Доклады Академии наук СССР
1955. Том 100, № 3

*БИОХИМИЯ*

Б. Н. СТЕПАНЕНКО, Г. В. ЗУБРИЛИНА и Л. П. ХАЮРОВА

# ИЗУЧЕНИЕ ОБМЕНА ГЛИКОГЕНА В НОРМЕ И ПРИ АЛЛОКСАНОВОМ ДИАБЕТЕ ПРИ ПОМОЩИ РАДИОАКТИВНОГО УГЛЕРОДА

(*Представлено академиком А. И. Опариным 2 IX 1954*)

В опытах 1951—1952 гг. с применением дейтерия одним из нас (совместно с Н. И. Виноградовой) было показано *, что адреналин, введенный голодному животному, сильно стимулирует синтез углеродной цепи глюкозных остатков гликогена печени. Было также показано, что синтез углеродной цепи глюкозных остатков в печени протекает с гораздо большей интенсивностью, чем в мышцах. При этом различий в интенсивности обмена в наружных и внутренних частях молекул гликогена в условиях опытов обнаружить не удалось, и вопрос о биологической роли своеобразного химического строения гликогена оставался все еще не ясным. Для разрешения последнего вопроса, а также для изучения обмена гликогена при диабете гораздо более удобной (по сравнению с работой с дейтерием) является работа с радиоактивным углеродом.

Изучение обмена гликогена при помощи $C^{14}$ у нормальных животных. Крысам весом 200—300 г после голодания в течение различных промежутков времени (3—24 часа) вводилось подкожно около 1 мл раствора $NaHC^{14}O_3$ из расчета 4 μк на 100 г веса. Одновременно с этим некоторым животным (опытным) вводился раствор адреналина 1 : 5000 из расчета 0,1 мл на 100 г веса; контрольным животным адреналин не вводился. По истечении 3 час. как опытные, так и контрольные животные убивались и из печени их выделялся гликоген. После очистки 2—3-кратным переосаждением гликогены высушивались и определялась их активность. После определения активности гликогены расщеплялись β-амилазой, тщательно очищенной от α-амилазы и мальтазы. Расщепление достигало обычно 40—48%. По завершении β-амилолиза β-декстрины выделялись и очищались переосаждением спиртом. Активность β-декстринов определялась так же, как и у исходных гликогенов.

Мы не считали необходимым сжигать гликогены и β-декстрины и переводить содержащийся в них углерод в $BaCO_3$ (как обычно поступают при определении радиоактивности органических веществ), так как принятая нами методика давала перед общепринятой ряд важных преимуществ: 1) при переведении углерода гликогена в $BaCO_3$ мы получали бы для определения радиоактивности препараты гораздо меньшей удельной активности, так как углерод в $BaCO_3$ составляет 6%, тогда как содержание его в гликогене составляет 44%; 2) после

* Результаты этих опытов были доложены Б. Н. Степаненко 23 IV 1953 г. на Всесоюзном совещании об итогах работы по проблеме «Промежуточный обмен веществ», проведенном в биологической секции Ученого совета при Президенте АН СССР 22—24 IV 1953 г.

определения активности выделенного гликогена мы могли целиком подвергнуть его расщеплению β-амилазой, тогда как при применении обычной методики это было бы невозможно и мы должны были бы для тех же определений иметь гораздо бóльшие количества гликогена. В то же время сравнение активностей гликогенов (без перевеления в $BaCO_3$) при применении одинаковых навесок или же сравнение удельных активностей гликогенов (в случае отсутствия заметного самопоглощения) могло дать вполне сопоставимые результаты.

Таблица 1

Радиоактивность различных препаратов гликогена, полученных после введения адреналина и без него у опытных (О) и контрольных (К) животных

| | Число крыс | Длительн. голодания в час. | Вес выдел. гликогена в мг | Активн. 10 мг гликогена в имп/мин. за вычетом фона |
|---|---|---|---|---|
| О | 2 | 24 | 48 | 200 |
| О | 2 | 24 | 23,9 | 820 |
| О | 2 | 24 | 4,0 | 30 |
| К | 2 | 24 | следы, не подд. выдел. | — |
| О | 3 | 24 | 4,8 | 610 |
| К | 2 | 24 | 11,4 | не активн. |
| О | 1 | 12 | 24,6 | 100 |
| К | 3 | 12 | следы, не подд. выдел. | — |
| О | 3 | 12 | 4 | 610 |
| К | 3 | 12 | следы, не подд. выдел. | — |
| О | 2 | 6 | 25,5 | 30 |
| К | 2 | 6 | 10 | не активн. |
| О | 3 | 6 | 5 | 50 |
| К | 3 | 6 | 5 | не активн. |
| О | 2 | 3 | 5 | 40 |
| К | 3 | 3 | 180 | не активн. |
| О | 3 | 3 | 5 | 30 |
| К | 2 | 3 | 4 | не активн. |

