

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РСФСР
ОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИНСТИТУТ
ИМЕНИ М.И. КАЛИНИНА

К.Н. ГРУЗДЕВА

О СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЯХ ГЛИКОГЕНА
ПЕЧЕНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ РАКЕ.

Диссертация на соискание
ученой степени доктора
медицинских наук.

О м с к - 1965

О Г Л А В Л Е Н И Е

I. Введение	3
II. Литературный обзор	
1. Структура и свойства гликогена	10
2. Значение гликогена для животного организма	44
3. Обмен углеводов в организме, пораженном злокачественным новообразованием	60
III. Материал и методы исследования	73
IV. Собственные наблюдения	
1. Исследование процесса бета-амилолиза полисахаридов с целью изучения структуры гликогенов печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс	94
2. Изучение йод-гликогеновых кривых, полученных в результате фотометрирования абсорбционных соединений йода с гликогенами печени кроликов, пораженных карциномой Броуна-Пирс	137
3. Определение средней величины единицы цепи гликогенов печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс и изучение степени ветвления молекул этих полисахаридов	155
4. Получение и исследование величин, характеризующих длину наружных и внутренних ветвей молекул гликогена печени кроликов, пораженных карциномой Броуна-Пирс	175
5. Изучение типа связей между глюкозными остатками в молекулах гликогена печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс	188
6. Электронно-микроскопическое исследование структуры гликогенов печени здоровых кроликов и пораженных карциномой Броуна-Пирс	214

7. Динамика изменения содержания гликогена в печени кроликов в процессе развития карциномы Броуна-Пире по данным гистохимического исследования и количественного определения изучаемого полисахарида

237

У. Заключение

269

УІ. Выводы

286

УП. Литературный указатель

293

УІІ. Приложение

244

"Болезнь и смерть не будут сражены
до тех пор, пока мы не познаем
химию и физику высокомолекулярного
материала своего собственного тела"

Т.Сведберг

В В Е Д Е Н И Е

Проблема борьбы со злокачественными опухолями является одной из актуальнейших проблем современности, поэтому вопросы, связанные с изучением злокачественных новообразований с каждым годом привлекают все более пристальное внимание исследователей различных отраслей биологической и медицинской науки, и вряд ли можно назвать другую проблему современной биологии и медицины, в разрешении которой принимало бы участие столь большое количество ученых самых разнообразных специальностей.

На протяжении десятилетий изучения раковой болезни основные усилия исследователей были направлены на раскрытие механизмов, лежащих в основе процесса малигнизации организма, в результате чего были высказаны многочисленные гипотезы и теории, которые пытались объяснить этиологию этого заболевания.

В настоящее время в онкологии доминирует представление о полиэтиологии опухолей, которые могут возникать под влиянием химических канцерогенных веществ, ионизирующей радиации, гормональных нарушений и вирусов, имеющих единую точку приложения в клетке, в которой под влиянием этих факторов происходит изменение свойств рибонуклеиновой кислоты, что приводит к изменению кода синтеза белка и образованию "туморпротеидов". (Р.Е.Кавецкий, 1965; А.Д.Тимофеевский, 1965; И.В.Сбарский, 1957-1965; В.С.Шапот, 1963 и др

На основании изучения роли передачи электронов в химическом канцерогенезе, а также зависимости между электронной структурой полициклических углеводородов и их канцерогенными свойствами, начинает вырисовываться представление о том, что в основе единого механизма канцерогенеза, по-видимому, лежит передача неспаренного электрона, приводящая к возбужденному состоянию вещества, что может являться первичной причиной изменения свойств рибонуклеиновой кислоты, а следовательно и синтеза белка (А.Пульман, Б.Пульман, 1957; Сень-Дьердьи, 1960, 1964). Не исключено также, что в основе действия химических канцерогенов и ионизирующей радиации лежит образование свободных радикалов, которые могут изменять структуру нуклеиновых кислот (Г.Фелл, Д.Спенс, 1963). Что касается действия онкогенных вирусов, то они, проникая в клетку, вносят своей нуклеиновой кислотой дополнительную генетическую информацию в гены клетки, чем сообщают ей новые свойства, изменяя тем самым ее обмен (Л.А.Зильбер, Г.И.Абелев, 1962; Л.А.Зильбер, 1963).

Таким образом, по современным данным, в основе действия всех канцерогенных факторов лежит их мутагенная способность, связанная с изменением нуклеиновых кислот клетки, что приводит к возникновению патологического обмена белков, следствием чего в дальнейшем является образование опухолевой ткани.

Возникший патологический очаг начинает выделять продукты извращенного обмена в кровь больного организма, что вызывает соответствующие ответные реакции со стороны организма в целом, выражающиеся в изменении обмена веществ ряда тканей, органов, систем, отдаленных от места расположения бурно растущих опухолевых клеток.

Это приводит к последующему извращению интимных биохимических процессов, протекающих в тканях, а наблюдаемые при этом

изменения в обмене веществ являются результатом поступления в кровь и ткани продуктов нарушенного обмена развивающейся опухоли, а также следствием нарушения функций отдаленных от нее органов, что всегда имеет место при опухолевой болезни (И.М.Нейман, 1961; Р.Е.Кавецкий, 1962).

Наблюдаемая при этом картина извращенного обмена веществ является следствием изменения активности ферментов или нарушения соотношения субстратов в том или ином звене энзиматических реакций, в совокупности составляющих обмен веществ организма, изучение которого является предметом исследования биохимиков, работающих в области онкологии. Как показали многочисленные исследования, проведенные с целью выяснения состояния обмена веществ опухолевого организма, наиболее резко выраженные изменения наблюдаются со стороны углеводного обмена тканей малигнизирующегося организма.

Большое количество работ, посвященных исследованию углеводного обмена опухолей, а также органов организма, пораженного злокачественным новообразованием, указывает на ряд особенностей со стороны изученных показателей, свидетельствующих о том, что характерной чертой обмена опухолевой ткани и организма-носителя новообразования является нарушение соотношения между аэробной и анаэробной фазами углеводного обмена. По данным большого числа исследователей опухолевая ткань, а также отдаленные органы, непосредственно опухолью не пораженные, характеризуются пониженным уровнем тканевого дыхания и высокой интенсивностью процессов гликолиза; при этом, как правило, обнаруживается резко выраженный аэробный гликолиз (O. Warburg, 1924; Д.Гринштейн, 1951; И.М.Нейман, 1961; Р.Е.Кавецкий, 1962 и др.).

Указанные нарушения в углеводном обмене опухолевого организма сочетаются с определенными изменениями количественного содержания некоторых субстратов обмена углеводов в ткани опухоли и других органов малигнизирующегося организма. Одним из основных субстратов углеводного обмена является полисахарид гликоген, который представляет собой не только важный пластический и энергетический материал для функционирующей клетки, но и субстанцию, выполняющую, по видимому, роль особой клеточной органеллы, участвующей в регуляции ферментативных процессов, протекающих в клетке (Е.Л.Розенфельд, И.С.Лукомская, 1964). Изучению содержания гликогена в ткани различных злокачественных опухолей, а также органов, непосредственно опухолью не пораженных, занималось большое количество исследователей, которые установили, что содержание этого полисахарида в опухолях может значительно варьировать в зависимости от вида опухоли, от степени зрелости и состояния организма, содержание же гликогена в печени больного раком животного, как правило, уменьшается, а при определенных стадиях заболевания вообще не обнаруживается (И.А.Аксамитная, 1938; Л.В.Шершульская, 1944; С.С.Касабян, 1950; Д.Н.Чанг, Д.Н.Ворд, К.Ичино, 1963 и др.). Все это свидетельствует о том, что механизмы, участвующие в синтезе и распаде гликогена, значительно страдают при малигнизации организма, что, естественно, может приводить не только к изменению количества этого полисахарида в органах и тканях больного организма, но и к синтезу гликогена, характеризующегося структурой, отличающейся от той, которая свойственна этому полисахариду в норме.

Такое предположение вполне вероятно и может отчасти базироваться на известном факте о том, что распределение ферментов в клетке не является строго постоянным и значительно меняется в

зависимости от физиологического состояния животного, введения гормонов и целого ряда других факторов, действующих на организм. Наряду с этим известны случаи нарушения или выпадения действия тех или иных ферментов, участвующих в синтезе гликогенов, при так называемых молекулярных болезнях, при которых в организме образуются гликогены, значительно отличающиеся по своей структуре от обычных гликогенов, свойственных здоровому организму.

С меньшей вероятностью можно допустить, что при бурно развивающемся процессе малигнизации, при котором происходит беспредельный рост опухолевых клеток в неограниченном количестве генераций вне всякой зависимости от факторов, регулирующих рост в организме, наступает дисфункция в действии ферментов, участвующих в синтезе гликогена. Это может явиться результатом ингибирования одних ферментов или активирования других, что, несомненно, может иметь место в организме, пораженном таким тяжелейшим заболеванием, как опухолевая болезнь.

В свете сказанного представляло определенный интерес проверить высказанное предположение о возможном существовании структурных особенностей гликогенов, синтезируемых в организме, пораженном злокачественным новообразованием, тем более, что в литературе нам не удалось обнаружить каких-либо данных по этому вопросу.

При этом наибольший интерес, несомненно, представлял ответ на вопрос, изменяется ли структура гликогена, образующегося в органе, наиболее богатом этим полисахаридом, где имеются наиболее мощные ферментные системы, осуществляющие синтез и распад гликогена. Таким органом в высокоорганизованном организме является печень, которая, как известно, играет чрезвычайно важную роль в углеводном обмене организма в целом. Вместе с тем, печень при

ряде экспериментальных опухолей поражается метастазами на поздних стадиях развития заболевания, поэтому, используя этот орган в качестве объекта исследования, можно изучить влияние отдаленно развивающегося злокачественного новообразования на процессы обмена, протекающие в данном органе, непосредственно опухоли непораженном, а отмеченные при этом изменения в обмене, если они будут иметь место, отнести за счет влияния процесса канцеризации на обмен веществ организма в целом.

Все вышеизложенное послужило для нас поводом к тому, чтобы заняться подробным исследованием структуры гликогенов, которые синтезируются в печени животных с привитым опухолевым штаммом в различные сроки развития злокачественного новообразования. При этом исследованию всегда подвергалась печень, не пораженная метастазами опухоли, а параллельно во всех случаях изучались те же показатели, характеризующие структуру гликогенов, образованных в печени соответствующих здоровых контрольных животных.

Одновременно с определением показателей, дающих возможность судить о структуре исследуемых полисахаридов, изучалась динамика количественного содержания гликогена в печени опухолевых и здоровых животных при содержании их в аналогичных условиях.

Мы полагали, что проведенные исследования, выполненные в широком плане на однотипных животных с использованием гистохимического, энзиматического, абсорбционного, хроматографического, электронномикроскопического и целого ряда различных химических методов исследования, дадут возможность составить определенное представление о влиянии развивающегося в животном организме злокачественного новообразования на структуру гликогена, синтезируемого в печени больного раком животного.

И независимо от того будет обнаружено это влияние или нет, полученные данные, несомненно, представят определенный интерес, поскольку структура гликогенов, образующихся в органах животных, пораженных злокачественным новообразованием, еще не была исследована.

Вышеизложенное послужило для нас поводом к тому, чтобы в последующих главах настоящей работы изложить результаты проведенных в этом плане исследований, предпослав им литературные данные, касающиеся вопросов структуры, свойств и значения гликогена для животного организма, а также результаты исследований, посвященных изучению обмена углеводов в организме, страдающем раковой болезнью.

Содержание работы представляет собой анализ полученных экспериментальных данных, обработанных с помощью разных методов вариационно-статистического анализа, и последующее сопоставление найденных показателей, являющихся результатами различных методов исследования. Далее следует обсуждение полученных данных и соответствующие выводы, характеризующие структуру исследуемых полисахаридов, а также указатель цитируемой литературы.

I. СТРУКТУРА И СВОЙСТВА ГЛИКОГЕНА

С момента открытия гликогена прошло более 100 лет, когда он был впервые обнаружен в печени собаки (*C. Bernard*, 1857). Это открытие явилось результатом ряда опытов, в которых делалась попытка проследить судьбу сахара, поступившего в пищеварительный тракт животного. Проведенные исследования показали, что кровь собаки всегда содержит в своем составе сахар, который образуется в печени из особого вещества — животного крахмала, названного автором гликогеном. Последующие эксперименты исследователя подтвердили, что гликоген является источником образования сахара крови, а также показали, что он используется для построения тканей во время зародышевого развития организма. (*C. Bernard*, 1877, 1878).

Изучение вновь найденного вещества показало, что в печени животных, находившихся на различной диете, содержится по крайней мере четыре вещества гликогенового типа, отличающихся друг от друга растворимостью, оптическим вращением и скоростью кислотного гидролиза (*Ф. Тихонович*, 1866). В этих опытах наиболее растворимый гликоген характеризовался наибольшей скоростью превращения в глюкозу под влиянием разбавленной соляной кислоты, что дало основание исследователю говорить о различных формах существования гликогена и впервые употребить термин "гликогены" вместо "гликоген".

О неоднородности гликогена печени свидетельствовало сообщение, указывающее на невозможность извлечь с помощью воды весь гликоген из исследуемой ткани (*J. Neuking*, 1900), а также

выпадение осадка при стоянии водного раствора гликогена, полученного при экстрагировании печеночной ткани, и различие в окраске с иодом гликогена, выпавшего в осадок и оставшегося в растворе (*Z. Gatin-Grużewska*, 1904).

Неоднородность гликогена стала еще более очевидной, когда этот полисахарид, выделенный из печени собаки, удалось разделить на две фракции с помощью электродиализа. При этом большая часть гликогена, составляющая 80% всего вещества, оставалась в растворе, а меньшая, составляющая 20%, осаждалась в виде хлопьев на аноде (*M. Samec, K. Issajevich*, 1924). В дальнейшем, комбинируя электролиз с различными способами экстрагирования, удалось получить четыре фракции мышечного гликогена, отличающиеся друг от друга растворимостью и, вероятно, структурой, поскольку расщепляемость их бета-амилазой была различной (*K. Meyer, R. Jeanloz*, 1943). Различные фракции гликогенов были получены и из ткани пластинчатых моллюсков, где степень расщепляемости бета-амилазой для различных фракций выделенных гликогенов колебалась от 30% до 45% (*K. Meyer, R. Jeanloz*, 1948).

Большую степень неоднородности гликогенов мышц и печени в отношении размеров их частиц удалось выявить с помощью фракционирования исследуемых веществ метиловым спиртом с последующим определением молекулярного веса полученных фракций нефелометрическим методом. (*H. Staudinger, E. Husemann*, 1937). В дальнейшем выяснилось, что особенно неоднородными по этому показателю являются гликогены печени, в то время как мышечные гликогены значительно более однородны. При среднем молекулярном весе печеночного гликогена $5-6 \cdot 10^6$ одна из фракций исследовавшегося гликогена имела молекулярный вес двадцать миллионов. При исследовании мышечных

гликогенов таких больших колебаний со стороны молекулярного веса, равного в среднем $1,5 \cdot 10^6$, не наблюдалось. (*H. Staudinger*, 1948).

Неоднородность гликогенов различных видов животных, а также различных органов одного и того же животного, была убедительно показана с помощью электрофоретического метода исследования (*A. Cestari, R. Pellegrini*, 1958). Оказалось, что скорость продвижения в электрическом поле гликогенов печени кролика, крысы, кошки, собаки и морской свинки выше, чем скорость продвижения гликогенов мышц этих же животных. При этом скорость электрофоретической миграции изучаемых препаратов гликогенов зависела также от вида животного, в органах которого был образован исследуемый гликоген.

С помощью электрофоретического метода была доказана неоднородность и бактериальных гликогенов, различные фракции которых оказались, вместе с тем, неодинаковыми по растворимости и молекулярному весу (*E. Chargaff, D. Moore*, 1944).

Неоднородность гликогенов была показана также хроматографическим методом, когда гликогены печени и мышц кроликов, свиньи и лягушки, будучи окрашены иодом и адсорбированы на колонках из углекислого кальция, отличались по характеру зон и по окраске полученных хроматограмм (*В.В. Ковальский*, 1947, 1948).

Наличие различных фракций гликогена в органах животного организма уже давно приводило исследователей к мысли о том, что какая-то часть гликогена, по-видимому, связана с другими ингредиентами тканей. При этом невозможность полной экстракции гликогена из тканей с помощью горячей воды или слабого раствора трихлоруксусной кислоты указывала на соединение части гликогена с белками, поскольку данный полисахарид удавалось извлечь полностью после обработки тканей протеолитическими ферментами или концентрированными щелочам

На этом основании трудноизвлекаемую часть гликогена стали называть десмогликогеном, а легкоизвлекаемую часть — лиогликогеном (*R. Willstätter, M. Rohdewald, 1934*).

