ранее ⁽²⁾, ткань головного мозга весьма богата высокомолекулярными соединениями, содержащими глюкозамин, причем серое вещество коры содержит их почти в 2 раза больше, чем белое вещество. Представлялось интересным сравнить интенсивность внедрения углерода глюкозы в эти соединения в сером и белом веществе мозга. Так как препаративное отделение серого вещества от белого в мозгу крысы представляет значительные трудности, нами для выяснения этого вопроса был избран метод радиоавтографии. Для этой цели одна половина мозга подопытной крысы тотчас по извлечении фиксировалась 96% спиртом, содержащим 2,7% азотной кислоты и 10% формалина ⁽³⁾. После проведения через чистый 96% этиловый спирт, абсолютный спирт + бензол и чистый бензол препарат был переведен в парафин и получены срезы 5 μ толщиной. Наклеенные на стекло срезы освобождались от парафина, проводились через батарею спиртов нисходящей концентрации, после чего тщательно промывались водой. Часть срезов обработана при 37° раствором амилазы солода. После тщательной промывки водой, что исключало присутствие в препарате глюкозы и ее низкомолекулярных радиоактивных метаболитов, срезы окрашивались эозином + гематоксилином и вновь обезвоживались спиртами восходящей концентрации. После обработки ксилолом и высушивания срезы покрывались тонкой пленкой (1 μ) целлоидина и поступали на контактную радиоавтографию (рентгеновская мелкозернистая пленка, экспозиция 60 дней, в камере над хлористым кальцием). Полученные радиоавтографы представлены на рис. 3 и 4.

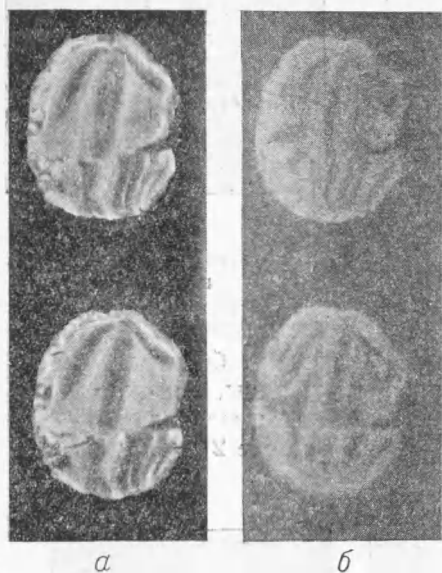


Рис. 4. *а* — фотография срезов, взятых для радиоавтографии; *б* — радиоавтография срезов после обработки их амилазой

Как видно из радиоавтографов рис. 3 и 4, наряду со слабой радиоактивностью всей ткани отчетливо выделяется серое вещество мозга, дающее более интенсивное излучение, что говорит о большей интенсивности процессов внедрения углерода глюкозы в высокомолекулярные соединения коры головного мозга. Это явление можно наблюдать и на срезах до обработки амилазой, а также на срезах, подвергшихся такой обработке. Последнее обстоятельство указывает на внедрение углерода глюкозы в комплексные полисахариды или глюкотеины мозга.

На основании проведенных исследований мы приходим к выводу, что углерод свободной глюкозы интенсивно внедряется в состав комплексных полисахаридов и глюкотеинов тканей, включая и костную ткань. Этот процесс идет интенсивнее в сером веществе мозга по сравнению с белым.

Лаборатория изотопов Института биофизики
Академии наук СССР

Поступило
11 VI 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ А. М. Кузин, Усп. биол. хим., 2 (1953). ² А. М. Кузин, Г. А. Гарзукова, ДАН, 87, № 5 (1952). ³ А. Л. Шабаташ, Гистохимия гликогена нормальной нервной системы, 1949.