Approved For Release 2009/08/19 : CIA-RDP88-00904R000100120

STAT

Approved For Release 2009/08/19 : CIA-RDP88-00904R000100120

Approved For Release 2009/08/19 : CIA-RDP88-00904R000100120017-0

Вторая Международная конференция
Организации Объединенных Наций
по применению атомной энергии
в мирных целях

A/CONF.15/P/2134
USSR
ORIGINAL: RUSSIAN

Не подлежит оглашению до официального сообщения на Конференции

ПРИМЕНЕНИЕ C^{14} и N^{15} ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ В МЫШЦАХ

Д.Л. ФЕРДМАН

В развитие исследований, о результатах которых доложено было на Первой международной конференции по мирному использованию атомной энергии в Женеве в 1955 г. (1), проводилась дальнейшая работа по изучению обмена веществ в мышцах с применением радиоактивного изотопа углерода (C^{14}) и стабильного изотопа азота (N^{15}). Применение этих изотопов позволило выявить новые особенности обмена гликогена, аминокислот и глутамина в мышцах при их различных функциональных состояниях.

I. Использование ацетата для синтеза гликогена и аминокислот в мышцах кроликов при дистрофии, вызванной витамин Е-недостаточностью

В исследованиях, проведенных Д.Л.Фердманом, С.Ф.Эпштейн и С.Н.Цынкаловской с применением C^{14}, состояние витамин Е-недостаточности вызывалось у молодых кроликов г возрасте I-I,5 месяца кормлением искусственно составленным пищевым рационом, в котором отсутствовал витамин Е (2). Через 25-35 дней, в зависимости от сезона года, у кроликов развивались характерные признаки атрофии (потеря веса, общая мышечная слабость, ярко выраженная креатинурия и часто параличи конечностей). Контролем служили молодые кролики, содержавшиеся на обычном для них пищевом рационе, а также молодые кролики, потерявшие в результате голодания I8-25% своего веса. Постановка исследований на голодающих кроликах имела своей задачей выявить влияние фактора голодания, имеющего место при дистрофии, наступающей при витамин Е-недостаточности.

Кроликам нормальным, голодающим и дистрофическим вводился

25 YEAR RE-REVIEW

Approved For Release 2009/08/19 : CIA-RDP88-00904R000100120017-0

Approved For Release 2009/08/19 : CIA-RDP88-00904R000100120017-0

ацетат натрия, меченный C^{14} в карбоксильной группе ($1\text{-}C^{14}$), в расчете 30000 импульсов в минуту на 1 г веса животного. Через 1,5 часа после введения ацетата кролики обезглавливались и ткани их подвергались исследованию.

Интенсивность использования ацетата для синтеза гликогена устанавливалась по радиоактивности последнего. Измерение радиоактивности проводилось с помощью торцового счетчика на мишенях площадью 3,1 $см^2$. Гликоген тщательно освобождался переосаждением и промыванием от возможного загрязнения иными радиоактивными веществами. Об использовании ацетата для синтеза аминокислот судили по радиоактивности белков тканей. Белковый осадок ткани получали путем осаждения 10%-ным раствором трихлоруксусной кислоты. Из многократно промытого белкового осадка удалялись липиды путем экстрагирования их органическими растворителями. Белковый осадок растворялся в 0,2 н растворе NaOH, снова осаждался 10%-ным раствором трихлоруксусной кислоты. Подобная обработка освобождала белки тканей от примеси к ним иных радиоактивных веществ.

а) Радиоактивность гликогена после введения в организм кроликов $1\text{-}C^{14}$ - адетата

Содержание гликогена в скелетных мышцах кроликов при витамин Е-недостаточности, как показывают приведенные на рис.1 данные, понижается приблизительно в два раза. Еще больше снижается содержание гликогена в мышцах при голодании кроликов.

Наряду с изменением в содержании в мышцах гликогена наблюдаются также значительные изменения в его радиоактивности. Данные, приведенные на рис.1, показывают, что после введения кроликам $1\text{-}C^{14}$ - ацетата радиоактивность гликогена скелетных мышц при витамин Е-недостаточности почти в 20 раз выше, чем в норме. Она оказывается также выше у голодающих кроликов (в 12,5 раза).

При изучении содержания гликогена и его радиоактивности у голодающих кроликов в весенне-летний период обратил на себя внимание следующий факт. При содержании гликогена в мышцах, равном приблизительно 60 мг %, радиоактивность его составляла в среднем 2750 импульсов в расчете на 100 мг. При содержании же гликогена, равном в среднем 150 мг%, радиоактивность его составляла всего около 400 импульсов.

Approved For Release 2009/08/19 : CIA-RDP88-00904R000100120017-0

Approved For Release 2009/08/19 : CIA-RDP88-00904R000100120017-0

Полученные данные показывают, что использование ацетата для синтеза гликогена в скелетных мышцах кроликов при витамин Е-недостаточности происходит в значительно большем объеме, чем в скелетных мышцах нормальных кроликов. Оно оказывается в мышцах кроликов при витамин Е-недостаточности также выше, чем у голодных кроликов.

Последнее обстоятельство становится особенно наглядным при сравнении между собой данных, полученных при изучении радиоактивности гликогена мышц дистрофических кроликов и тех голодающих кроликов, у которых содержание гликогена оказывалось равным 150 мг % и, следовательно, только на 25% ниже, чем у дистрофических. Отсюда можно заключить, что при витамин Е-недостаточности, сопровождающейся дистрофией мышц, интенсивность использования ацетата для синтеза гликогена значительно выше, чем в нормальных мышцах, и что это явление можно отнести, только лишь в незначительной мере, за счет голодания, сопровождающегося снижением содержания гликогена в мышцах. Это заключение становится еще более обоснованным при рассмотрении данных, полученных при изучении содержания гликогена и его радиоактивности в сердечной мышце дистрофических, голодающих и нормальных кроликов. Эти данные, приведенные на рис.2, показывают, что содержание гликогена в сердечной мышце дистрофических кроликов только лишь незначительно ниже, чем у нормальных кроликов, и практически не отличается от содержания гликогена в сердечной мышце голодающих кроликов. Между тем радиоактивность гликогена в сердечной мышце дистрофических кроликов оказывается значительно более высокой, чем у нормальных и голодающих кроликов. У голодающих кроликов радиоактивность гликогена сердечной мышцы остается такой же, как у нормальных кроликов.

б) Радиоактивность белков после введения в организм 1-C^{14} - ацетата

В серии опытов изучалась интенсивность использования ацетата для синтеза аминокислот, входящих в состав белков мышц кроликов, при дистрофии, вызванной витамин Е-недостаточностью. Цифры, приведенные на рис.3, показывают, что радиоактивность белков, изолированных из мышц дистрофических кроликов, выше, чем у контрольных нормальных кроликов. Радиоактивность белков, изолированных из мышц голодающих кроликов, оказалась значительно ниже, чем в норме.

Approved For Release 2009/08/19 : CIA-RDP88-00904R000100120017-0

Approved For Release 2009/08/19 : CIA-RDP88-00904R000100120017-0

Полученные данные приводят к выводу о том, что в мышцах кроликов при витамин Е-недостаточности более интенсивно используется ацетат для синтеза аминокислот, входящих в состав их белков, чем в норме и при голодании.