В последующие годы появилось значительное количество работ, подтверждающих наличие лиогликогена и десмогликогена, для обозначения которых стали использовать иную терминологию, называя их соответственно легкорастворимым и труднорастворимым, свободным и связанным, легкоизвлекаемым и трудноизвлекаемым гликогенами.

(*H. Biezy, B. Ganzan, C. Maguan, 1936; C. Tsai, 1938; M. Wajzer, 1939; W. Bloom, J. Lewes, M. ShumPERT, J. Shen, 1951* и др.)

Оказалось, что в нормальных условиях существования организма в его органах преобладает свободный гликоген, однако количественное соотношение между свободным и связанным гликогеном может значительно изменяться под влиянием различных факторов, действующих на организм. Определенное влияние на содержание свободного и связанного гликогена в органах оказывает режим питания, пол, возраст животного, а также его физиологическое состояние, в частности, тренировка организма, беременность и лактация (*А.М. Генкин, 1946, 1949; А.М. Брейтбург, А.Б. Либерман, 1940; А.М. Брейтбург, 1941; Н.Н. Яковлев, Л.И. Ямпольская, 1950; A. Mizsky, Y. Rosenbaum, E. Wertheimer, 1938; L. Laszt, 1955*). Соотношение между свободным и связанным гликогеном печени изменяется в процессе эмбрионального развития (*З.П. Желудкова, 1963*). Мощное действие на степень образования свободного и связанного гликогена в органах животного оказывают гормональные воздействия (*М.М. Эйдельман, 1940; А.М. Брейтбург, 1941; Е.Л. Розенфельд, 1951; Y. Wajzer, 1938; S. Leonard, 1955*), а также рентгеновское облучение, локальное утомление мышц фарадическим током и возбуждение центральной нервной системы (*Б.М. Колдаев, Р.М. Гельман, 1939; Т.М. Миронова, 1964;*

Н.И.Бродская, М.И.Прохорова, З.Н.Тупикова, 1962; М.И.Прохорова, 1954; Б.И.Хайкина, 1963). В опытах *in vitro* соотношение между различными фракциями гликогена в культивируемой ткани зависит от присутствия кислорода (D. Meyer, R. Russell, W. Peather, J. Purdy, B. Westfall, 1955).

Во всех этих исследованиях изучалось соотношение между гликогеном, легко извлекаемым из органа, и гликогеном, связанным с белками. Однако, вопрос о характере соединения гликогена с белком не был решен до тех пор, пока не была доказана возможность получения в искусственных условиях комплексных соединений гликогенов с белками. В ранних работах, посвященных изучению образования в искусственных условиях комплексных соединений между белками и полисахаридами, исследовался вопрос о том, за счет каких аминокислот может происходить образование полисахарид-протеинового комплекса (S. Przyleski, M. Grunberg, 1932; S. Przyleski, R. Majum, 1934; S. Przyleski, H. Rafalowska, 1935; S. Przyleski, H. Rafalowska, Z. Cichka, 1935). Авторы показали, что из пятнадцати исследуемых ими аминокислот только две — тирозин и аргинин могут взаимодействовать с гликогеном, а следовательно участвовать в образовании полисахарид-протеинового комплекса. И только в более поздних исследованиях, проведенных с помощью метода спектрального анализа, а также энзиматического и хроматографического методов исследования была внесена определенная ясность в этот вопрос (Е.Л.Розенфельд, 1951; А.М.Генкин, 1956). Образование комплексов, полученных из гликогена и белка в модельных опытах, было показано, в частности, при исследовании соединений препаратов мышечного белка миозина с гликогенами мышц с помощью иодной реакции на гликоген и спектрального анализа полученных гликогенобелковых комплексов (Е.Л.Розенфельд, 1947, 1948). Проведенные исследования показали,

что в присутствии миозина характерная для гликогена окраска с подом исчезала или становилась менее интенсивной, что свидетельствовало о взаимодействии гликогена с белками. Об образовании соединений гликогенов с белками говорило также отличие в величине максимума поглощения в ультрафиолете растворов миозина в присутствии гликогена.

В дальнейшем было показано, что сдвиг максимума поглощения в ультрафиолете в коротковолновую часть спектра наблюдается не только при взаимодействии гликогена с миозином, но также в присутствии другого мышечного белка — миогена. При этом различные препараты белка, добавленные к одному и тому же гликогену, давали одинаковый сдвиг максимума поглощения, в то время как прибавление к раствору белка различных препаратов гликогена давало различную величину сдвига максимума поглощения. Величина сдвига максимума поглощения изменялась при изменении концентрации добавленного гликогена, в то время как сам гликоген в исследуемой области ультрафиолета поглощения не давал. Таким образом было показано, что величина сдвига максимума поглощения при исследовании соединений гликогенов с белками определяется не белковым, а полисахаридным компонентом (Е.Л.Розенфельд, Х.М.Равикович, 1948; Е.Л.Розенфельд, 1951). Способность гликогенов мышц вступать в соединения с мышечными белками была доказана также электрофоретическим методом, путем исследования в аппарате Тизелиуса-Свенсена подвижности системы, состоящей из миозина и гликогена, а также миозина и гликогена в отдельности. При исследовании подвижности смеси миозина и гликогена во всех случаях обнаруживалась двухкомпонентная система, подвижность одного из компонентов которой соответствовала миозину, в то время как подвижность второго компонента была вдвое больше подвижности гликогена, что давало

основание считать, что второй компонент представлял собой комплекс гликогена с миозином (Т.Т.Болотина, Е.Л.Розенфельд, 1952). Последующее изучение этого вопроса показало, что гликогены мышц способны образовывать соединения не только с мышечными белками, но также с фибриногеном, эдестином и яичным альбумином, при этом тепловая денатурация яичного альбумина или облучение его рентгеновскими лучами, начиная с дозы 5000 рентген, повышает его способность к комплексообразованию с гликогеном. (Е.Л.Розенфельд, Е.Г.Плышевская, 1954, 1956).

В пользу существования гликогено-белковых комплексов в мышечной ткани говорят также гистохимические исследования гликогена мышц лягушки, кролика, морской свинки, свидетельствующие о локализации гликогена в анизотропных дисках, где сосредоточен миозин, и в саркоплазме, содержащей миоген (М.Т.Шубич, 1959).

Возможность существования гликогенобелковых комплексов была показана также при исследовании соединений гликогенов печени с глобулинами, выделенными из этого же органа. Методами высаливания, хроматографии на бумаге, спектрофотометрии и нефелометрии было показано, что выделенные из печени глобулины могут образовывать комплексные соединения с печеночными гликогенами, причем гликогены, полученные из печени различных видов животных, а также из печени животных, находящихся в различных физиологических состояниях, отличаются друг от друга способностью взаимодействовать с белками (А.М.Генкин, 1953, 1956).

Способность гликогенов образовывать комплексы с белками в искусственных условиях и обнаружение в органах и тканях животного организма гликогенов, связанных с белками, естественно, ставило перед исследователями вопрос о типе связи между белком и полисахаридом в данном соединении.

Первые исследования, проведенные в этом направлении, показали, что при длительной обработке гликогенов, выделенных из мышц, кипящей щелочью, исчезает способность этих полисахаридов образовывать комплексы с белками. Это свидетельствовало о том, что щелочь оказывает действие на функциональные группы молекул гликогена, участвующие в образовании гликоgeno-белковых комплексов. (Е.Л.Розенфельд, 1949).

Необходимо было выяснить, являются ли такими группами глюкозные остатки, содержащие свободный полуацетальный гидроксил, представляющий собой единственную потенциальную альдегидную группу в молекуле гликогена, или же в соединении с белком участвуют глюкозные остатки, образующие концевые ветви молекул гликогенов. Для выяснения вопроса об участии альдегидных групп в процессе образования гликоgeno-белковых комплексов были проведены исследования с окислением различных гликогенов гипохлоритом, который является специфическим окислителем альдегидных групп в молекулах углеводов. После этого изучался процесс фосфоролитического распада окисленных и исходных препаратов гликогена в присутствии и отсутствии мизоина (Е.Л.Розенфельд, О.Н.Панченко, 1950, 1952). Как показали эти исследования, различные гликогены обладали различной редуцирующей способностью. При обработке гликогенов гипохлоритом редуцирующая способность их полностью исчезала или понижалась во много раз по сравнению с редуцирующей способностью исходных гликогенов, при этом фосфоролитический распад их в присутствии мизоина ускорялся. Редуцирующие свойства гликогенов, обработанных щелочью, не отличались от редуцирующих свойств исходных гликогенов. Окисление гипохлоритом гликогенов, подвергнутых воздействию щелочи, восстанавливало их способность расщепляться

в присутствии белков быстрее, чем в их отсутствии, что свойственно исходным, не обработанным щелочью препаратам гликогенов.

Фосфоролитический распад мышечного гликогена в оптимальных условиях действия фосфорилазы значительно ускорился в присутствии миозина. При этом миозин оказывал влияние на скорость процесса фосфоролиза лишь только в том случае, когда образовывался гликогено-миозиновый комплекс, что обнаруживалось при исследовании спектров поглощения белка в присутствии и отсутствии того или иного препарата гликогена. Сопоставляя эти данные с тем, что препараты гликогенов, окисленные гипохлоритом, расщеплялись фосфорилазой быстрее, чем неокисленные, учитывая, что окислению гипохлоритом в молекуле гликогена подвергались только альдегидные группы, а ускорение фосфоролиза вызывалось взаимодействием гликогена с белком, оказалось возможным сделать вывод, что альдегидные группы молекул гликогена принимали участие в образовании гликогено-белковых комплексов. (Е.А.Розенфельд, 1948, 1950).

В соответствии с приведенными данными являются также указания на то, что полисахаридно-белковые комплексы в фосфорилазной реакции могут образовываться из гликогена и фермента. Получающиеся при этом ферментно-полисахаридные комплексы являлись активным катализатором процесса фосфоролиза (М.Ф.Гулий, М.А.Колодийченко, 1947).

Для выяснения вопроса о значении концевых ветвей молекул гликогена в процессе образования гликогено-белковых комплексов различные гликогены подвергались действию бета-амилазы, в результате чего образовывались бета-декстрины или "ядра" молекул гликогенов, лишенные боковых ветвей. При исследовании их способности образовывать комплексы с белками оказалось, что спектры

поглощения миозина в присутствии бета-декстринов не изменялись. Следовательно, "ядра" молекул гликогенов, т.е. молекулы гликогена, лишенные наружных ветвей, не образовывали комплексов с белками. Таким образом, результаты этих исследований доказали, что в образовании гликоgeno-белковых комплексов играют роль не только полуацетальные гидроксилы молекулы гликогена, но и неальдегидные концевые ветви, имеющие определенную длину и конфигурацию, что является обязательным условием для взаимодействия полисахарида с белком. (Е.Л.Розенфельд, Е.Г.Плывевская, 1952).

Исследования, посвященные выяснению роли белка в механизме взаимодействия между глобулинами печени и гликогенами, полученными из этого же органа, показали, что реакционные группы циклических аминокислот исследуемого белка связаны еще до взаимодействия с гликогеном, о чем свидетельствовала тот факт, что в ультрафиолетовой области глобулины давали максимум поглощения, сдвинутый в коротковолновую часть спектра, который не смещался при добавлении к ним гликогена. Вместе с тем глобулины печени легко вступали во взаимодействие с гликогенами за счет каких-то других групп. При этом силы, обеспечивающие это взаимодействие, преобладали над силами, объединяющими отдельные молекулы гликогена в коллоидные частицы, так как наблюдалась дезагрегация коллоидных частиц. Об этом свидетельствовал тот факт, что при спектрометрии в ультрафиолете кривые поглощения чистых глобулинов всегда располагались выше кривых поглощения смеси этих белков с гликогенами. Это было подтверждено также нефелометрическими исследованиями (А.М.Генкин, С.Г.Богомолов, 1956).

Таким образом, изучая ультрафиолетовую область спектров поглощения белков в смеси с гликогенами, используя метод электрофореза, а также высаливание белков из их смесей с гликогенами с

последующим ультрацентрифугированием, и настоящему времени удалось с несомненностью доказать возможность образования гликогено-белковых комплексов в искусственных условиях.

Вероятно, что в тканях животного организма также имеет место образование соединений, состоящих из полисахаридов и белков, о чем свидетельствует существование трудноизвлекаемых гликогенов, которые повидимому связаны с белками тканей и могут быть выделены лишь после разрушения связей, возникающих при образовании гликогено-белковых комплексов. При этом выделить из тканей трудноизвлекаемый гликоген, свободный от присутствия легкоизвлекаемого, не представлялось возможным (Е.А.Розенфельд, 1948). Как показали эти исследования при многократно повторяющейся обработке печени или мышц животного горячей водой или трихлоруксусной кислотой из них извлекался весь гликоген, без воздействия концентрированных щелочей или протеолитических ферментов. Это указывало на то, что неоднократно повторяющаяся денатурация белков горячей водой или воздействие на них трихлоруксусной кислотой приводило к столь глубоким изменениям белков, что это нарушало их связи с гликогеном. Следовательно, результаты этих исследований указывали на невозможность проведения резкой грани между свободной и связанной частью гликогена в организме животного и свидетельствовали о том, что легкоизвлекаемые и трудноизвлекаемые гликогены отличаются друг от друга способностью образовывать более или менее прочные соединения с белками, отчего и зависит большая или меньшая легкость их освобождения из тканей. (Е.А.Розенфельд, 1951).

При экстрагировании измельченной ткани печени охлажденным физиологическим раствором до 90% всего гликогена органа переходило в экстракт, где он находился в состоянии, связанном с

белками, о чем говорили тот факт, что при добавлении к экстракту сернокислого аммония вместе с белками осаждался и гликоген, который в свободном состоянии такой концентрацией сернокислого аммония не осаждался. Эти данные свидетельствовали о том, что практически весь гликоген печени находится в комплексном соединении с белками этого органа, при этом степень прочности связей в образовавшихся комплексах не является одинаковой и определяется природой гликогено-белкового комплекса; она менее прочна в гликогено-глобулиновых комплексах и более прочна в комплексах, образованных другими белками клетки. (А.М.Генкин, 1953).

Таким образом, все проведенные исследования доказали возможность соединения гликогенов с белками, прочность связи между которыми может быть различной, чем и определяется большая или меньшая легкость выделения их из тканей. Поэтому понятие о легкоизвлекаемой и трудноизвлекаемой форме гликогена является очень относительным, благодаря чему вопрос о таком подразделении некоторый период времени оставался спорным. В настоящее время вопрос о существовании свободного и связанного гликогена большинством исследователей решен отрицательно.

Как показали исследования, гликоген может образовывать соединения не только с белками. Со времени открытия этого полисахарида известна реакция взаимодействия гликогена с йодом, в результате которой гликоген, находившийся в тканях, окрашивался йодом в винно-красный цвет. (С. *Bernard* , 1857). Несколько позже из мышц парализованных кроликов был выделен гликоген, который давал с йодом синее окрашивание. (С. *Bernard* , 1877). "Крахмалоподобное вещество", окрашивающееся в присутствии йода в синий цвет, было обнаружено также в головном мозгу (Д.Левберг, 1874). Наряду с этим в тканях живого организма были найдены полисахариды, которые в некоторых случаях вообще не давали окрашивания при соеди-

нению с Йодом (В.Пашутин, 1884).

Изучение Йодной реакции гликогенов, выделенных из тканей различных животных, показало, что гликогены мышц крысы, быка, морской свинки давали с Йодом коричнево-красную окраску, гликоген мышц кролика — красно-фиолетовую, гликоген сердца собаки — бледно-коричневую, а гликоген устрицы — коричнево-желтую окраску. (*G. Young*, 1937).

Вместе с тем, полисахариды, дающие с Йодом коричнево-красное окрашивание с некоторыми вариантами в оттенках, были обнаружены и в некоторых растениях (орхидея, сорго, кукуруза, эремурус Регеля), что отличало их по Йодной реакции от типичного полисахарида растений, крахмала, дающего в присутствии Йода синий цвет. (*A. Meyer*, 1886, *K. Meyer*, *M. Fuld*, 1949; Р.А.Баксова, 1958; Б.Н.Степаненко, Е.М.Афанасьева, 1959).

Приведенные данные о неодинаковой окраске, образующейся при реакции с Йодом полисахаридов различного происхождения, указывают на какие-то различия в строении исследуемых полисахаридов. Несомненно, что расшифровка механизма реакции, протекающей между Йодом и полисахаридом, могла бы пролить свет на те различия в структуре полисахаридов, которые определяют появление неодинаковой окраски в одной и той же реакции. Поэтому вопрос о механизме Йод-полисахаридной реакции явился предметом изучения многих исследователей.