Определение активности мы производили при помощи торцовых счетчиков и установки типа Б при фоне 10—16 имп/мин. Обычно применялись навески препаратов гликогенов и β-декстринов в 5 мг. Выделение гликогенов производилось по Остерну, путем экстрагирования трихлоруксусной кислотой, что делало очень мало вероятным наличие в гликогене примеси радиоактивного бикарбоната (быть может, принесенного в печень током крови). Однако с целью проверки отсутствия этой примеси мы все же в некоторых опытах после определения удельной активности растворяли гликоген в 10% растворе трихлоруксусной кислоты, пропускали через раствор очищенный воздух в течение 3—4 час., а затем вновь выделяли гликоген и определяли его удельную активность. Совпадение активностей давало уверенность в том, что гликоген не был загрязнен радиоактивным бикарбонатом.

Самопоглощение гликогенов было проверено нами путем измерения различных навесок радиоактивного гликогена — от 1 до 10 мг, причем была обнаружена строгая пропорциональность между активностью навески и ее весом. Это давало нам возможность при навесках до 10 мг не учитывать самопоглощения. Сравнение активностей гликогенов и полученных из них β-декстринов давало возможность судить об интенсивности синтеза в центральных и периферических частях молекулы.

Как видно из табл. 1, адреналин, так же как это было показано в опытах с дейтерием, существенно способствует синтезу углеродной цепи глюкозы в гликогене: без введения адреналина после голодания в течение 24—12 час. гликогена печени обычно выделить не удается, тогда как в случае введения адреналина даже после такого длительного голодания гликоген, по крайней мере в ряде случаев, можно выделить. Особенно важно, что гликоген, выделяемый после введения адреналина, оказывается в той или иной степени радиоактивным, что

свидетельствует о включении в него углерода из $NaHC^{14}O_3$ вследствие синтеза углеродной цепи глюкозных остатков. При более коротких периодах голодания (6—3 часа) не только в основных, но и в контрольных опытах (без введения адреналина) удается выделить печеночный гликоген, однако он, как правило, оказывается нерадиоактивным; в отличие от этого гликогены, полученные после введения адреналина, оказываются радиоактивными.

Как видно из таблицы, обычно чем больший период времени голодает животное, тем большей активностью обладают его гликогены, и наоборот. Это явление вполне понятно, так как у животного, голодающего длительный период времени, синтезированный под влиянием адреналина гликоген образуется в печени, практически свободной от гликогена, тогда как при непродолжительном голодании вновь синтезированный радиоактивный гликоген «разбавляется» ранее содержавшимся в печени нерадиоактивным гликогеном.

Результаты изучения радиоактивности гликогенов и полученных из них β-декстринов представлены в табл. 2.

Таблица 2

Радиоактивность препаратов гликогенов (г) и их β-декстринов (д)

| №№ препаратов | Длительн. голодания в час. | Активн. 10 мг полисахарида в имп/мин. за вычетом фона | Расщепляемость β-амилазой в % | Вычисл. активн. 10 мг наружн. частей молекул гликогена в имп/мин | Отношн. уд. активн. наружн. частей молекул к уд. активн. внутр. частей |
|---|---|---|---|---|---|
| 2 (г) | 24 | 200 | 42 | 350 | 1,75 |
| 2 (д) | 24 | 90 | 0 | — | — |
| 6 (г) | 12 | 100 | 40 | 200 | 2 |
| 6 (д) | 12 | 30 | 0 | — | — |
| 11 (г) | 6 | 30 | 38 | 60 | 2 |
| 11 (д) | 6 | 10 | 0 | — | — |
| 12 (г) | 3 | 40 | 48 | 70 | 1,75 |
| 12 (д) | 3 | 10 | 0 | — | — |

Зная удельную активность исходных гликогенов и β-декстринов, а также расщепляемость гликогенов β-амилазой, можно вычислить удельную активность наружных частей молекул гликогена (отщепляемых амилазой). По формуле $X = \frac{100(A-a)+am}{m}$ (где $X$ — удельная активность наружных частей молекул гликогена, $A$ — активность гликогенов, $a$ — активность β-декстринов и $m$ — расщепляемость гликогенов в %) мы вычислили активности наружных частей молекул гликогена, приведенные в табл. 2.