Усиленное использование ацетата для синтеза аминокислот, входящих в состав белков, при витамин Е-недостаточности является характерным для скелетных мышц. Проведенные исследования показали, что радиоактивность белков печени и головного мозга дистрофических животных оказывается значительно сниженной.

в) Интенсивность использования ацетата для синтеза гликогена в денервированных мышцах кроликов

Исследования были проведены на молодых кроликах весом 900-1000 г. Денервирование мышц проводилось путем перерезки седалищного нерва. Через различные сроки после операции перерезки нерва (14-17 дней и 25-32 дня) вводился 1-C^{14} - ацетат в расчете 30000 импульсов в минуту на 1 г веса животного; через три часа кролики декапитировались, и из икроножной мышцы изолировался гликоген, радиоактивность которого устанавливалась с помощью торцового счетчика.

Полученные данные, представленные на рис.4, показывают, что, уже начиная с 14-17 дней после операции перерезки нервов, радиоактивность гликогена мышц после введения в организм 1-C^{14} ацетата значительно возрастает. Подобное явление имеет место и в более поздние сроки после операции перерезки нерва.

Следует отметить, что у молодых кроликов денервирование не приводит к существенному изменению в содержании гликогена в икроножной мышце, и поэтому установленное увеличение радиоактивности гликогена не стоит в какой-либо зависимости от его содержания в мышцах.

При сравнении между собой данных, полученных при изучении степени использования ацетата для синтеза гликогена в мышцах кроликов при дистрофии, вызванной витамин Е-недостаточностью, и при атрофии, вызванной перерезкой двигательного нерва, можно видеть, что в обоих случаях она оказывается повышенной по сравнению с нормой. Тут выявляется различие только количественного характера: интенсивность использования ацетата для обновления гликогена при

Approved For Release 2009/08/19 : CIA-RDP88-00904R000100120017-0

Approved For Release 2009/08/19 : CIA-RDP88-00904R000100120017-0

дистрофии мышц оказывается значительно большей, чем при атрофии.

Полученные данные по изучению интенсивности использования ацетата для обновления гликогена мышц при дистрофии, вызванной витамин Е-недостаточностью и денервацией, находятся в соответствии с выводом, сделанным на основании данных, полученных при изучении обмена фосфорных соединений, и включения S^{35}- метионина в белки мышц (I), что при изменениях, наступающих в мышцах при дистрофии и атрофии, приводящих к уменьшению массы мышечных волокон, в оставшейся части мышечных волокон, не подвергшихся еще глубоким изменениям, усилены процессы обмена веществ.

II. Использование глицина для синтеза гликогена в мышцах

В серии опытов изучалась радиоактивность гликогена при введении в организм кроликов глицина, меченного в карбоксиле радиоактивным углеродом (1-C^{14}-глицин). 1-C^{14}-глицин вводился в организм кроликов нормальных, при витамин Е-недостаточности и при голодании в расчете 30000 импульсов в минуту на 1 г веса.

Как известно (3), глицин подвергается разнообразным превращениям в организме, причем его углерод в известной мере может быть использован для синтеза глюкозы, а из нее-гликогена. При введении в организм животного меченого глицина можно по радиоактивности гликогена судить об использовании его для синтеза гликогена.

Полученные данные приведены на рис.5 . Они показывают, что радиоактивность гликогена после введения в организм 1-C^{14}-глицина, скелетных мышц и сердечной мышцы кроликов при витамин Е-недостаточности выше, чем в норме и при голодании. Эти данные показывают,что при витамин Е-недостаточности, подобно тому как это установлено для 1-C^{14}-ацетата, использование углерода глицина для синтеза гликогена происходит значительно более интенсивно, чем в норме и при голодании.

Введенный в организм глицин в известной своей части используется для синтеза белков. По радиоактивности белков после введения в организм 1-C^{14} - глицина можно судить об интенсивности включения глицина в белки. Данные, приведенные на рис.6, показывают, что после введения 1-C^{14} - глицина радиоактивность белков мышц кроликов при витамин Е-недостаточности значительно выше, чем в норме.

Approved For Release 2009/08/19 : CIA-RDP88-00904R000100120017-0

Approved For Release 2009/08/19 : CIA-RDP88-00904R000100120017-0

Ш. Изучение превращения глутамина в мышцах с помощью стабильного изотопа азота

Обнаружение в тканях животных глутамина и изолирование его в кристаллическом виде (4) выдвинуло к изучению ряд вопросов, касающихся его роли в обмене веществ в мышцах (5). Было установлено, что в мышечной ткани происходит устранение аммиака с образованием глутамина (6). С другой стороны, было показано, что в мышечной ткани используется амидный азот глутамина для синтеза иных азотистых соединений без предварительного образования аммиака (7). Наряду с этим глутамин, как было установлено, может также явиться в мышцах источником образования аммиака в результате воздействия на него глутаминазы (8).

Для более детального изучения роли глутамина в процессах обмена веществ в мышцах были проведены исследования, в которых изучалась интенсивность обновления амидного азота глутамина путем введения в организм аммиачной соли, меченной стабильным изотопом азота (N^{15}) (Д.Л.Фердман и А.И.Силакова).

Опыты проводились на голубях и на кроликах, которым вводили внутривенно или внутримышечно на 100 г веса тела 11,5 мг и в отдельных опытах - 30-40 мг аммиачного азота азотнокислого аммония ($N^{15}H_4NO_3$), избыток N^{15} в котором составлял около 10 атом.%. Введение аммиачной соли производилось отдельными порциями в три интервала в 30-35 мин., так что от момента первого введения до декапитирования животного проходило в среднем 1 час 40 мин. После удаления крови и соединительной ткани мышцы тщательно охлаждались и измельчались и из них добавлением 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты получали безбелковый экстракт. В этом экстракте количественно определяли содержание аммиака, амидного азота глутамина и небелкового азота. Амидный азот, входящий в состав белков мышц, определялся в отдельных навесках мышечной ткани. Для этой цели белки осаждались 10%-ным раствором трихлоруксусной кислоты с последующим тщательным промыванием белкового осадка той же кислотой.

Общий азот определяли в отдельных навесках мышечной ткани.

Для изотопного анализа приготовлялись пробы хлористого аммония, соответствующие приведенным выше азотистым веществам и фракциям азотистых веществ.

Approved For Release 2009/08/19 : CIA-RDP88-00904R000100120017-0

Approved For Release 2009/08/19 : CIA-RDP88-00904R000100120017-0

а) Интенсивность обновления амидного азота глутамина

Интенсивность обновления амидного азота глутамина изучалась путем введения в организм голубей как больших доз $N^{15}H_4NO_3$ (30-40 мг $N-NH_3$ на 100 г веса тела), так и малых доз (11 мг $N-NH_3$ на 100 г веса тела). В случае введения больших доз $N^{15}H_4NO_3$ в мышцах, как и в иных тканях, повышается содержание аммиака и глутамина; повышается и содержание амидного азота тканевых белков (9). Увеличение содержания амидного азота в белках мышц при введении в организм аммиачной соли установлено было раньше (10). При введении же малых доз аммиачной соли подобных изменений в содержании глутамина и амидного азота белков не наблюдается.