При изучении зависимости изменения вязкости и скорости коагуляции Йод-крахмальных и Йод-амилозных комплексов от количества связанного Йода было установлено, что вязкость комплексов не изменялась до тех пор, пока в них не создавалось определенное соотношение Йода и полисахарида, после чего вязкость резко возросла. При тех же соотношениях Йода и полисахарида в комплексах

наступала и коагуляция под влиянием электролитов. (С.Недзвецкий, 1934). Исходя из полученных данных, автор полагал, что взаимодействие йода с полисахаридами имеет двойственный характер: с одной стороны здесь происходит истинная химическая реакция, с другой — адсорбционный процесс. Период неизменной вязкости и отсутствия коагуляции соответствовал настоящей химической реакции полисахарида с йодом, в результате которой образовывался йод-полисахаридный комплекс, обладавший способностью адсорбировать йод, вследствие чего затем получалось соединение с новыми свойствами, определяющими изменение вязкости, способность к коагуляции и т.д.

Определенную роль в расшифровке механизма йод-полисахаридной реакции сыграли расчеты пространственной модели декстринов Шардингера, показавшие, что диаметр просвета замкнутого кольца в ней составляет около 5 \AA , причем просвет по стенкам имеет как бы прокладку из водородных атомов, связанных с углеродными атомами каждого остатка глюкозы. Поэтому молекула йода, имеющая малый диаметр порядка $3,0 \text{ \AA}$, при взаимодействии с декстринами может разместиться внутри кольца и как бы раствориться в углеводородной прокладке, что, по мнению авторов, и приводит к образованию окрашенного продукта. (K. Freundberg, E. Schaaf, G. Dumpert, J. Ploetz, 1939). Сделанные при этом расчеты размеров витков, образуемых глюкозными остатками в цепях крахмала, допускают возможность размещения молекул йода внутри спиралей, так как виток имеет по оси около 8 \AA , а просвет витка около 5 \AA , в то время как малый диаметр молекулы йода составляет $3,8 \text{ \AA}$, а большой — $6,3 \text{ \AA}$. Следовательно, каждая молекула йода при взаимодействии с крахмалом может заполнить один виток молекулы этого полисахарида, обеспечивая ту или иную окраску в зависимости от количества витков в молекуде.

Исходя из сказанного, различия в окраске, наблюдаемые при реакции йода с полисахаридами, определяются различиями в структуре молекул полисахаридов. Об этом же свидетельствуют колориметрические исследования йод-полисахаридной реакции, проведенной с гликогенами и крахмалами различного происхождения, имеющими значительные структурные отличия, дающие и резкую разницу в окраске в присутствии йода. (K. Meyer, P. Beznfeld, 1941). На основании своих исследований авторы высказали положение о том, что окрашивание, возникающее при реакции полисахарида с йодом, связано с коллоидным состоянием вещества и определяется степенью ветвления полисахарида, участвующего в этой реакции.

При сопоставлении величин, характеризующих степень ветвления полисахаридов, с окраской их в присутствии йода была установлена зависимость между структурой полисахарида и его йодной реакцией на том основании, что неразветвленная амилоза давала с йодом синее окрашивание, амилопектин со степенью ветвления, равной 0,04 - сине-фиолетовое окрашивание, крахмал кукурузы со степенью ветвления 0,06 - красно-фиолетовое окрашивание, гликоген со степенью ветвления 0,09 - коричнево-красное окрашивание, остаточный декстрин гликогена со степенью ветвления 0,13 - светлокоричневое окрашивание. (K. Meyer, 1943). На основании результатов своих исследований автор пришел к выводу, что с увеличением степени ветвления полисахарида окраска при реакции его с йодом меняется от синей к красной и коричневой.

Несколько позже появились указания на то, что оттенок и интенсивность окраски, развивающейся при йодной реакции с полисахаридами, зависит от длины наружных ветвей молекулы полисахарида, участвующего в реакции. (M. Swanson, 1948). Об этом же

свидетельствуют данные, полученные при изучении фосфорилазной реакции, когда при достаточном количестве гликозо-1-фосфата и полисахаридного активатора, но малых концентрациях фосфорилазы синтезировались длинные полисахаридные цепи, дающие с йодом синюю окраску, а при наличии больших количеств фермента синтезировались полисахариды с короткими цепями, окрашивающиеся в растворе с йодом в желто-коричневый цвет. (И.Ф.Гулий, А.Н.Коломейченко, 1947).

В дальнейшем было показано, что окрашивание амиллозы в присутствии йода в синий цвет сопровождается образованием комплексного химического соединения; при этом молекулы йода располагаются внутри спирально изогнутых цепочек амиллозы, а окрашивание амиллопектина в красно-фиолетовый цвет является результатом образования адсорбционных соединений. (В.А.Кретович, 1952). Очевидно, поэтому полисахариды, находящиеся в соединении с белками, в присутствии йода вообще не образуют окрашенных продуктов. (Б.Н.Степаненко, А.Н.Петрова, Е.А.Розенфельд, 1951).

Огромную роль в изучении структуры полисахаридов в связи с изучением йод-полисахаридной реакции сыграли исследования, в которых окраска, развивающаяся при этой реакции, оценивалась не визуальнo, а при помощи фотометра путем снятия абсорбционных кривых. (Б.Н.Степаненко, Е.М.Афанасьева, 1947). Методика, разработанная авторами, позволила регистрировать положения абсорбционных максимумов в различных областях спектра, а высота этих максимумов выражала количественные различия оттенков, даваемых с йодом различными полисахаридами. Оказалось, что абсорбционные соединения йода с гликогенами мышц и печени кроликов имели близкие по характеру абсорбционные кривые, в то время как

соответствующие кривые соединений йода с гликогенами мышц и печени лягушки характеризовались иным максимумом поглощения. Вместе с тем абсорбционные кривые соединений с йодом гликогенов печени и мышц кроликов располагались выше, чем соответствующие кривые для гликогенов, выделенных из печени лягушек. Следовательно, сравнение абсорбционных кривых соединений гликогенов с йодом позволяло выявить структурные отличия, имевшиеся в гликогенах, полученных из различных органов и от различных животных, так как положение максимума абсорбции и высота расположения кривых определяется длиной наружных ветвей молекулы полисахарида.

Как показали исследования (Б.Н. Степаненко, 1947; Б.Н. Степаненко, Е.И. Афанасьева, 1948), взаимодействие полисахарида с йодом является сложным процессом, в котором наряду с комплексообразованием имеет место адсорбция. При изучении абсорбционных кривых, полученных при реакции гликогенов и апогликогенов с йодом, ими было установлено, что в спиралях из 7 - 13 глюкозных остатков могут находиться 2-3 молекулы йода. При этом, если до расщепления полисахарида в его молекуле имелись наружные ветви, состоящие из 7 - 13 глюкозных остатков, то отщепление мальтозы приводит к потере периферически расположенной молекулы йода, следствием чего является снижение экстинкции. Если же первоначально в спирали имелось 9-12 глюкозных единиц, то отщепление одного или же двух мальтозных остатков не отражается на числе находящихся в спирали молекул йода, а поэтому изменения экстинкции не наблюдается. При одновременном расщеплении различных фракций с различной длиной боковых цепей эти явления суммируются, что приводит к образованию той или иной абсорбционной кривой.

Выяснив предварительно влияние температуры, реакции среды, методов получения, специфики органов и вида животных на абсорбционные кривые соединений гликогена с йодом, детально изучив абсорбционные кривые выделенных гликогенов и апогликогенов, авторы выдвинули теорию о возможности комплексообразования йода с полисахаридами. (Б.Н.Степаненко, Е.М.Афанасьева, 1949).

Согласно этой теории при йод-гликогеновой реакции молекулы йода располагаются в витках спиралей боковых цепей полисахарида. При таком положении условия для абсорбции света будут различны, если свет будет проходить через ряд строго ориентированных одна за другой молекул йода (в случае анизотропии) или если на пути света будут находиться различным образом ориентированные молекулы йода, разделенные тем или иным количеством глюкозных остатков (в случае апогликогенов и гликогенов).

Позже была установлена связь между характером йодной реакции гликогенов и современными представлениями о механизме взаимодействия йода с полисахаридами в этой реакции. (Е.М.Афанасьева, 1954). Проведенные ею исследования показали, что уже в самом начале расщепления гликогена печени кролика происходит изменение положения абсорбционного максимума соединения с йодом соответствующего апогликогена, в результате чего характер кривой становится таким же как для йод-гликогена лягушки. При дальнейшем расщеплении при постоянном положении максимума абсорбции происходит постепенное уменьшение экстинкции. Кривая падения экстинкции в зависимости от степени расщепления гликогенов имеет ступенчатый характер, при этом в случае расщепления гликогена кролика кривая снижения экстинкции имеет две ступеньки, а в случае расщепления гликогена лягушки — одну ступеньку. Ступенчатое падение экстинкции по мере постепенного ускорения наружных ветвей молекул

гликогенов говорит в пользу образования спиральных структур комплексов йода с наружными ветвями гликогенов. При этом сдвиг максимума поглощения абсорбционных соединений полисахаридов с йодом в коротковолновую часть видимого спектра и уменьшение экстинкции при укорочении наружных ветвей в молекуле является общим для гликогена и крахмала. Следовательно, установленная закономерность, по-видимому, является характерной для всех полисахаридов при взаимодействии их с йодом.

Вышеприведенные исследования йод-гликогеновой реакции с точным количественным учетом окрашенных продуктов позволили в значительной степени уточнить строение различных гликогенов и установить связь между особенностями строения и свойствами различных гликогенов в отношении йодной реакции. В частности, установлено, что укорочение наружных ветвей гликозных остатков в молекуле гликогена ведет к изменению окраски и уменьшению ее интенсивности при йодной реакции, что дает основание сделать заключение о прямой зависимости между длиной наружных ветвей полисахаридов и интенсивностью окраски при соединении полисахарида с йодом. (Е.М. Афанасьева, 1954). Изучив строение как центральной, так и периферической части молекул некоторых гликогенов, авторы этих исследований пришли также к выводу, что тип строения гликогенов, полученных от различных видов животных, является одинаковым, поскольку в них наружные ветви молекул всегда длиннее внутренних. При этом обнаружены и некоторые отличия в структуре изученных гликогенов, заключающиеся в том, что как наружные, так и внутренние ветви молекул гликогенов кролика длиннее таковых лягушки. Если в гликогенах лягушки средняя длина наружных ветвей составляет 6-7 гликозных остатков, а внутренних

около 3, то в гликогенах кроликов эти величины соответственно равны 8-9 и 4-5 глюкозным остаткам (Б.Н. Степаненко, Е.М. Афанасьева, 1953; Б.Н. Степаненко, 1957).

О неединичной длине наружных ветвей различных полисахаридов были указания и в более ранних работах, где с помощью другого метода исследования, путем изучения расщепляемости полисахаридов бета-амилазой было установлено, что наружные ветви молекул гликогена короче, чем соответствующие ветви крахмала.

(W. Haworth, E. Hizst, F. Usherwood, 1937).

В более поздних работах с помощью этого же метода исследования было показано, что гликогены печени и мозга одного и того же животного расщепляются бета-амилазой не в одинаковой степени, что дало основание говорить о различной длине наружных ветвей этих полисахаридов. (Е.Е. Гончарова, 1957; Б.И. Хайкина, Е.Е. Гончарова, 1957). По данным этих авторов гликоген мозга имел меньшую степень расщепления бета-амилазой по сравнению с гликогеном печени, следовательно, во внешних цепях молекулы гликогена мозга имеется меньшее количество глюкозных остатков, чем в молекуле гликогена печени, откуда вытекает, что наружные ветви молекул гликогена мозга короче таковых молекул гликогена печени.

Используя сочетание энзиматического метода с методом метилирования, оказалось возможным показать, что наружные ветви молекул гликогена молисна "беззубки", подвергавшиеся действию бета-амилазы, состоят из 6-7 глюкозных остатков, один или два из которых, находясь в местах ветвлений, остаются неотщепленными. (K. Meyer, M. Fuld, 1941). При этом точки ветвления по данным этих авторов отдалены друг от друга тремя - четырьмя глюкозными остатками со свободными гидроксильными группами во 2-ом,

3-ей и 6-ой положениях, следовательно, в изученном гликогене наружные ветви длиннее внутренних, а молекула гликогена представляет собой подобие многократно ветвящегося куста. При аналогичных исследованиях гликогенов других видов животных, в частности, гликогенов печени кроликов, так же было установлено наличие более длинных наружных ветвей по сравнению с внутренними в молекулах всех исследуемых препаратов гликогенов. (*D. Bell, D. Manness, 1951, 1952; B. Yellingworth, J. Larner, G. Cozi, 1952*).

Таким образом, с помощью различных методов исследования было показано, что в многократно разветвленных молекулах различных полисахаридов наружные ветви, как правило, длиннее внутренних. При этом изучение обмена гликогена мышц и печени лягушек с помощью дейтерия, показало, что процесс включения радиоактивного водорода в гликогене печени идет только в наружных ветвях молекулы, в то время как в гликогене мышц этот процесс идет как в периферических, так и во внутренних частях молекулы. (*Н. И. Виноградова, 1949*).

Огромное значение для выяснения структуры гликогена имели работы, посвященные изучению типа связей между гликосными остатками, образующими наружные и внутренние ветви полисахарида, а также связей, имеющихся в местах ветвления его древовидной молекулы.

Для решения этого вопроса в ранних исследованиях использовался метод метилирования, основанный на том, что при полном метилировании сахаров водородные атомы всех свободных гидроксильных замещаются метильными группами; при этом гидроксилы, за счет которых одни гликосные остатки в молекуле полисахарида связаны с другими, не метилируются. После кислотного гидролиза метилированного полисахарида получают различные метилированные сахара,

по строению которых можно судить о связях, имевшихся в исследуемом полисахариде, учитывая, что 2,3,4,6 - тетраметилогликоза образуется из концевых гликозных остатков, 2,3,6 - триметилогликоза образуется из остальных гликозных остатков, соединенных α -1,4 - связью, а 2,3 - диметилогликоза образуется из гликозных остатков в местах ветвления полисахарида, где имеются α -1,4 и α -1,6 - связи. (W. Haworth, E. Hirst, 1936). Используя этот метод для выяснения структуры молекул гликогенов, авторы пришли к заключению, что основным типом связи между гликозными остатками, образующими полисахарид, является связь между первым и четвертым углеродными атомами. Вместе с тем в исследуемых гликогенах были обнаружены и α -1,6 - связи, представляющие собой точки ветвления.

Наличие α -1,4 и α -1,6 - связей в молекулах полисахаридов было подтверждено также энзиматическим методом. При изучении расщепляемости гликогенов бета-амилазой было обнаружено, что этот полисахарид расщепляется лишь на 45%. Это позволило сделать вывод о том, что α -1,4 - связями соединена лишь часть гликозных остатков, а прекращение дальнейшего действия бета-амилазы свидетельствовало о наличии α -1,6 - связей в молекуле исследуемого полисахарида, поскольку бета-амилаза неспособна расщеплять эти связи. (W. Haworth, E. Hirst, F. Usherwood, 1937).

В дальнейшем было установлено, что содержание α -1,4 и α -1,6 - связей в молекулах полисахаридов оказывает влияние на скорость не только энзиматического, но и кислотного гидролиза, при этом полисахариды, в молекулах которых имеется значительное количество α -1,6 - связей, гидролизуются медленнее, чем те полисахариды, в молекулах которых имеются преимущественно

α -1,4 - связи. Так амилоза гидролизруется быстрее гликогена и бета-декстрина, а декстран - полисахарид, имеющий преимущественно α -1,6 - связи, подвергается гидролизу медленнее, чем гликоген, что свидетельствует об изменении свойств полисахаридов в зависимости от содержания тех или иных связей между молекулами глюкозы в его молекуле. (M. Swanson, C. Cori, 1948).

С помощью хроматографического анализа гидролизатов, полученных в результате частичного кислотного гидролиза гликогенов, среди продуктов гидролиза, удалось обнаружить изомальтозу в виде октаацетата, что доказывало правильность положения о существовании точек ветвления в молекуле гликогена в местах образования α -1,6 - гликозидных связей. (M. Wolfson, A. O'Neil, 1949).

Вместе с тем имеются указания на то, что наряду с α -1,6 и α -1,4 - связями в молекулах полисахаридов существуют также α -1,2 и α -1,3 - связи, которые удалось обнаружить ряду исследователей в гликогене и амилоп^ептине крахмала. (D. Bell, 1948; V. Barry, F. Halsall, E. Hirst, J. Jones, 1949; J. Gibbons, R. Boissonas, 1950; M. Wolfson, A. Thompson, 1957). При этом авторы указывают, что число этих связей в молекулах полисахаридов крайне невелико и большинство связей ветвления как в гликогене, так и в крахмале находится в α -1,6 - положении.