Как видно из таблицы, удельная активность наружных частей молекулы гликогена приблизительно вдвое выше таковой внутренних частей («ядер») молекул. Так как удельная активность и скорость биосинтеза углеродной цепи глюкозных остатков молекул гликогена прямо пропорциональны, то из данных табл. 2 следует, что скорость обмена (биосинтеза) в наружных частях молекул гликогена приблизительно в 2 раза больше, чем во внутренних частях молекул, т. е. сильно разветвленные ядра молекул сохраняются более длительное время, чем наружные части молекул. Этот факт интересен в связи с тем, что организм имеет в своем распоряжении мощное средство для расщепления ядер в виде α-амилазы, разрывающей цепи глюкозных остатков между точками ветвлений. Это средство, однако, в условиях опытов, повидимому, было использовано лишь в малой степени.

Биологический смысл этого может заключаться в сохранении на некоторое время каталитически высокоактивных в синтезе гликогена полисахаридов с относительно большим числом концевых глюкозных остатков, у которых, как известно, и происходит рост цепей глюкозных остатков при помощи фосфорилазы, т. е. наращивание массы синтезируемого полисахарида. При умеренной активности α-амилазы проявляется биологическое значение своеобразной структуры молекулы гликогена, имеющей в центральной части сильно ветвистое строение, недоступное действию фосфорилазы. Таким образом, обнаруженный нами более медленный (в условиях опытов вдвое медленный) обмен в «ядрах» молекул гликогена указывает на биологическое значение характерной структуры молекулы гликогена.

Изучение обмена гликогена у диабетических животных. Партия крыс (15—20) делилась на две части животные одной из которых являлись контрольными; у животных другой части вызывался диабет введением аллоксана из расчета 180—250 мг на 1 кг веса. Все животные находились на обычной диэте. В течение 3 недель после введения аллоксана производился контроль за содержанием сахара в крови.

Таблица 3

Радиоактивность препаратов гликогенов здоровых (З) и диабетических (Д) животных (после введения адреналина)

| Гликогены крыс | Число крыс | Длительн. голодания в час. | Активн. 10 мг гликогена в имп/мин. за вычетом фона |
|---|---|---|---|
| Д | 3 | 18 | следы, не подд. выдел. |
| З | 2 | 14 | 190 |
| Д | 2 | 14 | 0 |
| З | 5 | 12 | 20 |
| Д | 1 | 12 | 0 |
| З | 2 | 12 | 40 |
| Д | 2 | 12 | 0 |
| Д | 1 | 10 | 0 |
| Д | 1 | 6 | 0 |
| Д | 1 | 3 | 0 |

В опыт поступали животные, полностью оправившиеся после введения аллоксана и имевшие ясно выраженный стойкий аллоксановый диабет, характеризующийся содержанием сахара крови, в 3—4 раза превышающим нормальное его содержание. Поступающим в опыт диабетическим и нормальным животным после различных периодов голодания вводился адреналин и раствор $NaHC^{14}O_3$ в указанных выше соотношениях. Через 3 часа животные убивались, из их печени выделялся гликоген, радиоактивность которого (после очистки) определялась, как описано выше. Уже первые опыты показали, что после 24-часового голодания у диабетических животных выделить гликоген не удается, и поэтому мы обычно в этой части работы пользовались более короткими периодами голодания.

Как видно из табл. 3, в отличие от гликогенов контрольных животных, а также соответствующих гликогенов табл. 1 и 2, гликогены диабетических животных оказываются нерадиоактивными. Отсюда можно сделать заключение, что адреналин, оказывающий стимулирующее действие на синтез углеродной цепи глюкозных остатков у нормальных животных, не оказывает такого действия у диабетических животных. Таким образом, в этой части работы нам удалось установить новую характеристику диабета (как патологического состояния), заключающуюся в нарушении синтеза углеродной цепи глюкозных остатков гликогена.

Лаборатория физиологической химии
Академии наук СССР

Поступило
16 VII 1954