Полученные данные, приведенные на рис.7, показывают, что введение в организм голубей больших доз аммиачной соли приводит к увеличению содержания в грудной мышце голубя азота аммиака в среднем на 20%, амидного азота глутамина на 39% и амидного азота белков на 19%. Что же касается содержания стабильного изотопа азота (N^{15}) в различных фракциях азотистых веществ мышц, то наиболее высокая концентрация его оказалась в амидном азоте глутамина. Среднее обогащение его составляло величину 11,3 раза. В то же время обогащение стабильным изотопом азота, содержащегося в мышцах аммиака, достигло лишь 6,2 раза. Следует отметить, что величина обогащения азота аммиака ниже истинной, так как содержание изотопа азота аммиака, проникшего в мышцы, могло снизиться в результате разведения аммиаком, нормально содержащимся в мышцах и имеющим нормальное соотношение азота с массами 14 и 15.

Из приведенных на рис.7 данных видно, что интенсивность обновления амидного азота глутамина во много раз выше интенсивности обновления амидного азота белков мышц, общего и небелкового азота мышц.

В серии опытов в организм голубей путем внутримышечной инъекции вводились в три приема меньшие количества аммиачной соли, меченной N^{15} (11,5 мг на 100 г веса).

В этих опытах , как и при введении больших (токсических) доз, также имело место интенсивное включение стабильного азота в амидные группы глутамина мышц и сравнительно незначительное включение его в состав иных азотистых веществ (рис.8). Эти данные представляют особый интерес, так как они показывают, что и при сравнительно

Approved For Release 2009/08/19 : CIA-RDP88-00904R000100120017-0

Approved For Release 2009/08/19 : CIA-RDP88-00904R000100120017-0

низком уровне содержания аммиака в мышцах амидный азот глутамина интенсивно включается в обмен аммиака.

Полученные экспериментальные данные приводят к заключению о том, что амидные группы глутамина являются тем звеном, проходя через которое аммиак приобретает соответствующий энергетический уровень, обеспечивающий его участие в синтезе различных азотистых веществ в тканях.

Интенсивное обновление амидной группы глутамина, как показали проведенные исследования, имеет место не только в мышцах. На рис.9 приведены данные, показывающие степень обогащения стабильным изотопом азота аммиака, амидного азота глутамина и амидного азота белков ряда органов кроликов после введения в организм аммонийной соли, меченной стабильным изотопом азота. Из этих данных видно, что степень обогащения стабильным изотопом азота наиболее высока в глутамине головного мозга, а затем в печени. Амидный азот глутамина сердечной мышцы обогащается стабильным азотом в меньшей степени, чем амидный азот глутамина головного мозга и печени, но в большей степени, чем тот же азот скелетных мышц.

Приведенные данные показывают, что амидная группа глутамина интенсивно участвует в процессах азотистого обмена в различных тканях и органах.

б) Интенсивность обновления амидного азота глутамина в тканях животных различного возраста

В ранее проведенных исследованиях (11) были установлены возрастные особенности обмена глутамина в мышцах. Оказалось, что содержание глутамина в скелетных мышцах и в сердечной мышце молодых кроликов выше, чем у взрослых. Применение меченной стабильным изотопом азота аммонийной соли позволило выявить степень обогащения амидного азота глутамина в различных тканях молодых кроликов. Полученные данные приведены на рис.10. Они показывают, что в мышечной ткани молодых животных амидный азот глутамина обогащается стабильным изотопом азота в большей степени, чем в мышцах взрослых кроликов. То же самое наблюдается и в сердечной мышце. В значительно меньшей степени проходит обогащение стабильным изотопом азота амидной группы глутамина в головном мозгу молодых животных.

Approved For Release 2009/08/19 : CIA-RDP88-00904R000100120017-0

Approved For Release 2009/08/19 : CIA-RDP88-00904R000100120017-0

в) Интенсивность обновления амидного азота глутамина в тканях при голодании животных

В ранее проведенных исследованиях (12) установлено, что голодание приводит у животных к снижению содержания глутамина в мышцах. Представляло интерес изучить степень обогащения стабильным азотом амидного азота глутамина в тканях при голодании животных при введении в организм меченной стабильным изотопом азота аммонийной соли. Из литературных данных (13) известно, что использование аммиака для синтеза белка происходит более интенсивно при малом содержании белков в пище.

Из данных, приведенных на рис.11, видно, что у голодных животных обогащение амидного азота глутамина стабильным изотопом азота в мышцах выше, чем в норме.

В печени голодных животных степень обогащения амидного азота глутамина стабильным изотопом азота несколько выше, чем в норме. Как известно, резервом для обновления амидного азота глутамина является в тканях аммиак. Отсюда понятно, что степень обогащения амидного азота глутамина в известной мере определяется степенью обогащения азота аммиака. Однако следует тут учитывать значительно более низкое обогащение стабильным изотопом азота аммиака печени при голодании. По-видимому, в печени голодающих животных происходит более интенсивное использование как аммиака, так и амидного азота глутамина для синтеза белков. В пользу этого предположения говорят данные о повышенном обогащении стабильным азотом амидных групп белков печени голодных животных по сравнению с нормой.

Эти данные представляют интерес в связи с существующим взглядом об участии амидного азота глутамина в синтезе белков. По-видимому, аммиак, прежде чем быть использованным для синтеза белка, проходит через звено амидирования глутаминовой кислоты, приобретая соответствующий энергетический уровень.

Изучение обогащения стабильным изотопом азота амидной группы глутамина в мышцах кроликов при витамин Е-недостаточности показало, что при повышении содержания в мышцах глутамина интенсивность обновления его амидной группы остается без изменения.

Approved For Release 2009/08/19 : CIA-RDP88-00904R000100120017-0

Approved For Release 2009/08/19 : CIA-RDP88-00904R000100120017-0

Приведенные в настоящем сообщении экспериментальные данные были получены при использовании меченых атомов радиоактивного углерода (C^{14}) и стабильного изотопа азота (N^{15}). Они расширяют наши представления об обмене веществ в мышцах, устанавливают факты, которые не могли бы быть выявлены иными методами исследования.

Литература

1. Фердман Д. Доклад на Международной конференции по мирному использованию атомной энергии в Женеве, 1955.
2. Фердман Д. Вопр.мед. химии, 1957, 5,351.
3. Arnstein H., Adkin Protein Chem.,1954, 9,2.
4. Фердман Д., Силакова А., Френкель С. Биохимия, 1952, 7, 43.
5. Фердман Д. Успехи биологической химии, 1950, 1, 216.
6. Эпштейн С. Укр.биохим.журнал, 1948, 20, 138.
7. Силакова А. Сб.Вопросы биохимии мышц, Киев, 1954, стр.221.
8. Фердман Д., Силакова А. Докл. АН СССР, 1953, 92, 1011.
9. Фердман Д., Силакова А. Биохимия, 1957, 22, 283.
10. Фердман Д., Эпштейн С. Укр.биохим. ж., 1953, 25, 288.
11. Силакова А., Смородинская В. Укр.биохим.ж., 1955, 27, 375
12. Силакова А. Укр.биохим.ж., 1953, 25, 77.
13. Sprinson D., Rittenberg D., J.Biol.Chem.,1949,180,707