Как показали исследования, количество связей ветвления в различных разветвленных полисахаридах неодинаково, а, следовательно, они отличаются друг от друга по степени ветвления. О степени ветвления полисахаридов оказалось возможным судить по величине единицы цепи, которая показывает количество глюкозных остатков, приходящееся на каждый концевой неальдегидный конец молекулы разветвленного полисахарида. Поскольку степень ветвления

полисахарида определяется отношением количества глюкозных остатков, представляющих собой точки ветвления, к общему числу глюкозных остатков в его молекуле, эта величина является обратной по отношению к величине единицы цепи, так как при большом количестве точек ветвления число последних можно считать равным числу концевых неальдегидных групп. Следовательно, зная величину единицы цепи, можно определить и степень ветвления полисахарида, как величину, обратную найденной величине единицы цепи.

В первых работах, посвященных изучению этой величины, средняя единица цепи для гликогена была найдена равной 12, а для амилопектина 24 глюкозным остаткам. (*W. Haworth, E. Percival, 1931, 1932*). Эти данные были подтверждены в других исследованиях. (*D. Bell, 1936*).

Вместе с тем было показано, что единица цепи гликогенов, синтезируемых в печени животных, менялась при кормлении голодавших животных галактозой; при этом поступление в организм животного галактозы способствовало образованию в печени гликогенов с более высокой единицей цепи, равной 18-ти глюкозным остаткам, вместо обычных 12-ти. (*D. Bell, 1936*). Аналогичные результаты, свидетельствующие об изменении единицы цепи гликогенов в сторону повышения, были получены при кормлении животных сахарозой.

(*J. Bacon, E. Baldwin, D. Bell, 1944*). Авторы показали, что поступление в организм сахарозы способствовало синтезу в печени животного необычного гликогена, приближающегося по структуре к амилопектину, с единицей цепи, равной 18-ти глюкозным остаткам; при этом введение животным фруктозы приводило к образованию обычно получаемого из печени гликогена с 11-ю или 12-ю глюкозными остатками, приходящимися на каждый концевой неальдегидный

конец молекулы изучаемого полисахарида. В других исследованиях, проведенных с помощью метода периодатного окисления, введение галактозы внутрибрюшинно или через пищеварительный тракт не приводило к увеличению величины единицы цепи гликогенов, выделенных из печени кролика, морской свинки и лошади. (M. Abdel-Akher, F. Smith, 1951). По данным этих авторов во всех случаях исследования, независимо от вида животного, единица цепи составляла 12 гликозных остатков.

Однако, с помощью этого же метода исследования при проведении экспериментов по изучению величины единицы цепи гликогенов в более широком плане, вновь была показана возможность изменения исследуемой величины в зависимости от вводимого в организм сахара. (M. Schlamowitz, 1951). В этих экспериментах изучалась величина единицы цепи гликогенов печени кроликов при нормальном питании и при инъекциях различных углеводов, таких как глюкоза, фруктоза, галактоза, сахароза. По данным этого автора единица цепи гликогенов печени кроликов в норме состояла не менее, чем из 19 гликозных остатков, повышаясь при инъекциях вышеуказанных веществ до 28. Исследованные им одновременно гликогены устриц и печени собаки имели единицу цепи, равную 11-ти или 12-ти гликозным остаткам. Указывая, что изученные препараты чисты на 98-100%, автор сделал заключение, что единица цепи и степень ветвления гликогенов являются функцией вводимого сахара, полагая при этом, что способ введения углеводов в организм, возможно, оказывает влияние на строение синтезируемого в печени полисахарида.

В более поздних работах при изучении химического строения гликогенов различных видов животных было установлено, что

единица цепи не является абсолютно постоянной величиной для всех гликогенов. Она характеризуется различными цифрами для гликогенов синтезируемых в организме разных животных (Е.М.Афанасьева, Б.Н.Степаненко, 1956). По данным этих авторов единица цепи гликогенов печени кролика равна 13-ти или 14-ти глюкозным остаткам, а для гликогенов печени лягушки эта величина колеблется от 10-ти до 12-ти глюкозных остатков. При этом определение единицы цепи бета-декстринов, полученных из гликогенов печени лягушки, давало меньшие величины, чем соответствующие величины единицы цепи, определенные для бета-декстринов, полученных из гликогенов печени кроликов.

Гликогены, выделенные из различных органов одного и того же животного, также характеризовались различной величиной единицы цепи (Е.Е.Гончарова, 1957; Б.И.Хайкина, Е.Е.Гончарова, 1957). По данным этих авторов средняя величина единицы цепи в молекуле гликогена печени кроликов оказалась равной 16-ти глюкозным остаткам, а соответствующая величина, найденная для гликогенов мозга, равнялась в среднем 12,5-ти глюкозным остаткам.

Все эти данные свидетельствуют о том, что в органах животных синтезируются гликогены, имеющие различную степень ветвления, а, следовательно, они отличаются друг от друга по своей структуре, что выражается не только в неодинаковой разветвленности этих полисахаридов, но и в различии общего содержания глюкозных остатков в их молекулах. Тот факт, что молекулы различных гликогенов содержат неодинаковое количество глюкозных остатков, вытекает из определения молекулярного веса этих гликогенов.

Определение молекулярного веса гликогенов по скорости его седиментации и диффузии показало, что для гликогенов мышц лошади,

кролика и человека эти величины выражаются соответственно цифрами $2,9 \cdot 10^6$, $2,6 \cdot 10^6$ и $2,4 \cdot 10^6$, а молекулярный вес гликогена печени кролика равняется $4,4 \cdot 10^6$ (D. Bell, H. Gutfreund, R. Cecil, A. Ogston, 1948).

При определении молекулярного веса осмометрическим методом молекулярный вес для гликогена печени кролика оказался равным $0,7 \cdot 10^6$ в водном растворе и $2 \cdot 10^6$ в солевом растворе, а для гликогена ткани аскариды эти данные были соответственно равны $0,1 \cdot 10^6$ и $0,5 \cdot 10^6$ (H. Oakley, T. Young, 1936). Определение молекулярного веса гликогена печени собаки этим же методом дало величину, приближающуюся к одному миллиону. (R. Kerr, F. Cleveland, W. Katzbek, 1951). При нефелометрическом определении молекулярного веса эта величина для гликогена печени кролика была найдена равной $5,6 \cdot 10^6$, а для гликогена мышц кролика $1,5 \cdot 10^6$. (H. Staudinger, 1948). В других экспериментах с применением этого же метода исследования молекулярный вес для гликогена печени кролика был найден равным $6,8 \cdot 10^6$, а для гликогена мышц того же животного — $2,8 \cdot 10^6$ (B. Nazdar, D. Manness, 1952).

При определении молекулярного веса гликогена печени кролика химическим методом, основанном на обнаружении свободной альдегидной группы полисахарида, полученная величина молекулярного веса колебалась для различных препаратов в пределах от $0,2 \cdot 10^6$ до $0,6 \cdot 10^6$ (R. Meyer, J. Noelting, P. Bernfeld, 1948). Данные, полученные с помощью этого же метода исследования для нескольких образцов гликогена печени кролика и лягушки, показывали, что эта величина для печеночных гликогенов кроликов колебалась от $0,22 \cdot 10^6$ до $1,13 \cdot 10^6$, а для соответствующих гликогенов лягушки от $0,14 \cdot 10^6$ до $0,66 \cdot 10^6$ (Б.Н. Степаненко, Е.М. Афанасьева, 1953, 1954).

При определении молекулярного веса гликогенов по модифицированному методу Мейера для мышечного гликогена кролика эта величина выражалась цифрой $0,15 \cdot 10^6$, для печеночного гликогена лягушки соответственно $0,13 \cdot 10^6$, а для различных образцов препаратов гликогенов, выделенных из печени кроликов, она колебалась от $0,12 \cdot 10^6$ до $0,51 \cdot 10^6$ (А.С.Кайнова, 1953).

Приведенные данные свидетельствуют о значительном различии в количестве глюкозных остатков, входящих в молекулы гликогенов, выделенных из однотипных органов разных животных, а также из различных органов одного и того же животного, что указывает на отличия в структуре этих полисахаридов, доказанные и другими методами исследования.

Сопоставляя результаты всех этих исследований, дающих представление о количестве глюкозных остатков, входящих в молекулу полисахарида, о степени ветвления этой молекулы, о длине наружных и внутренних ветвей ее, оказалось возможным составить вполне определенное представление о структуре гликогенов. Из приведенных исследований вытекает, что, несмотря на некоторые структурные различия, тип строения всех изученных гликогенов одинаков. Они представляют собой сильно разветвленные структуры, что придает им форму, близкую к сферической. Эти структуры состоят из связанных между собой α -гликозидной связью остатков глюкозы, что дает основание считать молекулярной эмпирической формулой их $(C_6H_{10}O_5)_n$. Подавляющее большинство глюкозных остатков в молекулах гликогенов соединено α -1,4-гликозидными связями, и лишь незначительная часть остатков глюкозы связана α -1,6-гликозидными связями. Этот последний способ соединения имеет место в точках ветвления глюкозных цепей, при этом в разветвленных молекулах гликогенов, как правило, наружные ветви длиннее

внутренних. Вопрос о расположении в молекулах гликогена каких-либо других связей, помимо α -1,4 и α -1,6 - гликозидных связей, пока еще окончательно не решен, так как в тех случаях, где они обнаружены, число их крайне невелико.

Такое представление о строении молекулы гликогена, естественно, приводило к мысли о том, что на одном из концов ее находится гликопиранозное кольцо, имеющее свободную альдегидную группу.

Проведение в этом направлении исследования подтвердило это положение, доказав, что в молекулах разветвленных полисахаридов, состоящих из большого количества глюкозных остатков, имеется лишь одна альдегидная группа, вернее, ее полуацетальный гидроксил.

(С. Dumasert, R. Seneguer, 1948; J. Schoch, 1949;

О.Н. Панченко, 1950; Е.Л. Розенфельд, О.Н. Панченко, 1952).

Имеется также указание на то, что макромолекулы высших углеводов, наряду с элементарными звеньями, представляющими собой остатки α -гликопиранозы, должны содержать также гидратированные элементарные звенья с открытой цепью. Содержание таких звеньев определяется степенью дегидратации и условиями, в которых она протекает (А.А. Стрепикеев, 1949).

Наряду с этим высказывается предположение, что гликоген является полимальтозидом, эмпирическая формула которого не $(C_6H_{10}O_5)_n$, а $(C_{12}H_{22}O_{11})_n$, и кислотный гидролиз его выражается не уравнением $(C_6H_{10}O_5)_n + nH_2O = nC_6H_{12}O_6$, а уравнением $(C_{12}H_{22}O_{11})_n + nH_2O = 2nC_6H_{12}O_6$. (С. 1950). Однако, экспериментальные доказательства, приводимые в пользу этого положения, нельзя считать достаточно вескими, в то время, как ранее приведенное представление о структуре полисахаридов подтверждено путем синтеза гликогенов

(А.С. Кайнова, 1953; А.С. Кайнова, Б.Н. Степаненко, А.Н. Петрова,

1954; Б.Н.Степанено, А.С.Кайнова, 1954; Б.Н.Степаненко, 1955, 1959). В этих исследованиях синтез гликогенов осуществлялся с помощью ферментов фосфорилазы и изомеразы амилозы (α - 1,4 - глюкокан: α - 1,4-глюкан-6-глюкозилтрансферазы), выделенных из мышц, в присутствии глюкозо-1-фосфата и небольших количеств гликогена, используемого в качестве "затравки". Контроль за ходом синтеза осуществлялся путем наблюдения за изменением окраски в присутствии йода, а количественные наблюдения велись по нарастанию неорганического фосфата и содержания полисахарида в инкубационной смеси. Полученные в процессе синтеза препараты после очистки по аналитическим данным, по величине молекулярного веса и единицы цепи, по длине наружных и внутренних ветвей, а также по расщепляемости их бета-амилазой были близки к природным гликогенам. Вместе с тем они также, как природные гликогены, образовывали соединения с йодом, давая соответствующие йод-гликогеновые кривые, и комплексовались с белками, давая спектры поглощения в ультрафиолете с характерным сдвигом максимума поглощения в коротковолновую часть спектра.

Таким образом, благодаря вышеуказанным исследованиям была подтверждена описанная ранее структура молекул гликогена, который, будучи синтезирован препаративным путем, оказался именно таким, каким его охарактеризовали исследователи на основании результатов изучения природных гликогенов с помощью различных химических и энзиматических методов.

Характеризуясь соответствующими показателями, определяющими общий тип строения полисахарида, структура молекул гликогена не является при этом строго постоянной - она может изменяться под влиянием самых разнообразных воздействий на организм

животного, в котором образуется этот полисахарид. В пользу этого положения говорят данные целого ряда экспериментальных исследований. В частности, установлено, что молекулярная структура мышечного гликогена лягушек изменяется после воздействия на организм животного стрихнином (И.И.Виноградова, А.А.Кобзева, 1950). Авторы исследовали гликогены, выделенные из мышц лягушек сразу после стрихниновых судорог, через трие суток после судорог а также гликогены мышц нормальных лягушек. Оказалось, что эти гликогены существенно отличались друг от друга. Это выразилось в том, что гликогены, выделенные из интенсивно сокращавшихся мышц, давали абсорбционные кривые с пиком, лежащие выше, чем одновременно исследованные контрольные препараты гликогенов. Изменялась также способность гликогена расщепляться бета-амилазой. После трехдневного отдыха животных вместе со значительным нарастанием количества гликогена в мышцах происходили и определенные качественные изменения выделенного из них гликогена, что выразалось в увеличении расщепляемости их бета-амилазой и приближении абсорбционных кривых соединений этих гликогенов с пиком к контрольным. А это могло явиться лишь результатом изменения структуры гликогенов в связи с определенными сдвигами в функциональном состоянии животного.

Наличие структурных особенностей в гликогенах, выделенных из органов животных, находившихся при различных функциональных состояниях, было убедительно показано также с помощью хроматографического метода исследования (В.В.Ковальский, 1947, 1948). Автор показал, что хроматограммы гликогенов, выделенных из органов различных животных, а также из различных органов одного и того же животного, отличались друг от друга количеством

полученных фракций, высотой их расположения и оттенком окраски при взаимодействии с раствором йода, при этом характер получаемых хроматограмм изменялся в зависимости от состояния животных, от режима их содержания и даже от времени года, что свидетельствовало об изменении структуры молекул исследуемых полисахаридов в связи с воздействием на организм соответствующих факторов.

С помощью хроматографического метода исследования изучалась также структура гликогенов, выделенных из органов животных, подвергавшихся действию более сильных факторов, влияющих на функциональное состояние организма (Х.С.Коптоянц, 1947; З.А.Янсон, 1950; Х.С.Коптоянц, З.А.Янсон, 1950; З.А.Янсон, 1951). Авторы изучали характер хроматограмм гликогенов икроножной мышцы белой крысы после ее денервации и в процессе регенерации нерва в сравнении с хроматограммами гликогенов, выделенных из мышц контрольных животных, не подвергавшихся вышеуказанным воздействиям.

Результаты этих исследований свидетельствовали о том, что, если хроматограмма гликогена нормальной мышцы характеризовалась наличием 5-7 окрашенных зон, то после денервации мышцы картина соответствующей хроматограммы значительно упрощалась. Уже на 3-й или 4-й день после денервации в ней определялось две зоны, а через 8-9 дней в хроматограмме обнаруживалась лишь одна зона, что свидетельствовало об изменении структуры гликогена, который терял способность расслаиваться на абсорбционной колонке. При регенерации нерва и восстановлении связи мышцы с нервной системой на хроматограмме мышечного гликогена вновь появлялась вторая полоса, что наблюдалось через 35-40 дней после начала эксперимента, а к 45-50 дням исследования хроматограмма исследуемого гликогена еще более усложнялась, приближаясь к норме. Приведенные данные свидетельствуют о том, что в зависимости

от нервно-трофических воздействий в мышечной ткани синтезируются гликогены, отличающиеся по своей структуре, поскольку характер хроматограммы определяется структурными особенностями молекул гликогена, подвергаемого анализу.

Изменение структуры гликогена скелетной мускулатуры при денервации мышцы было обнаружено и другими исследователями (A. Bass, Z. Vodicka, 1955). По данным этих авторов денервация конечностей кролика приводила к синтезу в скелетной мускулатуре этой конечности гликогена, содержащего большее количество остатков глюкозы, занимающих крайнее положение в цепи, по сравнению с нормальными гликогенами. Аналогичные изменения в структуре гликогенов мышц наблюдались также при неспецифическом раздражении задней конечности кролика в области портняжной мышцы.

Хроматографический анализ продуктов гидролиза гликогенов, полученных из органов животных, находившихся в различных физиологических состояниях, позволил обнаружить качественные особенности структуры гликогена, синтезируемого в печени при беременности (S. Peat, P. Roberts, W. Whelan, 1952). Результаты исследований этих авторов свидетельствовали о том, что гликогены, выделенные из печени беременной крольчихи, имели в своем составе наряду с глюкозой также и фруктозу. Это дает основание полагать, что при некоторых состояниях организма структура гликогена может изменяться настолько существенно, что молекулы его могут содержать наряду с глюкозой и другие моносахариды.

