

Б. Н. СТЕПАНЕНКО и А. С. КАЙНОВА

## ИЗУЧЕНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ГЛИКОГЕНОВ

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 28 I 1954)

В ранее опубликованном исследовании <sup>(1)</sup> мы (совместно с А. Н. Петровой) разработали метод препаративного получения гликогенов путем ферментативного синтеза *in vitro* при помощи двух мышечных ферментов: фосфорилазы и фермента ИА (изомеразы амилозы) и получили ряд препаратов синтетических гликогенов.

Большой интерес представляло их изучение, поскольку синтетические гликогены никогда ранее не изучались (в отличие от синтетических амилоз), тогда как их исследование и сравнение с «природными» гликогенами могло бы служить серьезной проверкой наших современных знаний о биосинтезе гликогена.

Мы исследовали четыре синтетических препарата гликогена (№№ 1—4) и для сравнения два природных, служивших при синтезе в качестве затравки <sup>(1)</sup>. Из синтетических гликогенов три препарата (№№ 1—3) были получены по первому варианту нашего метода. Ход синтеза указанных выше препаратов синтетических гликогенов имел, кроме того, следующие особенности. При синтезе препарата № 1 (выделенного в количестве 500 мг) фермент ИА действовал сравнительно медленно (повидимому, в связи с сезонным понижением активности) и синтез его продолжался 32 часа (вместо обычных 16 час. и менее). При получении препарата № 2 (выделенного в количестве 300 мг) ИА действовала несколько активнее, но синтез продолжался также 32 часа. Синтез препарата № 3 (выделенного в количестве 340 мг) характеризовался большой активностью ИА и продолжался 16 час.

Препарат № 4 был получен по второму варианту метода, путем систематического «выращивания» затравки в течение нескольких (четырех) циклов (выделен в количестве 450 мг).

Все препараты (синтетические и природные — затравочные) после соответствующей очистки были проанализированы на содержание полисахарида, влаги, фосфора и азота.

Синтетические препараты содержали 89—93,4% полисахарида, 4—6,2% воды, менее 0,1% фосфора, около 0,1% азота. По всем аналитическим данным препараты синтетических гликогенов были близки к природным, отличаясь лишь несколько большим, указанным выше, количеством азота.

Исследования гликогенов состояли из: 1) определения молекулярных весов; 2) определения расщепляемости  $\beta$ -амилазой; 3) снятия кривых абсорбции соединений гликогенов с иодом; 4) определения «единицы цепи» — величины, обратной «степени ветвления» <sup>(2)</sup>.

Определение молекулярных весов гликогенов проводилось по методу Мейера <sup>(3)</sup> (уже применявшемуся для определения молекулярных весов гликогенов <sup>(4)</sup>), а также по новому методу. Метод Мейера мы несколько изменили путем использования всей жидкости для фотометрирования и другими приемами, что дало возможность брать на

вески гликогенов для определения молекулярного веса порядка 120—160 мг (вместо 200—250 мг). Результаты, полученные на ряде природных гликогенов при помощи нашей модификации метода Мейера и одновременно по оригинальной методике Мейера, дали хорошее совпадение.

Таблица 1

Результаты определения молекулярных весов природных и синтетических гликогенов

| Препарат гликогена                             | Молекулярный вес |                  |
|------------------------------------------------|------------------|------------------|
|                                                | по методу Мейера | по новому методу |
| Печени кролика от 20 III 1952 г. . . . .       | 217 000          | 230 000          |
| То же от 1 XI 1951 г. . .                      | 273 000          | 273 000          |
| „ от 5 IV 1951 г. (затравка № 1) . . . . .     | 461 000          | 509 000          |
| Мышц кролика от 10 VI 1951 г. (затравка № 2) . | 189 000          | 153 000          |
| Синтетический № 1 . . .                        | 177 000          | 206 000          |
| „ № 2 . . .                                    | —                | 108 000          |
| „ № 3 . . .                                    | —                | 304 000          |
| „ № 4 . . .                                    | 227 000          | 220 000          |

дуцирующей способности малых количеств мальтозы нам пришлось составить таблицу, подобную используемой при методе Хагедорна — Иенсена для глюкозы). Новый метод дал нам возможность брать для определения молекулярного веса гликогена навески 30—50 мг и заменить фотометрирование, применяемое К. Мейером, титрованием.