Approved For Release 2009/08/19 : CIA-RDP88-00904R000100120017-0

Approved For Release 2009/08/19 : CIA-RDP88-00904R000100120017-0

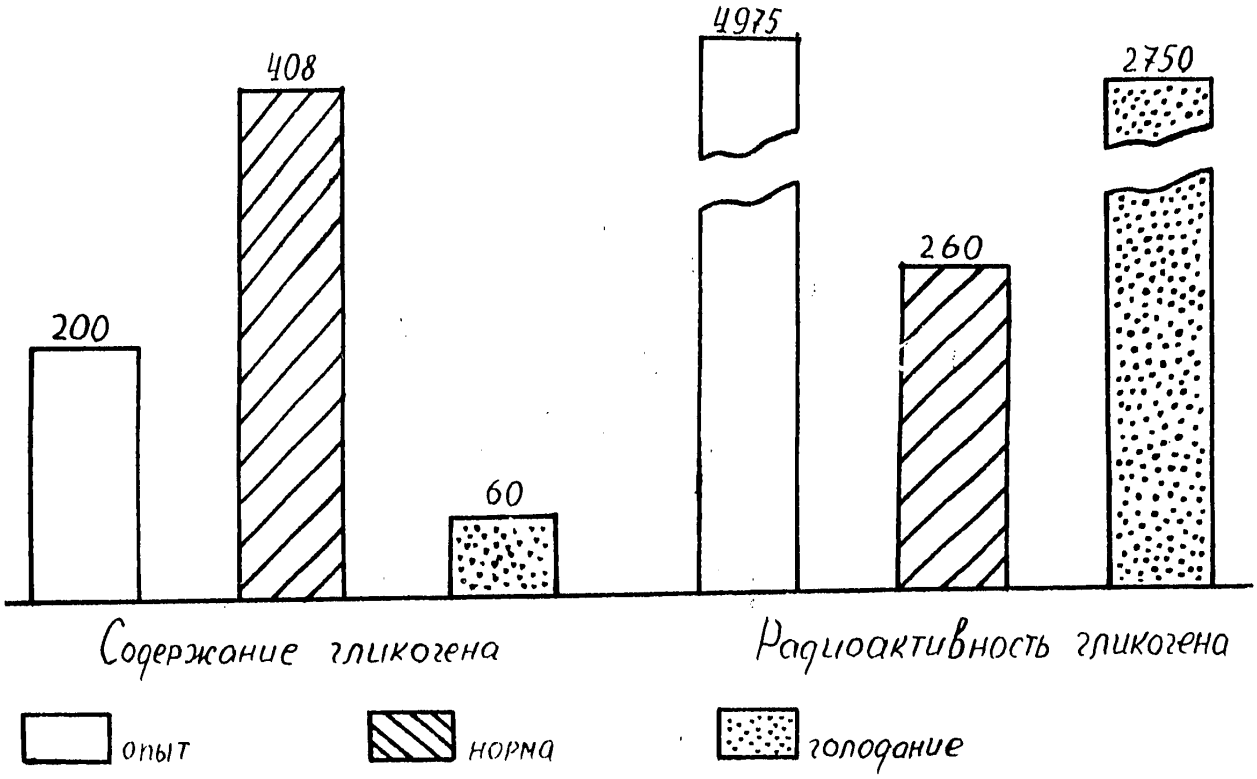

Рис. 1.