О том, что строение молекул гликогенов может изменяться под влиянием различных факторов, убедительно говорят результаты исследований структуры полисахаридов, синтезированных *in vitro*

гомогенатами мозга кроликов, находившихся в период предшествующей жизни при различных функциональных состояниях (Е.Е.Гончарова, 1963). Автором показано, что при синтезе полисахаридов *in vitro* с помощью ферментов, находившихся в гомогенатах мозга кроликов, забитых в состоянии покоя, возбуждения и торможения, структура полученных гликогенов характеризовалась некоторыми отличительными признаками. Это выразилось в том, что полисахариды, образованные ферментами мозга кроликов, находившихся в состоянии возбуждения, имели большую степень ветвления и более короткие наружные ветви молекул, чем те, которые получены с помощью гомогенатов мозга кроликов, находившихся в состоянии торможения. В свою очередь, полисахариды, образованные гомогенатами мозга кроликов, находившихся в состоянии торможения, отличались по структуре от полисахаридов, синтезированных ферментами гомогенатов мозга кроликов, находившихся в состоянии покоя.

Результаты всех приведенных выше исследований убедительно показывают, что структура гликогенов, синтезируемых в органах животного организма, подвержена значительным изменениям, что зависит не только от вида животного или специфики органа, но и от функционального состояния организма. Это свидетельствует о том, что гликоген является важным ингредиентом обмена веществ и играет существенную роль в процессах жизнедеятельности организма.

2. ЗНАЧЕНИЕ ГЛИКОГЕНА ДЛЯ ЖИВОТНОГО ОРГАНИЗМА

Благодаря трудам большого количества исследователей к настоящему времени накопилось огромное количество работ, освещающих степень участия гликогена в межклеточном обмене углеводов и выясняющих значение его для животного организма.

Как показали эти исследования, главными местами отложения гликогена в организме высших животных и человека являются печень и мышцы, на долю которых приходится до 80% общего наличия этого полисахарида в организме. (Е.С. Лондон, 1935, 1936; Е.С. Лондон, Я.Л. Ловцкий, 1938 и др.). Оказалось, что содержание гликогена в этих органах подвержено значительным колебаниям, в частности в печени он обнаруживался в количествах от 0,9% до 4,4%, (Д.Е. Альперн, З.Н. Пожелужная, 1935), а в ряде случаев содержание его достигало 10% всего веса органа. (А.Л. Вилковский, 1941). Колебания в содержании гликогена в печени обнаруживались даже в течение суток, что совпадало с периодичностью митотического деления клеток. (Л.В. Соколова, 1964).

Исследования многих авторов свидетельствуют о том, что количество гликогена в печени и мышцах животного может существенно изменяться в зависимости от целого ряда факторов, действующих на организм. Установлено, что содержание гликогена в печени новорожденных животных подвержено значительным колебаниям в первые периоды постнатального существования. (*J. Martinek, J. Mikuláš, 1954; V. Niccolai, A. D'Anna, 1962; H. Chiodi, Z. Basa, 1963*). Определенное влияние на содержание гликогена в печени животного оказывает воздействие температуры окружающей среды (*P. Hahn, 1956; J. Guzek, 1955*), охлаждение лишь одной

конечности (Т.А.Ачкасова, 1953), питье воды различных температур (Василевский, 1874), а также термические ожоги кожи (М.А.Файн, 1964).

Существенное значение для поддержания того или иного уровня в содержании гликогена печени и мышц имеет питание организма. Количество гликогена в этих органах значительно изменяется при голодании животных (Г.Д.Губин, А.К.Оркина, 1959; С.Г.Генес, Л.М.Макаревич-Гальперин, С.Н.Ушенко, 1961; *P. Herbert, R. Mole, 1956; Z. Stolzman, M. Blawaska, Z. Roth, 1956; M. Cimellaro, V. Niccoli, 1963; J. Мочек, J. Slaviček, 1964*), а также при содержании их на различных диетах (Н.Коньков, 1876, С.Капланский, Ф.Свердлова, С.Капанская, 1945; В.И.Трусов, 1945; А.А.Брейтбург, 1949; А.П.Белова, 1949; *M. Kerley, J. Ottaway, 1954*).

Содержание гликогена в мышечной ткани, а также в печени, зависит от характера мышечной деятельности и от функционального состояния мышц (Н.Н.Яковлев, 1942, 1949; Л.И.Ямпольская, 1949; Н.Н.Яковлев, Л.И.Ямпольская, 1950), изменяется при аллергических реакциях (Д.Е.Альперн, Н.Н.Транквилимати, 1936; Э.М.Гельдштейн, А.С.Ачаркан, 1937; В.Елин, 1938; А.М.Чарный, П.Е.Сиркина, С.Э.Красовицкая, 1944; Н.Н.Транквилимати, 1952).

Большое влияние на содержание гликогена в вышеуказанных органах оказывает введение в организм животных гормонов, таких, как тироксин, инсулин, глюкагон, адреналин, норадреналин, кортизон, адренокортикотропный гормон, тестостерон, гормон зубной железы, экстракт, полученный из задней доли гипофиза (В.Н.Галахова, 1959; Я.А.Лазарис, 1940; М.М.Эйдельман, 1940; С.М.Лейтес, Т.Я.Якушева, 1948; В.И.Гончарова, 1963; Н.С.Бывшук, 1963;

J. Beattie, 1954; *W. Williams*, *R. Davis*, *C. Lowe*, 1956; *S. Leonard*, 1955; *A. Kar*, *A. Roy*, *R. Chakravarty*, 1955; *E. Pora*, *V. Toma*, *J. Madar*, 1962; *W. Ewald*, *H. Hübener*, *E. Wiedemann*, 1963; *O. Sovik*, *O. Walaas*, 1964; *S. Herzberg*, *J. Verne*, 1964; *J. Man*, 1964; *C. Holt*, *J. Fischer*, 1964; *J. Rostafinska*, *L. Rejniak*, *H. Krutue*, 1964; *H. Sie*, *W. Fishman*, 1964, а также ферментов (*R. Feinstein*, *M. Cocoon*, *J. Leaholm*, 1964).

Введение в организм различных химических веществ также существенно влияет на количество гликогена в исследуемых органах. Изменения в содержании гликогена в печени и мышцах наблюдались как при введении в организм солей цинка, висмута, ртути, меди, четыреххлористого углерода (Лебедев, 1869; Ф. Карницкий, 1870; О. И. Воинар, В. Н. Галахова, 1962; А. О. Никонова, 1964; *B. Arizzi*, 1964), так при введении органических веществ — глюкозы, фруктозы, аскорбиновой кислоты, серотонина, хлорпроамида, α -нафтил-азотиоционата и сердечных гликозидов (З. М. Волинский, 1947; *D. Wied*, 1953; *L. Mazzanti*, *M. Lopez*, 1953; *R. Levine*, *L. Resch*, *G. Kleatskin*, *M. Giazman*, 1964; *A. Bezinger*, *H. Thaler*, 1964; А. И. Черкес, 1949; С. Г. Генес, Л. М. Макаревич-Гальперин, 1964), а также и при воздействии на организм наркотических средств (И. А. Лерман, 1939, 1943; Т. И. Беслекоев, 1951; *H. Annamunthodo*, *V. Keating*, *S. Patrick*, 1958).

Содержание гликогена в печени и мышцах не остается постоянным и при облучении организма ультракороткими радиоволнами или рентгеновскими лучами (Н. И. Вещезеров, 1935; Г. П. Торопова, 1959; Р. Я. Кейлина, 1959; *P. Fischer*, 1954; *B. Zagzebaek*, *S. Abraham*, *Y. Chaikoff*, 1964; *D. Bonsignore*, *C. Canonica*, *O. Sartori*, *L. Benzerini*, 1963). К изменению содержания гликогена в печени приводит также раздражение коры головного мозга животных индук-

ционным электрическим током (Р.А.Кейлина, 1950), общее воздействие электрического тока на организм (И.Р.Рунде, 1964), денервация печени (Н.Б.Медведева, 1936), перелом костей конечностей (У. Wray, 1964), а также шоковое состояние организма (А.М.Чарный, Н.Е.Сыркина, С.Э.Красовицкая, 1944).

Как показали исследования, гликоген содержится не только в ткани двигательной мускулатуры организма, но и в мышечной ткани матки, где содержание его заметно изменяется при различных функциональных состояниях этого органа. Количество гликогена в мышечной ткани матки резко повышается при беременности; при этом в развивающейся плаценте также обнаруживается гликоген, содержание которого повышается с увеличением срока беременности. (Н.Л.Василевская, 1954, 1956; *U. Montemagno, V. Lauto, 1962; Y. Yoshida, 1964*). На содержание гликогена в матке оказывают влияние эстрогены, под влиянием которых количество этого полисахарида увеличивается; аналогичный, хотя и менее выраженный, эффект дает введение в организм животного гистамина (Н. Cacic, *J. Bitman, 1964*). Отрицательное влияние на содержание гликогена в матке оказывает удаление у животных яичников (*W. Vo, M. Smith, 1964*).

Гликоген обнаружен не только в печеночной и мышечной тканях животного организма. Как показали исследования, гликоген является также постоянной составной частью крови, где он имеется как в форменных элементах, так и в плазме. (Л.С.Шварц, Г.Н.Покровская, 1935; А.М.Кузин, Э.А.Макаева, 1941; С.А.Брайловский, А.М.Генкин, 1936, 1937, 1938; С.В.Захаров, 1941; А.М.Генкин, 1939; К.Воскресенский, 1907; А.Д.Берштейн, 1948; *J. Golandas, 1935; E. Unshelm, 1935*). Общее содержание этого полисахарида в крови человека характеризуется небольшими величинами, соответствующими

7,5 - 11,7 мг%, при этом в форменных элементах крови содержится 69,6% всего гликогена и 30,4% его падает на долю плазмы.

(А.М.Генкин, 1939). Содержание гликогена в крови изменяется при воздействии на организм различных факторов - при введении глюкозы, различных гормонов и лекарственных препаратов, при физиологической беременности (А.М.Генкин, 1938, 1940; Г.А.Черкес, 1938; Г.В.Фетисова, 1948; *S. Mauro*, 1963), а также при патологических состояниях (Л.С.Шварц, С.Л.Гарзон, 1929; Г.А.Николаев, 1946; А.М.Генкин, 1939; А.Л.Михнев, 1950).

Несмотря на сравнительно низкое содержание, гликоген крови имеет важное физиологическое значение (Д.Е.Альперн, Н.Н.Транквилимати, 1958; П.Ф.Солдатенков, 1952; А.Д.Бернштейн, С.В.Захаров, В.И.Якубовская, 1949; А.Д.Бернштейн, Г.В.Фетисова, 1945; И.Гаджиев, А.И.Караев, М.Мустафаев, В.Эфендиева, 1947). Установлено, что некоторые органы и ткани усваивают углеводы преимущественно путем поглощения гликогена из крови. Таковыми органами являются, в частности, селезенка и легкие (Е.С.Лондон, 1936; Н.И.Архипов, 1964; М.Л.Дерновская, 1937; Я.С.Андросов, 1935, 1936; А.Д.Бернштейн, 1948). В определенных условиях гликоген из крови могут поглощать также кишечник, поджелудочная железа и почки (Н.Н.Потемкин, 1936).

Гликоген является также обязательным ингредиентом нервной ткани, где он обнаружен в коре больших полушарий головного мозга, в промежуточном мозгу, в мозговых оболочках и других отделах центральной нервной системы. Он содержится, кроме того, в периферических нервах, в межнейронных синапсах, в спинномозговых узлах (А.Л.Шабадаш, 1937, 1939, 1940, 1944, 1945, 1947, 1949; Б.И.Хайкина, Е.Е.Гончарова, 1957; С.С.Касабьян, 1954; *D. Svozad*,

1959; *V. Mathe, J. Kaszay, K. Hunkárk, L. Kiss*, 1959).

Присутствие гликогена установлено и в красном костном мозгу, где содержание его подвержено значительным колебаниям при воздействии на организм таких факторов, как эпинефректомия, а также введение инсулина или адреналина (В.И.Ходос, 1950, 1954).

Наличие гликогена доказано и в ткани надпочечников. При этом оказалось, что количество гликогена в этом органе заметно изменяется в различные сроки послеродового периода, при введении в организм животного адренокортикотропного гормона гипофиза, инсулина или адреналина, а также при воздействии холода или голодания (М.Калатозишвили, 1964; *N. Novle, E. Parageorge*, 1955).

Гликоген обнаружен, кроме того, в роговице глаза, в коже, в эпителии слизистой оболочки ротовой полости, матки, влагалища и вагинальном содержимом (А.А.Чернова, 1964; Н.Н.Васильева, 1955; С.С.Касабьян, 1956; К.И.Чернова, 1955; Н.Л.Василевская, 1954; Д.А.Новицкий, 1950; М.А.Даниахий, 1980). С помощью чувствительного глюкозооксидазного метода гликоген обнаружен даже в слюне (*J. Topi, V. Zane*, 1961). Как показали исследования, этот полисахарид начинает синтезироваться в тканях еще в период эмбрионального развития организма (*R. Thommes, C. Ferling*, 1964; О.А.Бердонгарова, 1964; Е.С.Детак, 1959). Все это свидетельствует о том, что гликоген является важным углеводным компонентом организма, где постоянно происходит синтез и распад этого полисахарида. Новообразование гликогена происходит даже в мышечной ткани, находящейся в замороженном состоянии (Н.Е.Павловский, 1956), что свидетельствует о наличии мощных ферментных систем, обеспечивающих этот синтез.

Согласно современным данным биосинтез высокомолекулярных полисахаридов происходит в тканях при участии ферментов, обладающих трансферазным действием. В синтезе гликогена принимают участие главным образом уридиндифосфат-глюково- α -глюкан - α -1,4-глюкозилтрансфераза или уридиндифосфатглюкоза: α -1,4-глюкан- α -4-глюкозилтрансфераза ^(гликогенсинтетаза) и α -1,4-глюкан: α -1,4-глюкан-6-глюкозилтрансфераза или амило-1,4 \rightarrow 1,6-трансглюкозилаза (ветвящий фермент), а также α -1,4-глюкан: ортофосфатглюкозилтрансфераза (фосфорилаза) и (трансглюкозилазы нефосфородитического типа (E. Figueira, A. Pfeiffer, H. Niemeyer, 1962; O. Hoffmann-Ostenhof, 1960; А.Н. Петрова, 1958).

Гликогенсинтетаза осуществляет свое действие в присутствии нуклеотидов, например, уридиндифосфатглюкозы (УДФГ), которая является одним из главных донаторов глюкозильных групп в трансферазной реакции, где акцептором служит гликоген-затравка или олигосахариды. Гликогенсинтетаза синтезирует α -1,4-связи в молекуле гликогена, перенося глюкозильные остатки с уридиндифосфатглюкозы на затравки гликогена или олигосахаридов (L. Leloir, C. Cardini, 1957; A. Beloff-Chain, F. Rocchiazzi, 1960; И.С. Луганова, И.Ф. Сейц, 1963; И.С. Луганова, Л.М. Розанова, И.Ф. Сейц, 1964). При этом источником глюкозильных групп при образовании уридиндифосфатглюкозы является глюкозо-1-фосфат, который образуется с помощью фосфоглюкомутазы из глюкозо-6-фосфата, получающегося в свою очередь в процессе гексокиназной реакции из глюкозы тканей. Поэтому процесс образования полисахарида состоит из двух этапов, в первом из которых глюкозо-1-фосфат взаимодействует с уридинтрифосфатом, образуя уридиндифосфатглюкозу и пирофосфат, после чего под влиянием гликогенсинтетазы начинается трансферазная

реакция с участием уридиндифосфатглюкозы и гликогена - затравки, которая является вторым этапом процесса, когда осуществляется синтез гликогена и образуется уридиндифосфат. При этом α -1,4-глюкан: α -1,4-глюкан-6-глюкозилтрансфераза образует связи ветвления в синтезируемом полисахариде (*L. Leloir, C. Cardini, 1957; L. Leloir, S. Goldemberg, 1960; B. Breckenridge, E. Crawford, 1960; A. Beloff-Chain, F. Rocchiazzi, 1960; И.С. Луганова, И.Ф. Сейц, 1963; И.Ф. Сейц, И.С. Луганова, А.Д. Владимирова, 1963; И.С. Луганова, Л.М. Розанова, И.Ф. Сейц, 1964; А.Д. Владимирова, И.Ф. Сейц, 1964*).

В последнее время появились данные о том, что в синтезе гликогена принимает участие галактоза, которая в присутствии аденозинтрифосфорной кислоты и уридиндифосфата образует уридиндифосфатгалактозу, превращающуюся затем в уридиндифосфатглюкозу, необходимую для синтеза гликогена (*L. Leloir, 1964*).