В табл. 1 мы приводим значения молекулярных весов синтетических и некоторых природных, в том числе «затравочных» гликогенов, полученных по методу Мейера и по новому методу.

Величины молекулярных весов, найденные по методу Мейера и новому методу, достаточно близки, особенно принимая во внимание обычные большие колебания этих значений при определении молекулярных весов высокополимеров различными методами. Из таблицы следует также, что молекулярные веса синтетических гликогенов и природных являются величинами одного порядка.

Определение расщепляемости синтетических гликогенов  $\beta$ -амилазой. Необходимую

для работы  $\beta$ -амилазу мы получили из соевой муки (5). Фермент очищали от  $\alpha$ -амилазы и в течение 7—10 дней проверяли на отсутствие  $\alpha$ -амилазы, после чего применяли в опытах. Определение расщепляемости гликогенов производилось при применении 1% растворов этих полисахаридов в ацетатном буфере. Во всех случаях повторными пробами устанавливалась полнота расщепления. Результаты определения расщепляемости синтетических и затравочных гликогенов представлены в табл. 2. Как видно из таблицы, расщепляемость синтетических гликогенов  $\beta$ -амилазой очень близка к таковой природных гликогенов.

Принцип нового метода, примененного нами (наряду с модификацией метода Мейера) для определения молекулярных весов гликогена заключался в окислении гликогена (имеющего 1 альдегидную группу на молекулу) красной кровяной солью в условиях, аналогичных определению глюкозы по Хагедорну и Иенсену.

Восстанавливающая способность гликогена сравнивалась с восстанавливающей способностью мальтозы, которая рассматривалась как низкомолекулярный гомолог гликогена с коэффициентом полимеризации 2 (естественно, что для определения ре-

Таблица 2

Расщепляемость синтетических и затравочных гликогенов  $\beta$ -амилазой

| Препарат гликогена | Расщепляемость $\beta$ -амилазой (в %) |                |
|--------------------|----------------------------------------|----------------|
|                    | I определение                          | II определение |
| Синтетический № 1  | 36,3                                   | 38,4           |
| „ № 2              | 34,1                                   | 34,6           |
| „ № 3              | 39,9                                   | 38,0           |
| „ № 4              | 37,6                                   | 38,9           |
| „ Затравочный № 1  | 37,1                                   | 38,0           |
| „ № 2              | 39,9                                   | 39,7           |

Абсорбционные кривые соединений с иодом синтетических и «затравочных» гликогенов снимались по (6).

Для сравнения снималась также кривая соединения картофельного амилопектина с иодом. В табл. 3 приведены основные данные, характеризующие полученные кривые, а на рис. 1 — кривые синтетических иодгликогенов №№ 2 и 3 в сравнении с затравочными гликогенами и с иодамилопектином.

Как видно из приведенных данных, по единице цепи синтетические гликогены близки природным и существенно отличаются от амилопектинов. Сопоставление иодных кривых с данными о строении синтетических гликогенов (см. ниже) дают новый материал о связи иодной реакции со строением полисахаридов типа гликогена (эти данные будут опубликованы в другом месте).

Определение единицы цепи синтетических и «затравочных» гликогенов (т. е. определение соотношения общего числа глюкозных остатков в молекуле к числу концевых неальдегидных групп) проводилось методом периодатного окисления по (7). В табл. 4 приведены полученные результаты.

Как видно из данных табл. 4, так же как и из предыдущих, синтетические гликогены близки природным гликогенам кролика.

Полученные данные дали нам возможность рассчитать среднюю длину наружных ветвей молекул синтетических гликогенов, среднюю длину внутренних ветвей и «сконструировать» схемы строения «средних молекул» полученных гликогенов, подобно тому как это сделано одним из нас в работе с Е. М. Афанасьевой (4). Сравнение строения синтетических гликогенов с исходными затравочными и между собой показывает, что

наиболее близким природному затравочному гликогену, практически тождественным ему, является синтетический гликоген № 3.

Синтетический гликоген № 1 по единице цепи несколько сходен с амилопектинами, хотя все же остается гликогеном: он сходен с гликогенами по другим признакам; кроме того, известны природные гликогены, полученные от животных при особых режимах питания с единицей цепи 19—23 (8).

Синтетические гликогены №№ 1 и 2 очень интересны тем, что их средние внутренние цепи равны или даже несколько длиннее наружных.