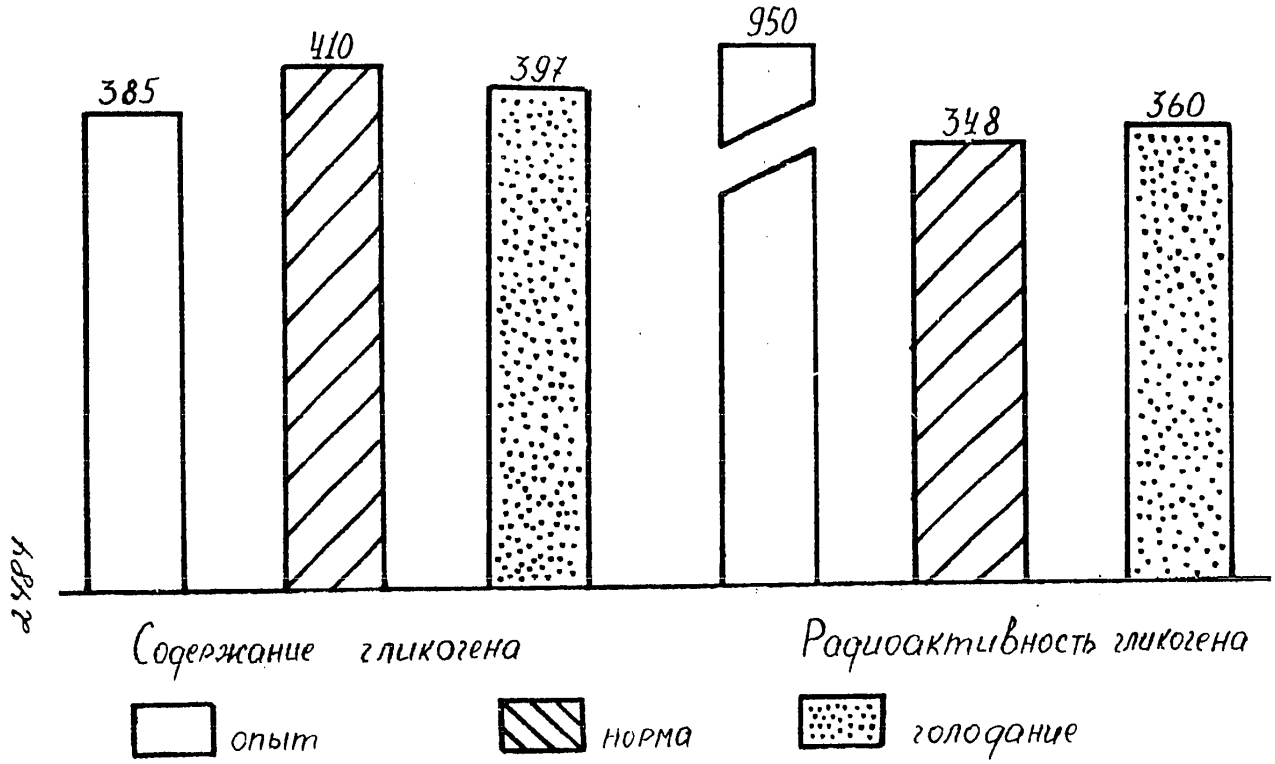

Рис. 2

Approved For Release 2009/08/19 : CIA-RDP88-00904R000100120017-0

Approved For Release 2009/08/19 : CIA-RDP88-00904R000100120017-0

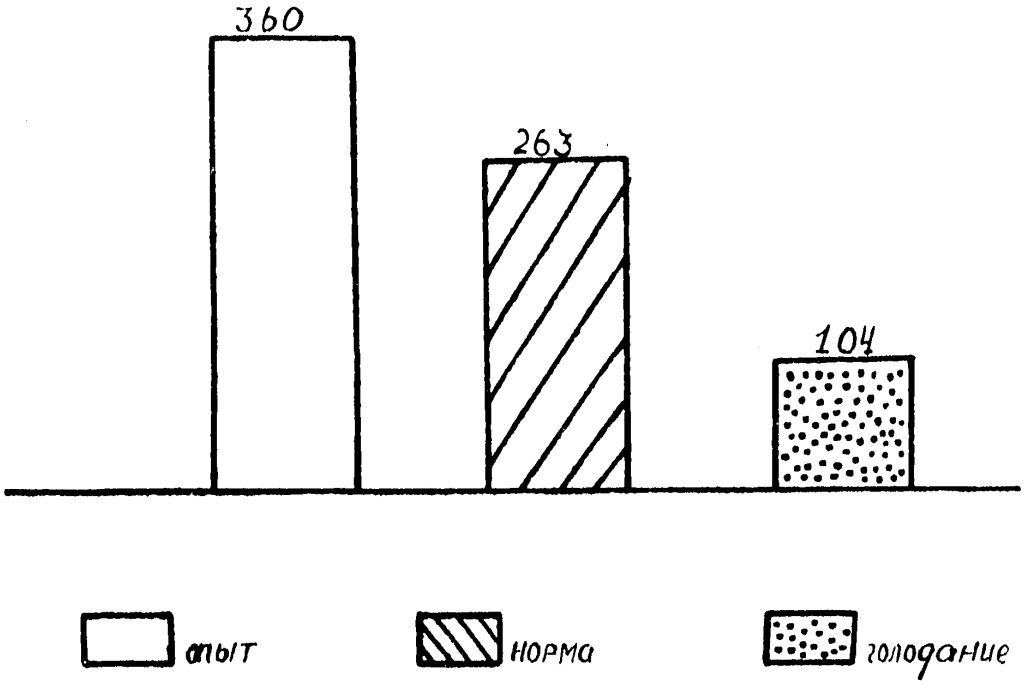

Рис. 3.

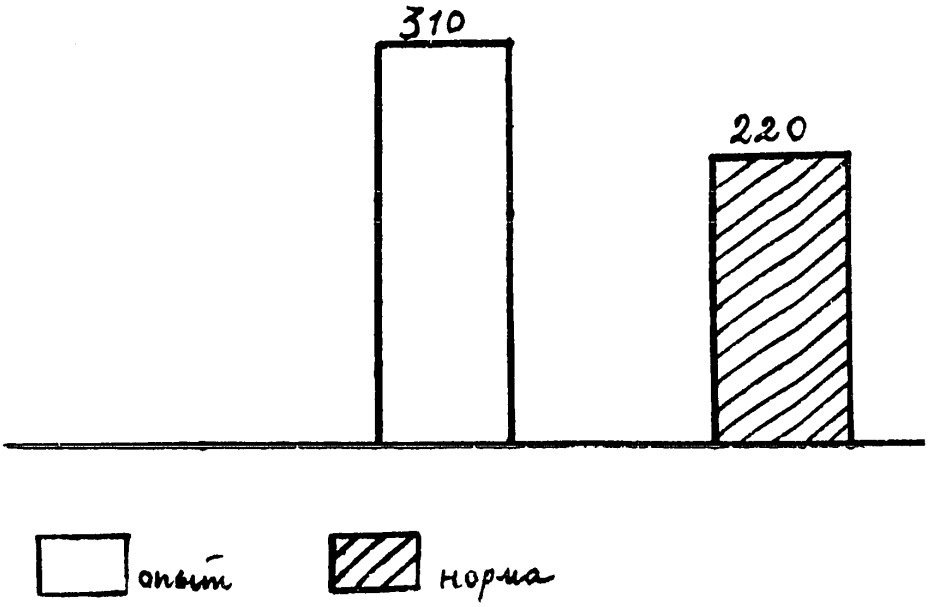

Рис. 4.

Approved For Release 2009/08/19 : CIA-RDP88-00904R000100120017-0

Approved For Release 2009/08/19 : CIA-RDP88-00904R000100120017-0

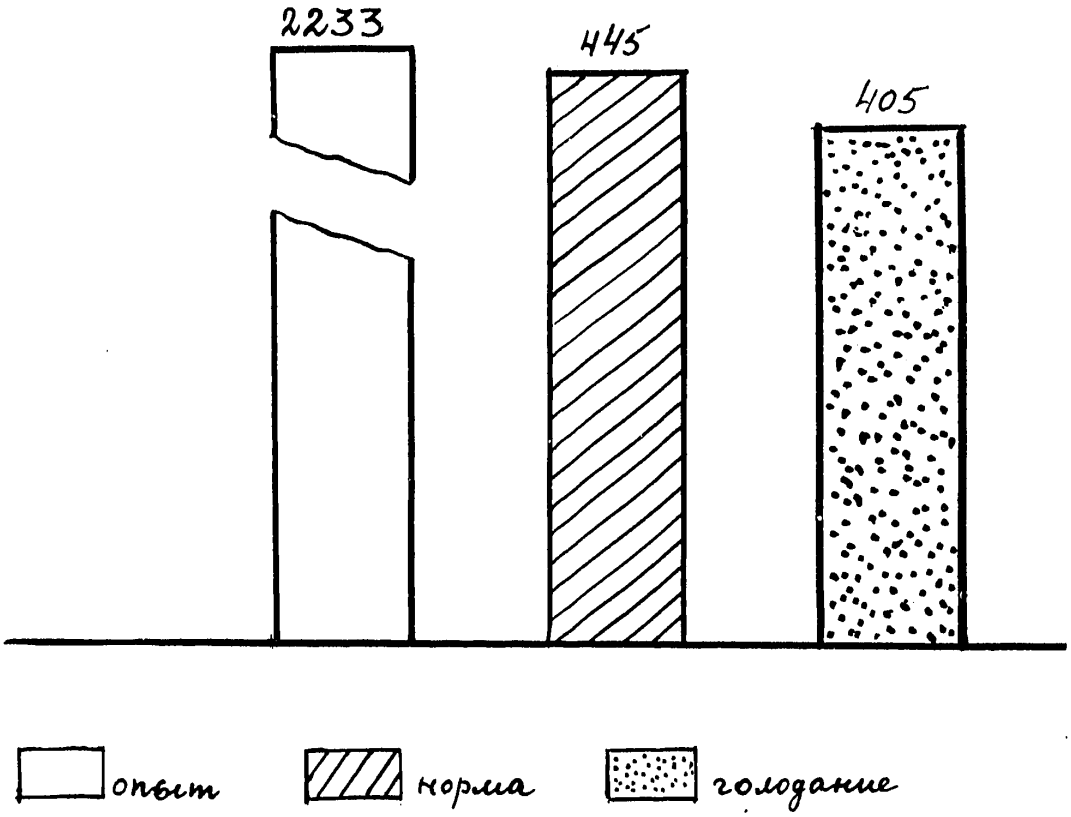

Рис. 5.