Как показали исследования, гликогенсинтетаза печени локализуется во фракции гранул, богатых гликогеном; в значительно меньших количествах она обнаружена в митохондриях, микросомах и в надосадочной жидкости (*L. Leloir, S. Goldemberg, 1960; H. Sie, A. Haflerian, W. Fishman, 1964*). Амило-1,4 \rightarrow 1,6 - трансглюкозилаза обнаружена только в цитоплазме (*C. Krizman, 1962*).

В реакциях, катализируемых трансглюкозилазами нефосфоролитического типа, донаторами гликозильных групп могут быть мальтоза, низкомолекулярные и высокомолекулярные мальтосахариды, а акцепторами являются как сложные сахара, так и моносахариды. Действие трансглюкозилаз нефосфоролитического типа распространяется на значительно больший круг реакций, связанных с биосинтезом углеводов. Трансферазы этой группы могут переносить глюкозильные остатки не только межмолекулярно, но и внутримолекулярно, превращая α -1,4 связи в α -1,6 - связи внутри молекулы полисаха-

рида, а при межмолекулярном переносе они катализируют этот процесс не только с разрывом и замыканием связей в α -1,4-положении, но также с разрывом α -1,4-связи и замыканием ее в α -1,6-положении. Кроме того, они могут переносить гликозильные остатки не одного вещества, а целого ряда веществ, что также расширяет диапазон их действия (А.Н.Петрова, 1956, 1958, 1959, 1962; *S.Peat, W.Welan, W.Rees*, 1956).

Фосфорилаза катализирует реакции переноса гликозильных групп, в которых субстратом-донатором служит глюкозо-1-фосфат, а роль акцептора могут выполнять мальтосахариды, декстрины, гликоген, которые является затравкой для процесса синтеза. По мнению ряда исследователей фосфорилаза животного организма играет большую роль в процессах распада, чем в процессах синтеза полисахаридов, т.к. в живых тканях не создается условий для синтезирующего действия этого фермента (*O.Hoffmann-Ostenhof*, 1960; *L.Leloir, J.Olavarría, S.Goldemberg, H.Carminatti*, 1959; *L.Leloir, C.Cardini*, 1960; *C.Vellaz-Palasi, J.Lazner*, 1960). Однако, тот факт, что повышение количества гликогена в органах животных часто происходит параллельно с увеличением активности фосфорилазы и в опытах *in vitro* наблюдается высокая синтезирующая способность этого фермента, говорит о том, что нет оснований полностью отрицать синтезирующее действие фосфорилазы (*Е.М.Розенфельд*, 1962; *S.Leonard, W.Wimsatt*, 1959). С помощью чистых препаратов ферментов, выделенных из мышц, и глюкозо-1-фосфата в настоящее время удается *in vitro* синтезировать гликогены, весьма близкие по свойствам к природным гликогенам. Изменяя условия синтеза, оказалось возможным получить синтетические гликогены, несколько отличающиеся от природных,

приближающиеся по свойствам и строению к амилопектинам.

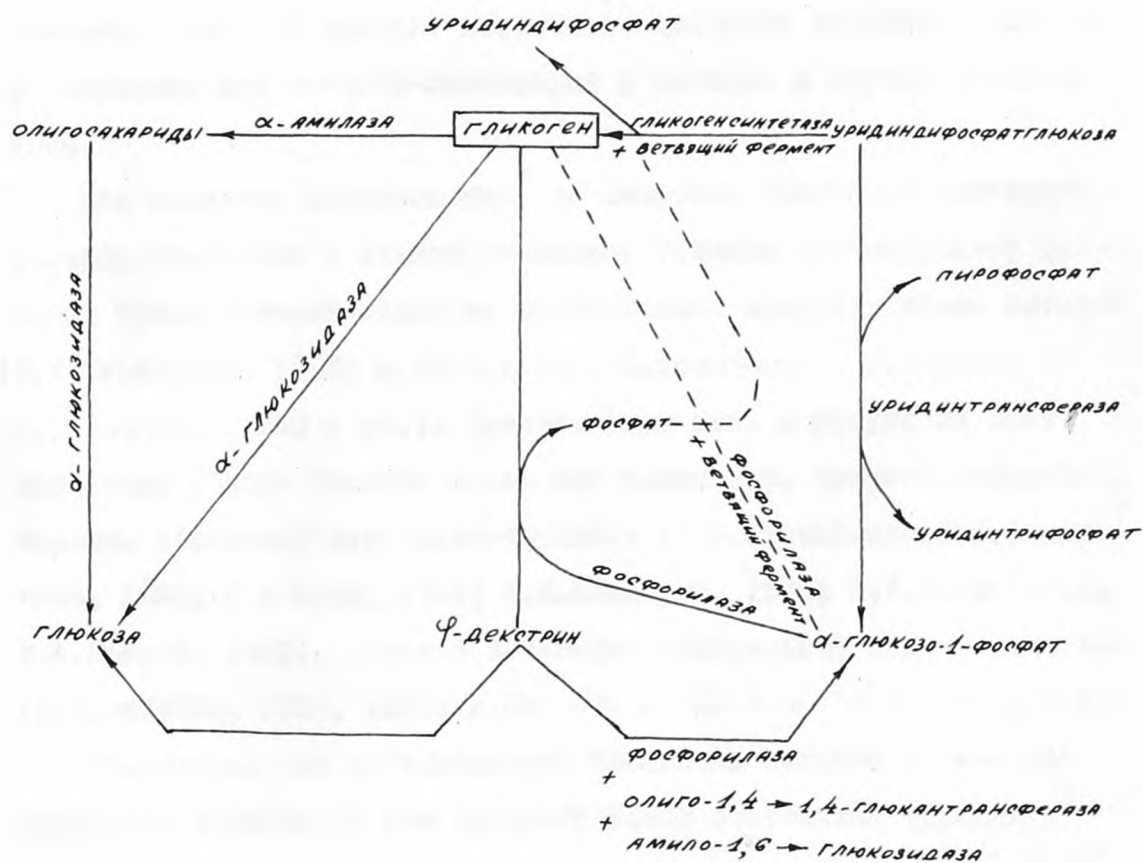
(Б.Н.Степаненко, 1955; Б.Н.Степаненко, А.С.Кайнова, 1954; А.С.Кайнова, 1953, А.С.Кайнова, Б.Н.Степаненко, А.Н.Петрова, 1954) Синтетическим путем удалось получить и другие полисахариды (Ю.Л.Погосов, З.А.Роговин, 1961). Как показали исследования, важное значение для протекания процесса синтеза гликогена имеет исходная концентрация полисахарида, а также состав и ионная концентрация буферной среды. (H. Niemeijer, E. Figueira, C. González, 1956; A. Hastings, A. Solomon, C. Anfinsen, R. Gould, Y. Rosenberg, 1949).

Распад гликогена в тканях животного организма протекает различными путями, в которых участвуют α -1,4-глюкан: орто-фосфатглюкозилтрансферазы (фосфорилазы), α -1,4-глюкан: -1, глюкан-6-глюкозилтрансферазы (ферменты, расцепляющие α -1,6-связи) и два типа глюкозидаз - эндополиглюкозидазы и экзополиглюкозидазы. Эндополиглюкозидазами являются ферменты, расщепляющие молекулы гликогена на осколки с различным коэффициентом полимеризации, представляющие собой α -1,4-глюкан-4-глюкано-гидролазы (α -амилазы); экзополиглюкозидазы обладают способностью отщеплять от молекул гликогена конечные глюкозные остатки и представляют собой α -1,4-глюкан-глюкогидролазы (γ -амилазы). Ряд авторов на основании своих исследований пришли к заключению, что распад гликогена в организме происходит главным образом путем фосфоролитического его расщепления, а действие полиглюкозидаз играет подчиненную роль в этом процессе (П.Остерн, Э.Холмс, Д.Герберт, Ж.Тершаковец, С.Губль, 1940; А.М.Генкин, 1946; К.И.Коткова, 1947).

По мнению других исследователей полиглюкозидазы играют в процессе распада гликогена более значительную роль, так как

вызывает более глубокий распад полисахарида; при этом, наряду с α -амилазой и β -амилазой, осуществляет свое действие полиглюкозидаза, расщепляющая α -1,6-глюкозидные связи, которые не подвержены действию фосфорилазы (А.Н.Петрова, 1946, 1947, 1948, 1949, 1950, 1951, 1952; Е.Л.Розенфельд, 1950, 1959, 1962; А.Н.Петрова, М.Б.Лебедева, 1950; Е.Л.Розенфельд, И.А.Попова, 1961; И.А., И.А.Шубина-Виницкая, Е.Л.Розенфельд, 1964; Е.Л.Розенфельд, И.А.Попова, А.И.Шубина, 1961).

Процессы синтеза и распада гликогена в тканях теснейшим образом связаны между собой, что хорошо показано в приводимой ниже схеме, позаимствованной из книги "Control of glycogen metabolism", 1964. (Ciba foundation symposium of control glycogen metabolism held 23rd-25th July 1964).



Из анализа приведенных выше данных вытекает, что продукт действия фосфоорилазы, глюкозо-1-фосфат, является вместе с тем субстратом при образовании уридиндифосфатглюкозы, необходимой для синтеза гликогена с помощью гликогенсинтетазы. Наряду с этим образующиеся в процессе α -амилолиза олигосахариды используются при синтезе гликогена с помощью уридиндифосфатглюкозы в качестве затравок этой энзиматической реакции.

Такую же роль могут играть и олигосахариды, образующиеся при распаде гликогена под влиянием γ -амилазы, действие которой в приведенной схеме, к сожалению, не отражено, несмотря на то, что этот фермент играет важную роль в тех случаях, когда организм нуждается в быстром образовании глюкозы, способной образоваться в данном случае при распаде гликогена как первичный продукт реакции, а не как продукт вторичного действия фосфатаз в случае фосфоорилазы или α -поли-глюкозидаз и мальтаз в случае α -амилолиза.

Как показали исследования, на скорость процессов синтеза и распада гликогена в тканях оказывают влияние разнообразные факторы, среди которых одним из существенных является режим питания (Я.Х.Таракулов, 1948; *D. Bonsignore, C. Cononica, O. Sartori, L. Lenzerini*, 1963 и др.). Значительную роль в регуляции этих процессов играют гормоны такие как адреналин, инсулин, тироксин, гормоны коркового слоя надпочечников (Б.Н.Степаненко, И.З.Сергиенко, 1958; Г.В.Муха, 1955; И.И.Котляров, 1942; Е.Л.Розенфельд, И.А.Попова, 1962), а также состояние центральной нервной системы (В.И.Хайкина, 1953, 1959; *A. Kovách, L. Takács, S. Kiss*, 1956).

Оказалось, что интенсивность процессов синтеза и распада гликогена изменяется при патологических состояниях организма

(Б.Н.Степаненко, Л.П.Хаврова, Г.В.Зубрилина, 1955; А.Н.Петрова, 1952, 1955; Е.Л.Правоторова, 1951). Следствием этого является изменение содержания гликогена в различных органах и системах организма при целом ряде патологических состояний. Известно, в частности, что при панкреатическом диабете, крупозной пневмонии, туберкулезе легких, миелоидном лейкозе, остром суставном ревматизме, сердечной декомпенсации, а также при различных септических и воспалительных процессах повышается количество гликогена в крови (Р.*Ehrlich*, 1882; Р.*Liverato*, 1894; S.*Kaminer*, 1902; К.Воскресенский, 1907). Наростание уровня гликогена в крови с увеличением положительной йодной реакции в лейкоцитах наблюдается и при инфекционных заболеваниях (*J. Salomon*, 1899). При заболеваниях печени, например, при паренхиматозной желтухе, содержание гликогена в крови тоже повышается (С.С.Вайнштейн, А.А.Паталова, 1934; Л.С.Шварц, Г.И.Покровская, 1939). Низкий уровень гликогена в крови и обеднение печени гликогеном наблюдается при кахексиях различного происхождения, при токсической диспепсии, острой форме детского гепатита, а также при кори и ряде других заболеваний у детей (А.М.Генкин, 1939). У людей, погибших от инфекционных заболеваний, обнаруживается очень небольшое количество гликогена в сердечной мышце, и в случае смерти от органических заболеваний сердца в фазе декомпенсации гликоген в миокарде вообще отсутствует (С.С.Касабян, 1960). Не удастся обнаружить гликоген также в некротизированной ткани миокарда при инфаркте (В.Янкиявичюте, 1961).

При других патологических состояниях наблюдается избыточное отложение гликогена в тканях. Так, при панкреатическом диабете обнаруживаются значительные отложения гликогена в почках, при так называемой "гликогенной" болезни большое количество гликогена

имеется в печени, в почках, сердечной мышце и в мозгу (Н.К.Полевицкая, 1946). При менингитах гликоген появляется в спинномозговой жидкости, где в норме он отсутствует (А.Д.Берштейн, Е.И.Халезова, 1949).

Таким образом, если в физиологических условиях процесс гликогенообразования особенно интенсивно совершается в печени и мышцах, то при патологических состояниях клеточные элементы любых других органов могут образовывать и накапливать гликоген в значительных количествах, что говорит о преобладании процессов синтеза над процессами распада этого полисахарида.

Все это свидетельствует о том, что гликоген играет существенную роль в организме, а взаимосвязанные процессы синтеза и распада его являются немаловажными среди многочисленных процессов лежащих в основе жизнедеятельности организма. Для ряда органов и тканей гликоген играет большую роль как источник энергии, которая образуется при анаэробном и аэробном распаде этого полисахарида, что очень существенно, в частности, для энергетики мышечного сокращения. Гликоген печени и мышц имеет большое значение как источник глюкозы крови, при этом соотношение процессов синтеза и распада этого полисахарида является определяющим моментом в регуляции физиологического уровня глюкозы в крови. Кроме того, гликоген играет определенную коллоидно-пластическую роль в организме, поскольку накопление этого полисахарида в клетках тканей приводит к изменению степени дисперсности клеточных коллоидов. Вместе с тем, образование продуктов распада гликогена меняет осмотическое давление и состояние кислотно-щелочного равновесия внутри клетки, что оказывает существенное влияние на состояние цитоплазмы и органоидов данной клетки (Д.Е.Альперн, Н.Н.Транквилитати, 1958).

Наряду с этим, гликоген обладает антикетогенным действием, а также обладает способностью сохранять белковые резервы печени, способствуя экономному протеолизу белков. Кроме того, под влиянием гликогена в печени усиливается синтез белка из аминокислот и увеличивается интенсивность синтеза парных соединений в этом органе (А.А.Богомолец, 1941; А.Гасанов, 1936). Оказалось, что антитоксическая функция печени также в значительной степени связана с наличием в печеночных клетках гликогена, который обладает способностью связывать токсические вещества (С.А.Брайловский, А.М.Генкин 1936).

Приведенные данные свидетельствуют о том, что гликоген принимает активное участие в различных жизненных процессах, совершающихся в животном организме. Однако, роль гликогена для организма, несомненно, не ограничивается лишь вышеуказанными формами участия этого полисахарида в обмене веществ, так как надо признать, что вопрос о роли и значении гликогена в настоящее время еще недостаточно хорошо изучен. В последние годы интерес к разработке вопросов, связанных с выяснением значения, свойств и структуры гликогена, заметно возрос. В литературе появилось значительное количество работ, посвященных изучению физиологии и патологии гликогена в организме. Интерес к изучению гликогена, являющегося полисахаридом животного организма, привел к обнаружению в крови специфических полисахаридов, обладающих антигенными свойствами и способностью к сенсibilизации организма. Наличие групповых свойств крови также теперь связывают с полисахаридами (А.М.Кузин, 1954; А.А.Ракитянская, 1955; С.С.Херамоненко, Л.В.Лаврова, 1955; А.М.Кузин, Г.А.Гараунова, Я.В.Мамуль, 1953; А.М.Кузин, И.С.Буяновская, А.М.Рыкалева, Н.И.Кузина, 1947; М.Степанов, А.М.Кузин,

З.А.Макаева, П.Н.Косяков, 1940; П.Н.Косяков, 1942; И.Леонтьев, М.Знаменская, 1934). Все это еще больше повышает интерес к изучению полисахаридов животного организма, в том числе и гликогена, химические превращения которого, несомненно, теснейшим образом связаны с обменом других полисахаридов, которые обнаружены в тканях животного организма (Е.Л.Розенфельд, И.С.Лукомская, 1956; Е.Л.Розенфельд, 1958, 1959). В свете сказанного круг вопросов, связанных с изучением роли гликогена в животном организме, значительно расширяется, что должно привлечь еще более пристальное внимание к исследованиям, ставящим своей задачей изучить гликоген, как один из многих представителей полисахаридов, обнаруженных в тканях животного организма.

3. ОБМЕН УГЛЕВОДОВ В ОРГАНИЗМЕ, ПОРАЖЕННОМ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМ НОВООБРАЗОВАНИЕМ

Характерной чертой обмена опухоли и других тканей организма, пораженного злокачественным новообразованием, является нарушение соотношений между анаэробной и аэробной фазами углеводного обмена, что показано в многочисленных работах большого числа исследователей.