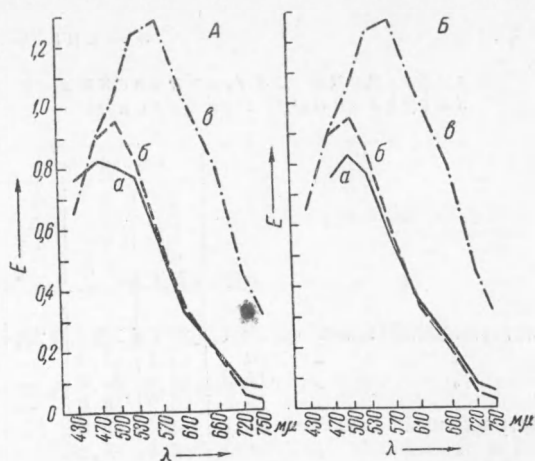


Рис. 1. Абсорбционные кривые: А — препарат № 2; Б — препарат № 3. а — синтетический гликоген, б — гликоген затравки, в — амилопектин с иодом

Таблица 3

Характеристика абсорбционных кривых соединений с иодом синтетических и затравочных гликогенов и амилопектинов

| Соединение с иодом           |     | Положение абсорбционного максимума, в мμ | Экстинкция в точке максимума |
|------------------------------|-----|------------------------------------------|------------------------------|
| Синтетического гликогена № 1 | № 2 | 530                                      | 1,00                         |
|                              | № 3 | 500                                      | 0,80                         |
|                              | № 4 | 500                                      | 0,82                         |
|                              | № 5 | 530                                      | 0,86                         |
| Затравочного гликогена       | № 1 | 500                                      | 0,95                         |
|                              | № 2 | 500                                      | 0,70                         |
| Амилопектина . . . . .       |     | 570                                      | 1,30                         |

Природные гликогены с такими особенностями строения не были известны. Гликогены №№ 1 и 2 по типу строения приближаются к  $\beta$ -декстринам

Таблица 4

Единица цепи синтетических и затравочных гликогенов

| Препарат               |     | Единица цепи  |                |                 |
|------------------------|-----|---------------|----------------|-----------------|
|                        |     | I определение | II определение | III определение |
| Синтетический гликоген | № 1 | 23            | 22             | 22,4            |
| "                      | № 2 | 17,1          | 17,3           | —               |
| "                      | № 3 | 15,6          | 16,2           | —               |
| "                      | № 4 | 16,9          | 16,6           | —               |
| „Затравочный“ гликоген | № 1 | 15,4          | 15,0           | 15,4            |
| "                      | № 2 | 12,4          | 12,8           | —               |

родным (гликоген № 3), так и немного отличающиеся от них и несколько приближающиеся к амилопектинам (гликоген № 1), а также гликогены с несколько укороченными наружными ветвями — типа  $\beta$ -декстринов (или ф-декстринов).

или ф-декстринам (полученным при действии фосфорилазы) с несколько укороченными или «недостроенными» наружными ветвями.

Отмеченные особенности строения синтетических гликогенов обусловлены упомянутыми особенностями хода их синтеза (стр. 1263).

Таким образом, изменяя соотношение активностей ферментов и другие условия (например, продолжительность синтеза), мы смогли получить *in vitro* синтетические гликогены как практически тождественные при-

Поступило  
27 I 1954

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> А. С. Кайнова, Б. Н. Степаненко, А. Н. Петрова, ДАН, **95**, № 5 (1954).
- <sup>2</sup> Б. Н. Степаненко, А. Н. Петрова, Е. Л. Розенфельд, А. В. Котельникова, Усп. совр. биол., **32**, в. 2 (5), 193 (1951).
- <sup>3</sup> К. Meyer, J. Phys. Coll. Chem., **53**, 319 (1949).
- <sup>4</sup> Б. Н. Степаненко, Е. М. Афанасьева, ДАН, **90**, 1095 (1953).
- <sup>5</sup> E. J. Bourne, F. Reat, J. Chem. Soc. **1945**, 879, 1949, 1712.
- <sup>6</sup> Б. Н. Степаненко, Е. М. Афанасьева, Биохимия, **12**, 111 (1947).
- <sup>7</sup> A. Potter, W. Z. Hassid, J. Am. Chem. Soc., **70**, 3488, 3774 (1948).
- <sup>8</sup> M. Schlamowitz, J. Biol. Chem., **190**, 519 (1951).