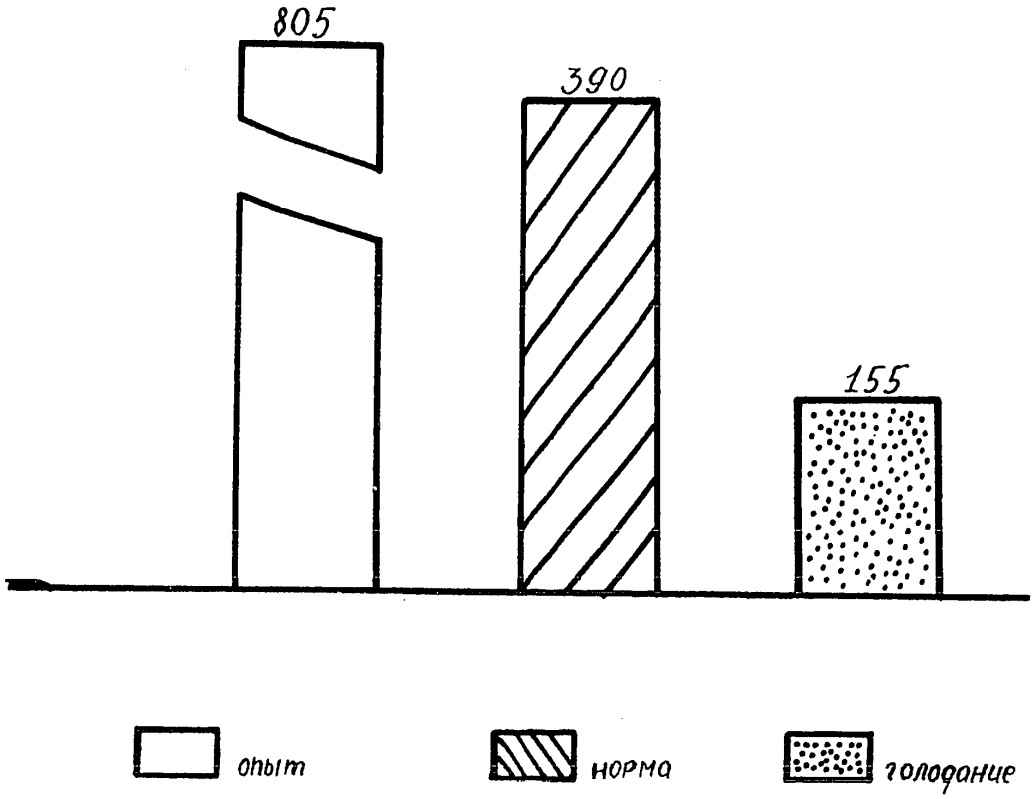

Рис. 6.