Факт нарушения окислительных процессов в организме, пораженном злокачественным новообразованием, был обнаружен еще в начале XX века (В.М. Зыков, Д.В. Пеняков, 1911, 1912; В.М. Зыков, А.П. Коников 1913). После разработки метода определения тканевого дыхания и гликолиза было установлено, что опухолевая ткань характеризуется низким уровнем тканевого дыхания и чрезвычайно выраженным гликолизом, протекающим как в анаэробных, так и в аэробных условиях (O. Warburg, 1924, 1926, 1930). Детальное изучение установленного факта позволило автору высказать предположение, что возникновение опухоли является следствием нарушенного дыхания, в результате чего происходит гибель большинства клеток. При этом некоторые клетки, способные осуществлять быстрый гликолиз, получают этим путем необходимую им энергию и сохраняют свою жизнеспособность, образуя через ряд поколений опухоль (O. Warburg, 1956).

В настоящее время имеется большое количество данных, подтверждающих заключение о высоком уровне гликолиза в опухолях (Н.Б. Медведева, 1937, 1940; Э.Я. Стеркин, 1940; Н.В. Окунев, 1947; И.М. Нейман, 1935, 1938, 1940, 1945, 1947; Е.В. Михеева, 1952; И.Ф. Сейц, 1953; Р.Е. Кавецкий, 1940, 1962; H. Pericaud, 1931; W. Fabisch, 1935; D. Burk, 1942; A. Hirsch-Hoffman, H. Hölzel, H. Maass, 1964 и др.).

В опытах с введением канцерогенных веществ показано, что усиление гликолиза, как правило, совпадало с началом атипической пролиферации в малигнизирующемся органе (*S. Fiala, A. Fiala, 1959*). При этом резко увеличивалась активность некоторых ферментов гликолиза, в частности, наблюдалось выраженное повышение уровня фосфогексокиназы (*R. Olson, 1951*). Наряду с этим сильно повышается активность гексокиназы, благодаря чему в опухолевых клетках гексокиназная реакция перестает быть узким звеном гликолиза, что может явиться причиной увеличения его интенсивности (*J. LePage, 1950; С.А.Нейфак, М.П.Фомина, 1957*). Другой причиной повышения гликолиза в раковой клетке может быть снижение или полное отсутствие активности глюкозо-6-фосфатазы, благодаря которой в нормальной ткани осуществляется гидролиз основной массы глюкозо-6-фосфата (*J. Ashmole, J. Cahill, A. Hastings, S. Zottu, 1957*). Поэтому значительное снижение активности или отсутствие глюкозо-6-фосфатазы приводило к накоплению глюкозо-6-фосфата в опухолевых клетках, что наблюдалось как в перевивных опухолях, так и в опухолях, индуцированных канцерогенными веществами (*J. Weber, A. Cantero, 1955*). При этом активность фермента, участвующего в дальнейшем превращении глюкозо-6-фосфата, фосфогексоизомеразы, повышалась, что также способствовало увеличению интенсивности процесса гликолиза (*J. Weber, A. Cantero, 1955, 1957*). О нарушении обмена глюкозо-6-фосфата, вступающего в цепь реакции гликолиза, свидетельствует и резкое понижение или даже прекращение глюконеогенеза в ткани опухоли (*J. Brown, J. Katz, Y. Chaikoff, 1956; R. Olson, 1951; R. Zamecnik, R. Loftfield, M. Stephenson, J. Steele, 1951*). Вместе с тем повышается образование молочной кислоты (*J. Ashmole, J. Weber, R. Landau, 1958*). При этом активность лактатдегидрогеназы понижается, что наблюдалось при исследовании опухолей,

индуцированных канцерогенными веществами, перевивных экспериментальных опухолей, а также опухолей человека (*J. Weber, A. Cantero, 1959*).

Следовательно, в опухолевой ткани превращение глюкозо-6-фосфата идет, в основном, по пути гликолиза и окисления до пентозофосфата, в то время как в нормальной ткани печени 18% глюкозо-6-фосфата превращается в гликоген, 55% превращается в глюкозу и выделяется в кровь, 25% подвергается гликолизу, и 2% подвергается непосредственному окислению (*J. Ashmore, J. Cahill, A. Hastings, S. Zottu, 1957*).

Многие годы были потрачены исследователями на поиски поврежденного звена дыхания малигнизирующей ткани. Однако, до сих пор не является очевидным, что в опухолевой ткани имеется качественное нарушение дыхания. В раковой клетке найден полный набор ферментов цикла Кребса и переносчиков электронов-флавопротеинов, цитохромов (*B. Chance, N. Castor, 1952; B. Chance, B. Hess, 1959*). И наблюдаемые изменения касаются количественного изменения их активности. Как показали исследования, в ткани печени, малигнизирующей под влиянием ортоаминоазотолуола, в течение многих месяцев не удается наблюдать изменения интенсивности окислительных процессов, и только к моменту возникновения гепатом обнаруживается снижение процессов тканевого дыхания исследуемого органа (*Н.В. Ельцина, 1944*). Имеются указания на то, что в опухолевой ткани понижено содержание цитохрома С и цитохромоксидазы, вместе с тем активность всей цитохромной системы в них остается нормальной (*S. Weinhouse, 1955; C. Heidelberger, 1956; Д. Гринштейн, 1951*). В первичных опухолях, индуцированных диметиламиноазобензолом, содержание цитохрома С составляет всего 20% содержания его в нормальной ткани печени (*K. DuBois, V. Potter, 1942*).

Значительное понижение содержания цитохрома С, а также цитохром-оксидазы по сравнению с нормальной печенью, обнаружено и в гепатоме 98/15, при этом активность цитохром-С-редуктазы не меняется (M. Lenta, M. Riehe, 1952). При изучении активности таких окислительных ферментов, как сукцинатдегидрогеназа, ДПН- и ТПН-диафораза, в малигнизирующихся культурах ткани центральной и периферической нервной системы наблюдалось повышение активности исследуемых ферментов при малигнизации и снижение их активности, когда процессе малигнизации заканчивался (T. Yonezawa, M. Bornstein, E. Peterson, M. Murray, 1963). В гепатоме Новикова было обнаружено резкое снижение активности сукцинатоксидазы (A. Novicoff, 1957). Наряду с этим в гомогенатах или клеточных фракциях вышеуказанной гепатомы значительно понижена активность ДПН-Н-цитохром-С-редуктазы, а ТПН-Н-цитохром-С-редуктаза вообще отсутствует или обнаруживается лишь в виде следов (B. Reynafarje, V. Potter, 1957).

В вышеуказанной опухоли, а также в первичных опухолях печени крыс и в перевиваемых мышинных гепатомах отсутствует и ДПН-ТПН-трансгидрогеназа (W. Knox, 1951). При изучении опухолевой ткани саркомы Галльера и твердой карциномы Эрлиха было обнаружено более низкое содержание пиридиновых нуклеотидов, чем в здоровых тканях. При этом во всех исследованных тканях преобладающей формой НАД была окисленная, а преобладающей формой НАДФ была восстановленная форма (G. Misale, A. Colajacomo, 1963).

В гепатомах, индуцированных диметиламиноазобензолом, резко снижается активность сукцинатоксидазы, а также цитохром-оксидазы по сравнению с активностью этих ферментов в нормальной ткани печени (W. Schneider, V. Potter, 1943). При этом снижение активности сукцинатоксидазы печени, подвергающейся канцеризации, происходит намного раньше, чем удается отметить какие-либо

изменения в активности цитохромоксидазы (*J. Hogeboom, A. Claude, R. Hotchkiss, 1946*). Изменение активности сукцинатоксидазы отмечается и в срезах печени, подвергаемой действию диметиламиноазобензола. Постепенно уменьшаясь, активность этого фермента резко падала при появлении опухолей и была совсем низкой в образовавшихся первичных узлах злокачественного новообразования (*C. Nosh - Ligeti, 1947*).

При изучении активности сукцинатоксидазы печени крыс, подвергаемых действию 2-метил-3-метил или 4-фтор производных 4-диметиламиноазобензола, а также 3-метил-4-монометиламиноазобензола, было показано, что чем более канцерогенно вводимое вещество, тем ниже была активность сукцинатоксидазы печени исследуемых животных (*K. Potter, J. Price, E. Miller, J. Miller, 1950*). Наряду с изменением активности сукцинатоксидазы в печени животных, подвергаемых воздействию диметиламиноазобензола, наблюдается изменение активности дегидрогеназ янтарной, пировиноградной и яблочной кислот, а также альдолазы и фосфатаз, как щелочной, так и кислой. При этом в первый период канцеризации имеет место уменьшение активности дегидрогеназ и увеличение активности альдолазы и обеих фосфатаз, во второй период канцеризации увеличивается активность дегидрогеназ и снижается активность альдолазы, а также кислой и щелочной фосфатаз, а затем, в последнем периоде канцеризации, активность всех ферментов заметно снижается (*Е.К. Кречун, Ф. Моток, Л. Георгеску, С. Константинеску, 1963*). Исследование сукцинатдегидрогеназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы мышцы при воздействии на нее сильного канцерогенного вещества, 9,10-диметил-1,2-бензантрацена, показало значительное изменение активности этих ферментов в процессе канцеризации ткани. При этом наблюдалось снижение активности сукцинатдегидрогеназы и повышение активности

глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (О.М.Поздняков, 1963). Высокая активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы была обнаружена также в ткани солидных, аденоматозных и смешанных гепатом крыс (P. Emmelot, C. Bos, P. Brouhaas, J. Hampe, 1959). Значительное повышение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в опухолях печени сочетается с крайне низким содержанием ТПН (J. Glock, P. McLean, 1954, 1957).

Приведенные данные ставят под сомнение выдвинутый Варбургом взгляд о причинной связи между нарушением дыхания и возникновением опухоли. Вероятнее всего, в результате теснейшей взаимосвязи дыхания и гликолиза через общие промежуточные продукты интенсивность одного из процессов влияет на интенсивность другого. Этим взаимодействием, в частности, некоторые авторы объясняют ослабление в опухолях эффекта Пастера, то есть торможения процессов гликолиза дыханием (F. Lynen, 1942; O. Meyerhof, 1952), а также эффект Кребтри, то есть торможение дыхания опухолевой ткани в присутствии глюкозы, чего не наблюдается при исследовании дыхания нормальных тканей (H. Crabtree, 1929; S. Gatt, Y. Krimsky, E. Racker, 1956; E. Kun, P. Talaay, H. Williams-Ashman, 1951; B. Chance, B. Hess, 1956; E. Racker, 1956; И.Н.Нейман, А.И.Синай, 1934). Однако до настоящего времени у исследователей нет единого мнения о механизме этого эффекта. Одни считают, что причина его кроется в недостатке неорганического фосфата в митохондриях из-за быстрого использования его в реакциях гликолитического фосфорилирования (R. W. H., E. Racker, 1959). Другие полагают, что, наряду с недостатком неорганического фосфата, причиной эффекта Кребтри является истощение митохондриальных запасов АТФ и АДФ, которые при наличии глюкозы в клетке интенсивно используются гликолитическими ферментами — гексокиназой, фосфофруктокиназой и

триозофосфатдегидразой (Н.В.Ельцина, 1960; Н.В.Ельцина, Н.А.Вересотская, 1962; K. Ulsen, E. Coe, R. McKee, 1958).

Имеется также мнение, согласно которому эффект Крэбтри возникает в связи с тем, что митохондрии опухолей не обладают способностью сокращаться при высоких концентрациях АТФ, в результате чего они постоянно выделяют в окружающую среду значительное количество липопротеина-стимулятора гликолиза, поэтому механизм регуляции гликолиза нарушается. (С.А.Нейфах, В.С.Гайцхоки, Т.Б.Казакова, 1963). Как показали более поздние исследования, опухолевая ткань характеризуется высокой скоростью использования глюкозы при культивировании ее в синтетической среде, а также непосредственно в организме (R. Raina, C. Ramakrishnan, 1964; E. Cheraskin, W. Ringsdorf, 1964). При этом в опухолевых клетках а также в суспензиях клеток асцитической жидкости наблюдается преимущественное окисление первого углеродного атома и интенсивное накопление седогептулозы, что свидетельствует о наличии пентозофосфатного пути окисления глюкозы в опухолевой ткани (И.Д.Головацкий, М.Д.Подильчак, 1963; Г.Д.Кречетова, 1959; B. Agzanoff, R. Brady, M. Colodzin, 1954). В пользу этого говорит и тот факт, что в опухолевой ткани найдены высокоактивные ферменты, участвующие в пентозофосфатном пути превращения глюкозы (H. Williams-Ashman, 1951; G. Glock, P. McLean, 1954).

Пентозофосфатный путь окисления глюкозы имеет большое значение в углеводном обмене раковой клетки, о чем свидетельствует значительное количество исследований, показавших, что на его долю приходится от 1/3 до 1/2 общего количества окисленной глюкозы (P. Emmelot, L. Bosch, J. Van Vals, 1955; 1956; C. Wenner, S. Weinhouse, 1956; C. Wenner, J. Hackney, F. Moliterano, 1958; B. Horecker, N. Hiatt, 1958). Мощным стимулятором пентозного цикла в опухолевой клетке служат биосинтетические реакции, идущие с использованием ТПН-Н и пенто-

зофосфатов. Этот механизм регуляции действует по принципу обратной связи (В. Horecker, H. Hiatt, 1958; C. Wenner, 1959; А.К. Белоусова, Т.И. Атабекова, 1960).

Изучение других ферментов углеводного обмена в опухолевой ткани показало, что значительно более активными, чем в норме, являются такие ферменты как гексокиназа и глицерофосфатаза, фосфорилаза и фосфатаза, а также дегидрогеназы гликолитического цикла и цикла лимонной кислоты (С.А. Нейфах, М.П. Мельникова, 1955; Е.В. Пискарева, 1951; В. Фасске, 1963; *G. Viale, F. Ubbi*, 1964; *G. Buschak*, 1963; *G. Sydow*, 1964). При этом исследование различных по злокачественности опухолей нервной системы показало, что активность фосфатазы в более злокачественных опухолях, медуллобластомах, намного выше, чем в более доброкачественных опухолях-астроцитомах (Е.В. Михеева, 1951). Активность фосфатазы и фосфорилазы увеличивается не только в опухолевой ткани, но и в крови больного организма, а также в нервной ткани, непосредственно опухолью не пораженной (Б.И. Хайкина, 1953; О.В. Черных, 1964), вместе с тем в крови увеличивается активность альдолазы и карбоангидразы (Т.И. Чахова, 1963). Повышение альдолазы в крови наблюдается не только при развитии первичного узла опухоли, но также при метастазировании ее. Подъем активности альдолазы в крови обнаруживается и при послеоперационных рецидивах рака, в частности, желудочно-кишечного тракта и бронхов (*W. Lühz, K. Chrometzka*, 1964). Обнаруженное другими исследователями снижение активности фосфоглюкомутазы, фруктозо-1,6-дифосфатазы, уридиндифосфогалактозо-4-эпимеразы, а также повышение активности гиалуронидазы в опухолевой ткани по сравнению с активностью этих ферментов в нормальных тканях тоже свидетельствует об извращении углеводного обмена в ткани злокачественного новообразования (*P. Raina, C. Ramakrishnan*,

1964; E. Robinson, H. Kalskar, H. Troedsson, 1963; H. Kalskar, E. Robinson, 1963; Т.И.Цинцадзе, 1963). Вследствие изменения активности ферментов углеводного обмена в организме, пораженном злокачественным новообразованием, обнаруживается изменение интенсивности процессов гликолиза и дыхания не только в опухолевой ткани, но и в органах, отдаленных от развивающейся злокачественной опухоли. Проведенные в этом направлении исследования показали, что раньше, чем в других тканях, повышение интенсивности гликолиза и снижение дыхания обнаруживается в мышцах ракового животного, что было установлено сначала в опытах на мышах со спонтанной аденокарциномой грудной железы (И.М.Нейман, 1936). Дальнейшие исследования показали, что трансплантированные опухоли также способствуют выраженному усилению процессов гликолиза и ослаблению окислительных процессов в ряде внутренних органов, не пораженных опухолью. Так, саркома, трансплантированная под кожу спины, способствует снижению дыхания и повышению гликолиза в печени, в почках и диафрагме подопытных животных (А.Я.Синай, 1940; И.М.Нейман А.Я.Синай, 1936; И.М.Нейман, 1938). Аналогичные результаты были получены и другими авторами, наблюдавшими повышение гликолиза и снижение дыхания в печени, селезенке, почках и диафрагме как при развитии в организме перевивных опухолей, так и при малигнизации, наступающей в процессе смазывания кожи животных канцерогенными веществами (Р.Е.Кавецкий, 1931, 1938; А.А.Терехова, 1938; Д.Е.Рывкина, 1934; Г.Д.Дядюша, 1937; Е.П.Кожевникова, 1954; D. Burk, O. Behrens, K. Sugita, 1941 и др.).