2484

Approved For Release 2009/08/19 : CIA-RDP88-00904R000100120017-0

Approved For Release 2009/08/19 : CIA-RDP88-00904R000100120017-0

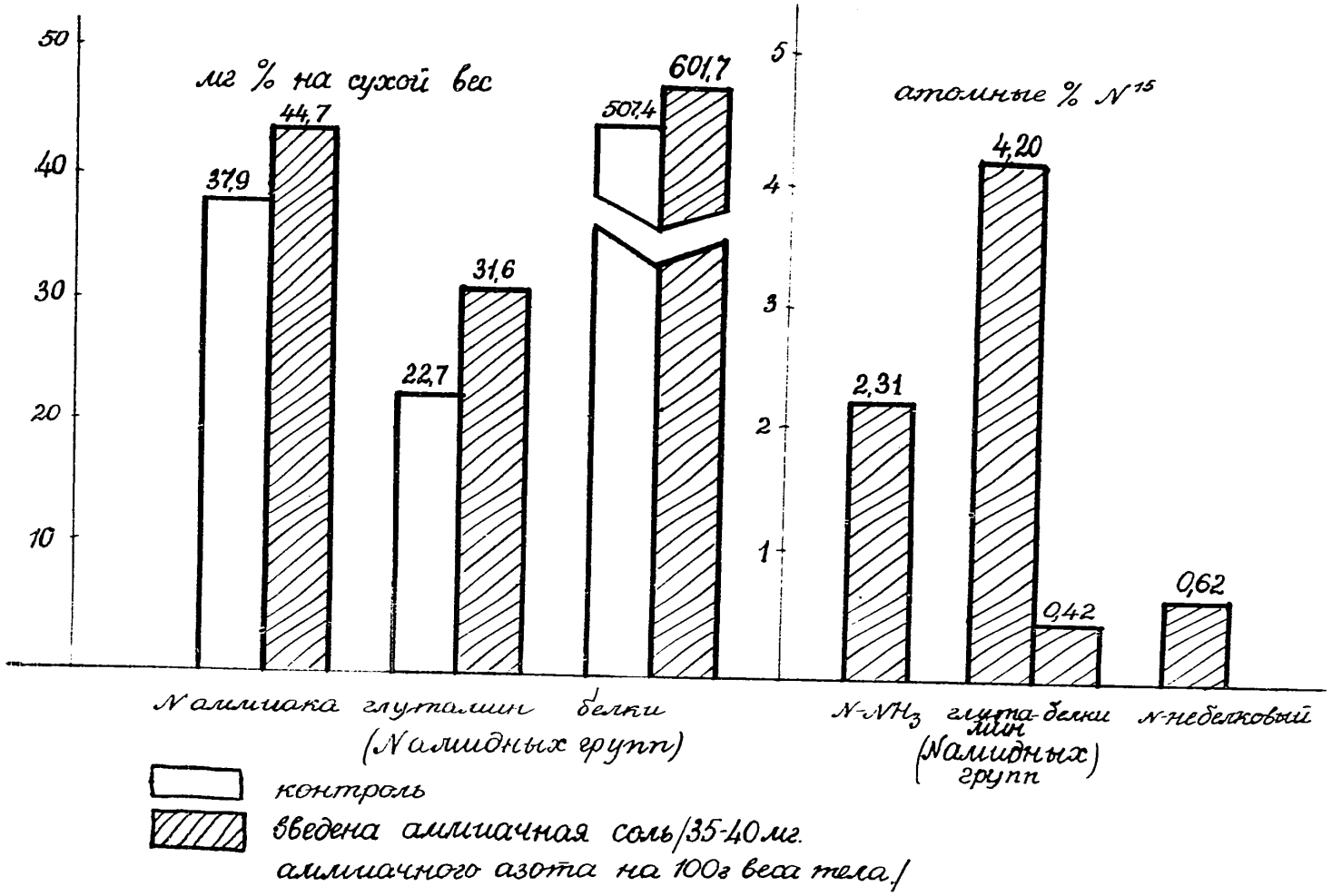

Рис. 7

Approved For Release 2009/08/19 : CIA-RDP88-00904R000100120017-0

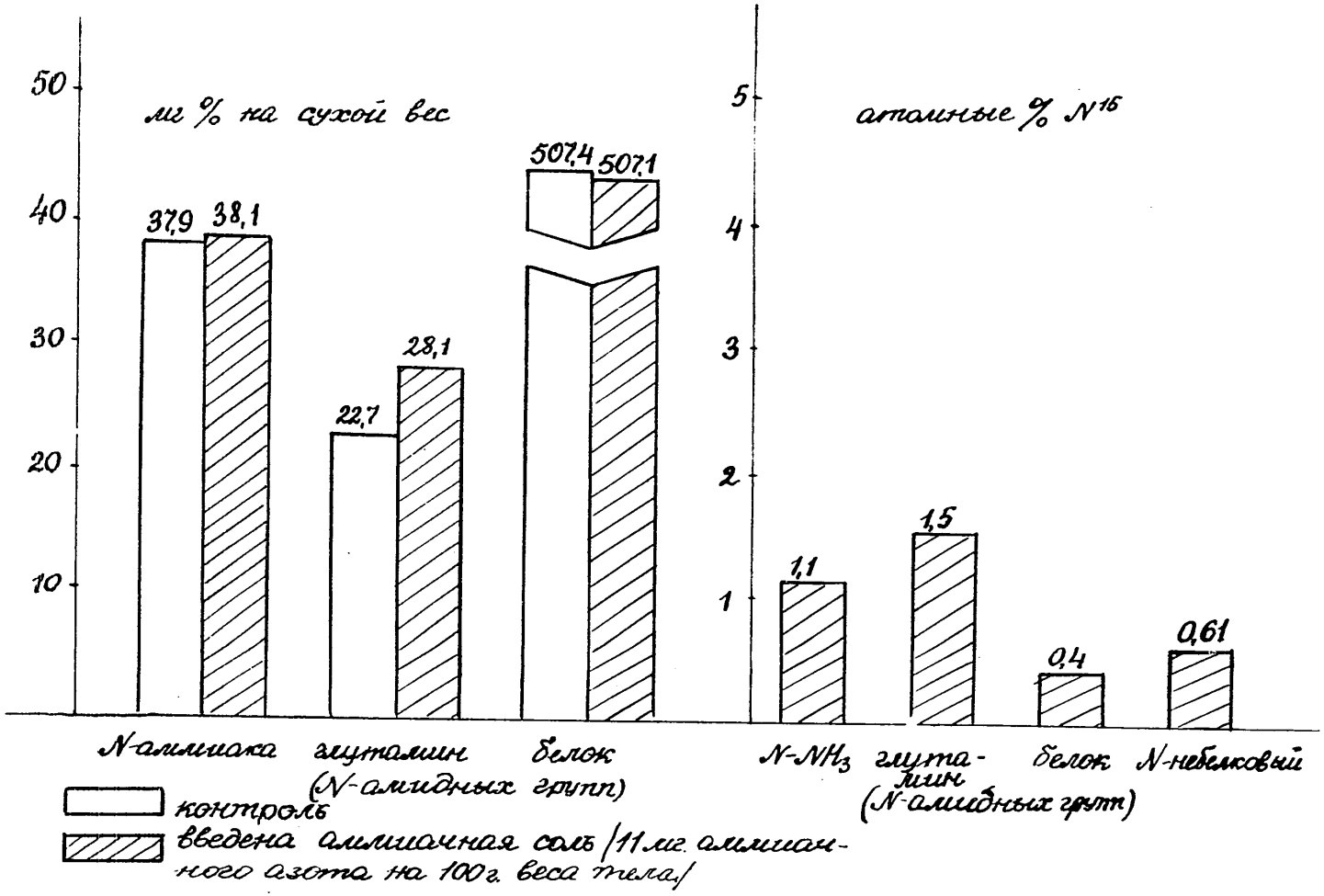

Рис. 8

Approved For Release 2009/08/19 : CIA-RDP88-00904R000100120017-0
Approved For Release 2009/08/19 : CIA-RDP88-00904R000100120017-0

Approved For Release 2009/08/19 : CIA-RDP88-00904R000100120017-0

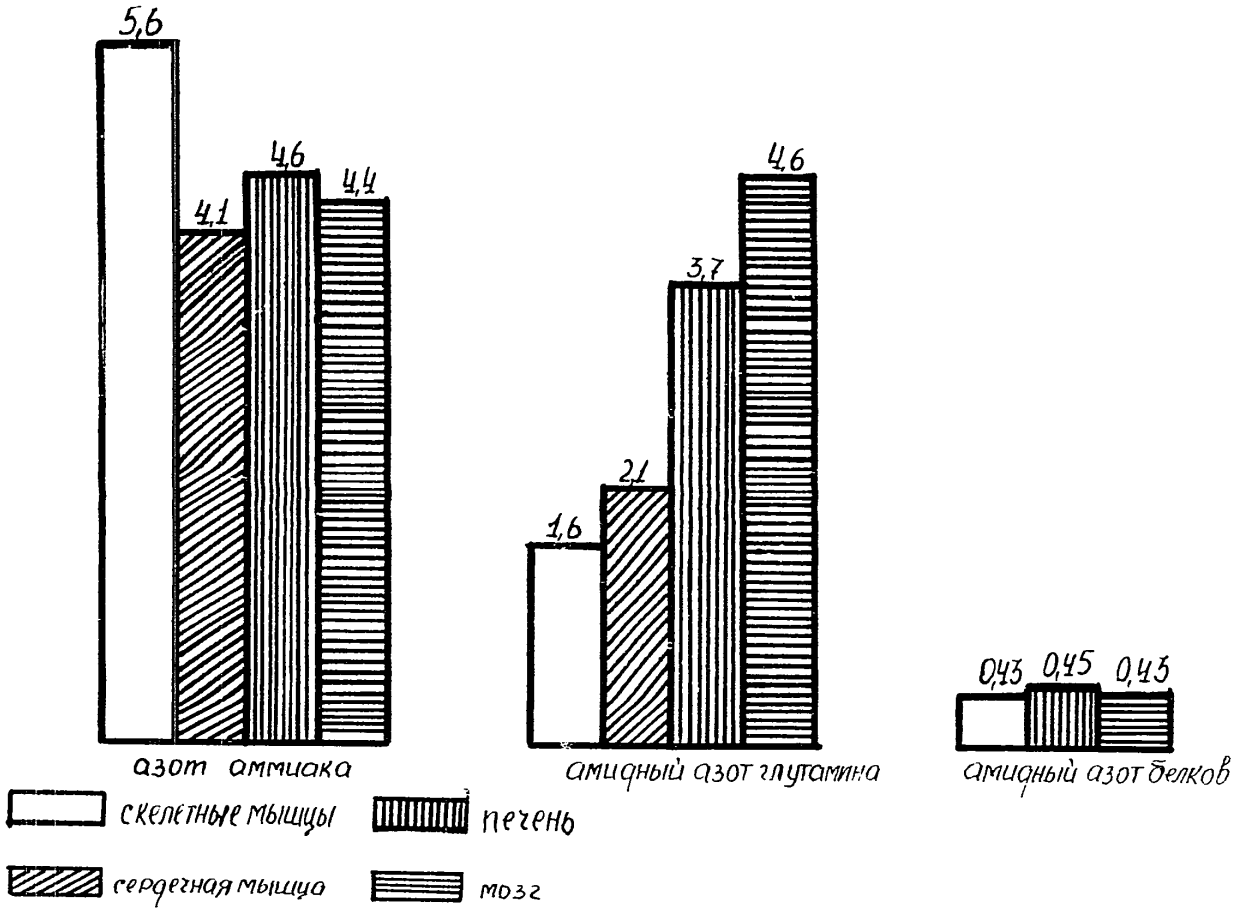

Рис. 9

Approved For Release 2009/08/19 : CIA-RDP88-00904R000100120017-0

Approved For Release 2009/08/19 : CIA-RDP88-00904R000100120017-0

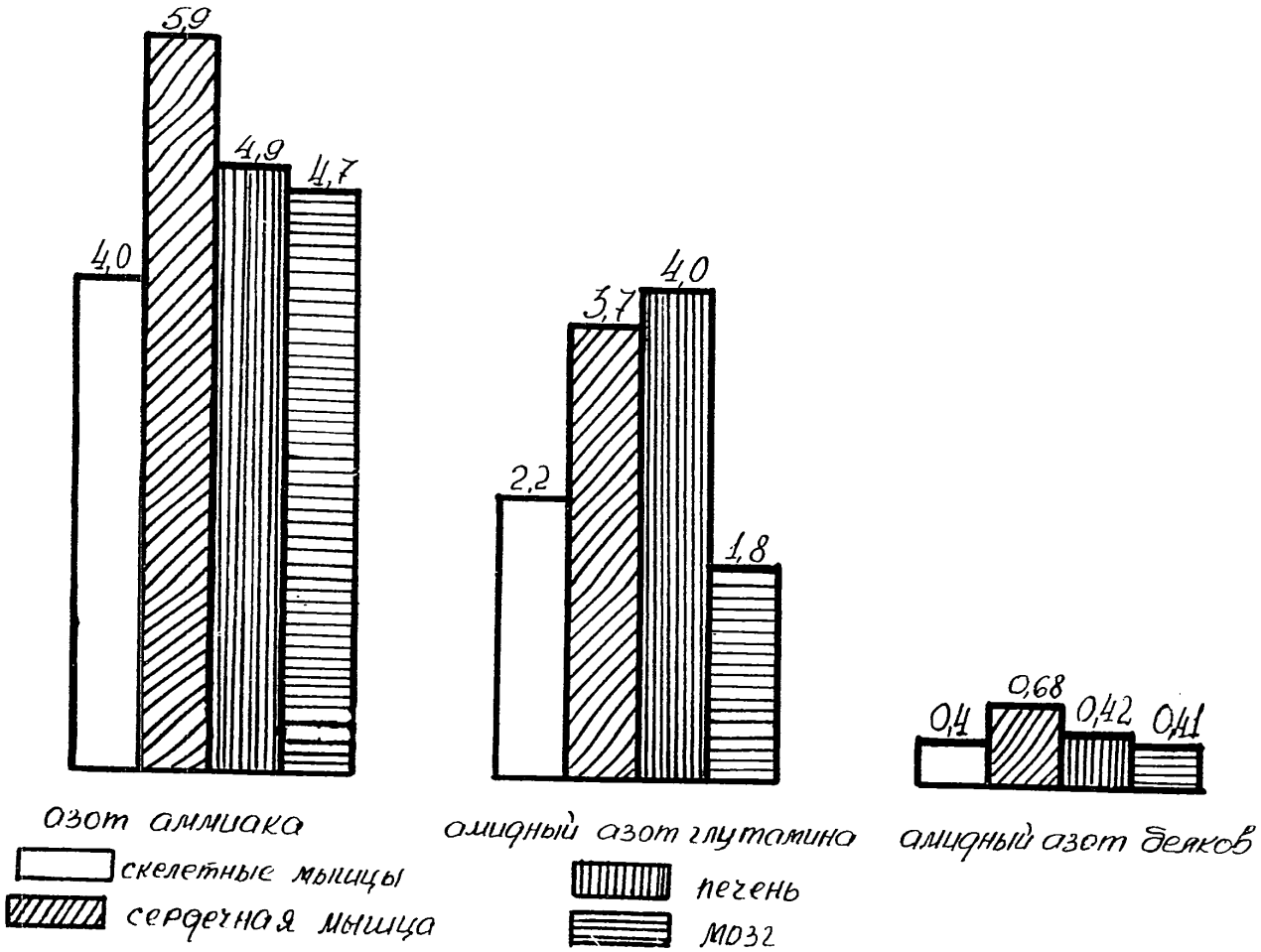

Рис. 10.

Approved For Release 2009/08/19 : CIA-RDP88-00904R000100120017-0

Approved For Release 2009/08/19 : CIA-RDP88-00904R000100120017-0

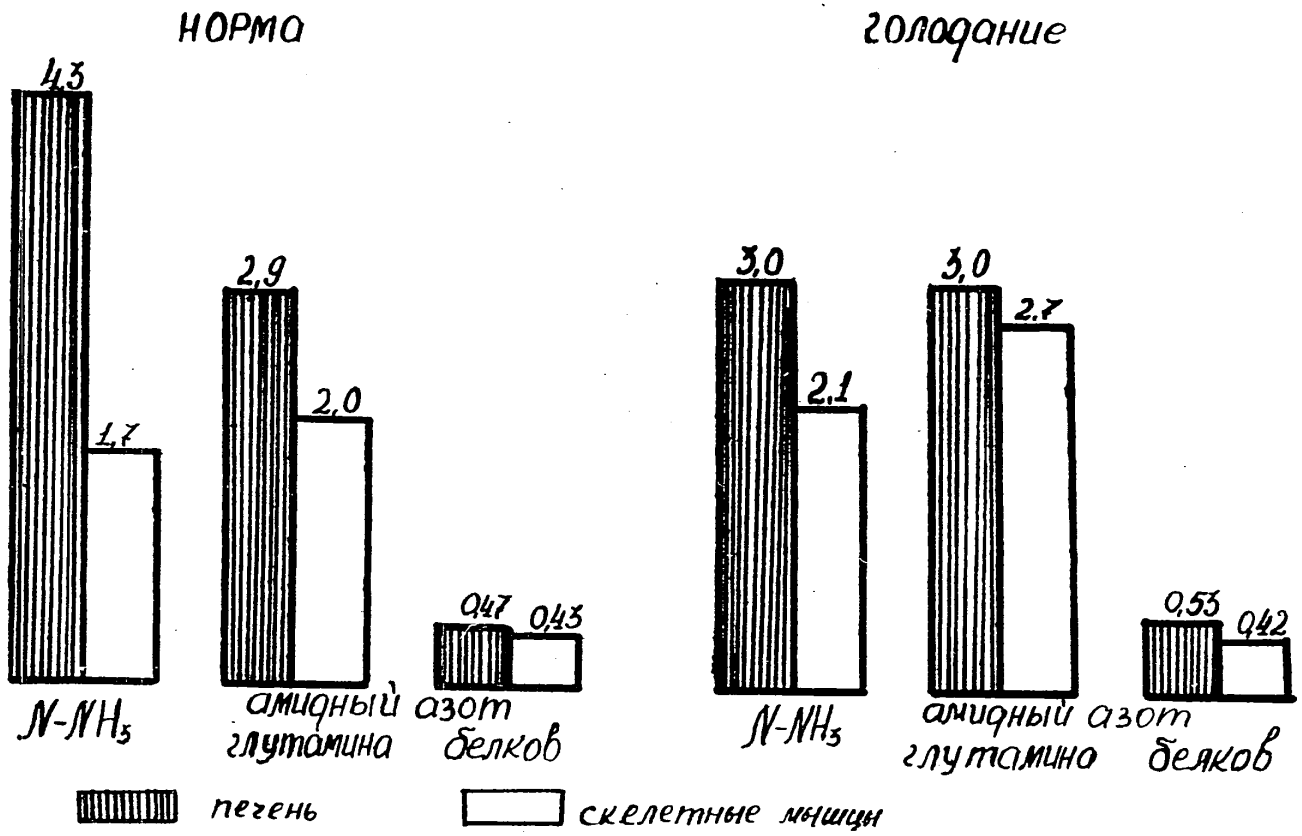

Рис. 11

Approved For Release 2009/08/19 : CIA-RDP88-00904R000100120017-0