Оказалось, что нарушенные под влиянием опухолевой болезни процессы углеводного обмена могут изменяться под влиянием различных факторов, действующих на животный организм. Интенсивность процесса гликолиза и гликогенолиза в органах больного животного

изменяется, в частности, при воздействии самых разнообразных веществ, таких, например, как адренокортикотронный гормон, инсулин, перекись водорода, динитрофенол, белковые экстракты, выделенные из злокачественных опухолей человека (И.Ф.Сейц, 1953; И.И.Иванов, С.И.Пехтерева, Н.О.Затейщикова, 1949; И.И.Иванов, С.И.Пехтерева, М.Л.Цимблер, 1949; И.Н.Нейман, А.Я.Синай, 1934; *N. Baker, L. Wilson, 1963; N. Young, J. Abels, F. Homburger, 1948*). Под влиянием вещества, полученного из препарата аденозин-трифосфорной кислоты, наблюдается усиление эффекта Пастера и угнетение эффекта Кребса (В.И.Агол, О.А.Медведкина, 1964).

Во всех случаях воздействия тех или иных факторов на соответствующий процесс, изменение его скорости, несомненно, связано с изменением активности ферментов, осуществляющих данный процесс; а так как ферменты действуют на те или иные субстраты, то при этом изменяется и концентрация субстратов их действия.

Как следствие извращенного обмена углеводов, обусловленного развитием в организме злокачественного новообразования, изменяется, в частности, содержание такого субстрата углеводного обмена организма, как гликоген.

Вероятно, как следствие снижения активности фосфоглюкоматазы, обеспечивающей превращение глюкозо-6-фосфата в гликоген, а также резкого падения активности или полного отсутствия глюкозо-6-фосфатазы, в опухолевой ткани обнаруживается мало гликогена (*E. Goranson, J. McBride, J. Weber, 1954, J. Weber, A. Cantero, 1957*). При этом инкубация срезов ткани печени в срезе с высоким содержанием глюкозы и калия не приводит к синтезу гликогена, или же он происходит крайне незначительно (*J. Ashmore, J. Weber, R. Landau, 1958; J. Weber, H. Morris, W. Love, J. Ashmore, 1961*).

При индуцировании злокачественных опухолей гепатотропными канцерогенными веществами уменьшение количества гликогена в печени начинается вскоре после начала поступления канцерогенного вещества в организм, однако резкое истощение запасов гликогена совпадает с началом процесса пролиферации клеток желчных протоков. При введении неканцерогенных красителей таких изменений в содержании гликогена в печени не обнаруживается (*J. Spain, A. Griffin*, 1957; *J. Chang, J. Spain, A. Griffin*, 1958). Как показали исследования, уменьшение количества гликогена в опухолевой ткани не является следствием голодания, а представляет собой результат обменных нарушений (*U. Orr, D. Price*, 1948; *A. Graffi, W. Hebecker*, 1953).

Оказалось, что количество гликогена в опухолевой ткани находится в определенной зависимости от степени зрелости злокачественного новообразования. Незрелые опухоли содержат значительно больше гликогена, чем зрелые новообразования, при этом по мере атипизации и малигнизации ткани содержание гликогена в ней уменьшается. Количество гликогена продолжает убывать по мере того, как клетки переходят в некробиотическое состояние, а в полностью некротизированных клетках опухоли гликоген вообще не обнаруживается, что показано с помощью химических и гистохимических методов исследования на опухолях, вызванных канцерогенными веществами, на перевивных опухолевых штаммах и на различного рода опухолях, полученных операционно-биоптическим путем (*И.А. Аксамитная*, 1938; *Л.В. Шершувская*, 1944, 1946; *Т.М. Черножуков*, 1941; *А.Е. Гошева*, 1951, 1953; *С.С. Касабян*, 1950, 1955, 1963; *У.А. Габуния*, 1961; *A. Goldfeder*, 1928; *J. Manus, L. Findley*, 1949; *W. Aure*, *J. Aure*, 1950, *P. Hou, A. Fadzean*, 1956; *V. Nigam, L. Heben, Mac Donald, A. Cantero*, 1962). При этом, по мере развития заболева-

ния, количество гликогена изменяется не только в малигнизирующей ткани, но и в непораженных опухолью органах и системах. Так, резкое уменьшение количества гликогена обнаруживается в крови больного раком организма (С.С.Касабян, 1953).

В процессе канцеризации организма изменяется также и содержание гликогена в печени, где количество его, как правило, уменьшается, а при определенных стадиях заболевания вообще не обнаруживается (*A. Goldfeder*, 1928; *J. Spain*, *A. Griffin*, 1957; *U. Edlund*, *H. Sunzel*, 1964; К.Д.Эристави, Л.К.Нарашидзе, Г.Е.Георгадзе, Р.В.Булусашвили, 1963; Д.Н.Чанг, Л.Н.Ворд, К.Ичино, 1963; К.Н.Груздева, 1964).

Как показали исследования, количество гликогена в печени животных, пораженных злокачественными новообразованиями, может подвергаться значительным изменениям под влиянием различных факторов, действующих на организм. Оказалось, что содержание гликогена в печени больных животных изменяется при голодании, при введении глюкозы и некоторых аминокислот, а также при воздействии на организм различных гормональных препаратов (*A. Goldfeder*, 1928; Н.М.Нейман, 1931; А.Я.Синай, 1941; И.А.Аксамитная, 1946; К.Н.Груздева, 1953).

Следовательно, развитие в организме злокачественного новообразования оказывает существенное влияние на процессы синтеза и распада гликогена в органах животного, которое подвергается канцеризации. В пользу сдвига в соотношении этих процессов говорит и возможность воздействия на них различными факторами, действующими на больной организм извне. Развивающийся патологический процесс, существенно изменяющий обмен веществ организма, несомненно, может оказать влияние и на процессы синтеза и распада гликогена, что

может привести не только к изменению количества этого полисахарида в том или ином органе, но также и к изменению его структуры. Известно, что развитие в организме животного аллоксанового диабета приводит к тому, что в печени и мозге животных начинают синтезироваться гликогены, отличающиеся по своей структуре от гликогенов этих органов здоровых животных того же вида (Е.Л.Розенфельд, Е.Г.Плишевская, 1953; Н.И.Бродская, М.И.Прохорова, З.Н.Тупикова, 1962). Измененная структура гликогенов обнаруживается также при некоторых гликогенозах (Е.Л.Розенфельд, И.С.Лукомская, 1964). Поэтому не исключено, что изменение в соотношении процессов синтеза и распада гликогена в организме, пораженном злокачественным новообразованием, может привести к образованию гликогена, имеющего качественные особенности, возможно, специфические для данного заболевания. Эти качественные особенности могут быть выражены в изменении структуры молекул синтезируемого в тканях больного организма полисахарида, выяснение особенностей которого представляет несомненный интерес, тем более, что в литературе отсутствуют данные о структурных особенностях гликогенов, выделенных из органов животных, пораженных злокачественным новообразованием.

Не обнаружив в литературе исследований, выясняющих вопросы, связанные с изучением структуры гликогенов, образующихся в органах больных раком животных, и полагая, что разрешение их представляет значительный интерес в связи с изучением нарушенного углеводного обмена в процессе канцеризации организма, мы поставили перед собой задачу выяснить, изменяется ли структура гликогена печени при малигнизации организма и на каком этапе заболевания начинаются количественные изменения содержания исследуемого полисахарида в этом органе.

III. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящей работе исследовались показатели, характеризующие структуру молекул гликогенов, синтезируемых в печени животных, пораженных злокачественным новообразованием, с целью обнаружения возможных структурных особенностей, свойственных этим полисахаридам. Вместе с тем изучалась динамика изменения содержания гликогена в печени исследуемых животных в процессе развития опухолевой болезни. В качестве подопытных животных служили половозрелые кролики-самцы.

Животные, используемые в эксперименте, предварительно выдерживались в виварии кафедры недельный срок карантина, в течение которого они находились на полноценном пищевом рационе, соответствующем по количеству и составу рациону, получаемому в дальнейшем подопытными животными на протяжении всего срока исследования. В период карантина за животными устанавливалось тщательное наблюдение, в процессе которого ежедневно контролировался их вес, состояние, поведение. В опыт отбирались практически здоровые животные без каких-либо видимых отклонений от нормы, с незначительными колебаниями в весе на протяжении всего периода карантина.

В таблице I, приведенной в приложении, представлены данные изменения веса некоторых здоровых кроликов в течение недельного срока карантина, после которого эти животные были взяты для исследования. Как видно из приведенных данных значительных изменений в весе этих животных в период карантина не наблюдалось а незначительное увеличение веса, определяемое в начале срока, повидимому, объясняется переводом животных на полноценное и обильное питание, которое является очень существенным моментом

при проведении исследований, связанных с изучением печеночного гликогена.

Животные, отобранные для эксперимента, делились затем на опытную и контрольную группу, представители которых содержались в дальнейшем на полноценном пищевом рационе и в одинаковых условиях на протяжении всего срока исследования.

Животным опытной группы производилась перевивка опухолевого штамма, что осуществлялось следующим образом: предварительно путем декапитации забивался кролик, пораженный карциномой Броуна-Пирс. У забитого животного, после тщательной обработки кожи живота 10-процентным раствором карболовой кислоты, производилось вскрытие брюшной полости с соблюдением условий стерильности. Извлеченный кусочек опухолевой ткани помещался в стерильную чашку Петри с известным весом. После взвешивания чашки Петри с находящейся в ней опухолевой тканью туда добавлялся стерильный физиологический раствор из такого расчета, чтобы после измельчения опухоли получилась бы 10-процентная взвесь. Измельчение опухолевой ткани производилось острыми стерильными ножницами в прикрытой чашке Петри в течение 30 минут, в результате чего получалась тонкая взвесь опухолевой ткани, способная проходить через толстую иглу шприца. Полученный таким образом перевивочный материал использовался нами для пассирования штамма Броуна-Пирс, любезно предоставленного нам научным сотрудником института клинической и экспериментальной онкологии Академии наук СССР Л.Н.Каринской.

При заражении карциномой Броуна-Пирс кролики опытной группы предварительно взвешивались, после чего фиксировались в положении на спине. Область расположения *testis*, освобожденная

от шерсти, тщательно протиралась спиртом, что не только дезинфицировало кожу живота и мошонки, но и способствовало выведению яичек наружу. Затем в напряженное, хорошо фиксированное пальцами яичко с помощью толстой иглы и шприца вводилось по 1 мл стерильной опухолевой взвеси, после чего яичко погружалось в паховый канал, что препятствовало какой-либо потере перевивочного материала. После перевивки опухолевого штамма за животными устанавливалось тщательное наблюдение с ежедневной регистрацией их веса, поведения, состояния. Под наблюдением находились также животные контрольной группы.

В таблице II (прил.) для примера приводятся данные изменения веса кроликов с привитой карциномой Броуна-Пирс, забитых на различных этапах развития опухолевого процесса.

Из приведенных данных видно, что уже через сутки после перевивки опухолевого штамма у всех подопытных животных наблюдается падение веса, которое, как правило, наблюдается и в последующие сроки исследования. У значительной части животных вес продолжает уменьшаться и к 3-м суткам исследования, однако, у некоторых животных в этот период исследования наблюдается уже увеличение веса, что характерно для более молодых животных, обладающих небольшим исходным весом.

Через 4-5 суток после перевивки опухолевого штамма уже у всех подопытных животных наблюдается заметное увеличение веса, который достигает исходных величин, соответствующих весу животных до перевивки штамма. С этого периода наблюдается постепенное нарастание веса животных до 9-10 суток исследования, после чего вновь наблюдается падение веса животных, которое продолжается до 12-13 суток для кроликов, имеющих большой исходный вес.

У более молодых кроликов с меньшим исходным весом нарастание веса после его падения наблюдается до 6-7 дня исследования, после чего вес животных снова начинает уменьшаться, что соответствует 8-9-10 суткам после перевивки опухолевого штамма.

После кратковременного уменьшения веса у всех подопытных животных вновь имеет место нарастание веса, которое сменяется новым падением изучаемого показателя до величин значительно меньших, чем исходный вес животного, при условии, если кролик не забивался, а доживал до гибели от опухолевой болезни.

На рисунке № I приводится графическое изображение изменения веса кроликов, пораженных карциномой Броуна-Пирс. /См. прилож./

Анализ этих кривых свидетельствует о том, что в процессе канцерогенеза организма кролика наблюдается определенная закономерность в изменении веса подопытных животных. Эта закономерность характеризуется определенной цикличностью, где на смену падению веса животного приходит увеличение этого показателя, затем наблюдается вновь падение его на определенном этапе заболелания, с последующим увеличением и новым падением, что характерно для всех исследованных животных.

Описанные изменения в весе подопытных животных, несомненно, связаны с развитием опухолевого процесса, который быстро поражает организм подопытного животного. Об этом свидетельствует тот факт, что вес контрольных животных, находящихся в тех же условиях, на протяжении всего периода исследования практически не изменяется.

В зависимости от целей эксперимента привитые животные забивались на различных этапах развития опухолевого процесса, начиная с 3-го дня после пассирования штамма, включая все

последующие дни исследования, вплоть до наиболее отдаленного срока жизни больного животного, погибающего от рака, что соответствовало в наших опытах 23-му дню наблюдения. Параллельно во всех случаях обрабатывались здоровые контрольные животные.

Кролики опытной и контрольной группы забивались нами путем декапитации, ^{после} чего быстро вскрывалась брюшная полость их, и описывалась объективная картина, наблюдаемая при вскрытии. Анализ протоколов вскрытия кроликов опытной группы показывает, что у большинства из них уже через 3 дня после перевивки опухолевого штамма, когда животные еще активно реагируют на окружающее, хорошо принимают корм и ведут себя также активно, как контрольные животные, обнаруживаются небольшие, но хорошо выраженные гроздевидные опухолевые разрастания в области желудка и селезенки, а также в малом тазу, общим весом около 10 граммов. Наряду с этим уже обнаруживаются единичные метастазы на брыжейке кишечника. Убыль в весе у кроликов, забитых в этот срок исследования колеблется от 5% до 13% по сравнению с исходным весом.

Через 4-5 суток после перевивки опухолевого штамма, несмотря на более обширное поражение внутренних органов злокачественным новообразованием, чем в предыдущий срок исследования, когда кролики еще также подвижны и активно реагируют на окружающее, убыль в весе менее выражена, она колеблется от 3% до 7% по отношению к исходному весу.

На 7-8 сутки исследования убыль в весе по отношению к весу кролика до перевивки колеблется от 0,3% до 1%, то есть потеря в весе к этому периоду заболевания практически компенсируется, повидимому, за счет того, что животные еще хорошо принимают

корм и в результате того, что опухолевые разрастания поражают уже обширные области малого таза яичек, сальника, брыжейки кишечника.

На 9-II сутки эксперимента у всех исследуемых животных обнаруживается увеличение веса по сравнению с исходным на 2%-4%. К этому периоду заболевания кролики становятся малоподвижными, реакция на окружающее заметно ослабляется. В эпигастральной области ясно пальпируется плотная бугристость. При вскрытии животных, забитых в этот период заболевания, обнаруживаются массивные опухолевые разрастания на сальнике, достигающие 50-70 г, узлы опухолевой ткани обнаруживаются также на брыжейке кишечника, на брыжине, в малом тазу. В брюшной полости в ряде случаев в эти сроки имеется асцитическая жидкость. Наличие в организме значительных количеств вновь образованной опухолевой ткани, а также скопление асцитической жидкости, вероятно, дает наблюдаемое увеличение веса исследуемых животных в этот период заболевания.

Вместе с тем такое бурное развитие опухолевой болезни приводит к интенсивному расходованию всех резервных веществ тканей. В эти сроки развития карциномы Броуна-Пирс при вскрытии животных не обнаруживается уже жировых депо в подкожной клетчатке, около почек, в малом тазу, а весь сальник прорастает опухолевой тканью. Поэтому в результате развивающейся кахексии в последующие дни заболевания снова наблюдается падение веса подопытных животных с колебаниями от 0,3% до 4% по отношению к исходному весу. Такая картина наблюдается на 12-13 сутки после перевивки животным опухолевого штамма, когда кролики становятся уже пассивными, много лежат, корм принимают неохотно

и в небольших количествах. При вскрытии забитых животных в эпигастральной области обнаруживаются массивные опухолевые разрастания, достигающие веса 100 г, прорастающие всю ткань сальника, наряду с этим гроздевидные опухолевые разрастания обнаруживаются в малом тазу, на брыжейке кишечника, а на диафрагме, брыжине и стенках кишечника наблюдаются множественные узлы — метастазы опухоли. В этот период в ряде случаев наблюдаются также метастазы в печени, в почках и в легких, а в брюшной полости обнаруживается большее или меньшее количество асцитической жидкости.

Бурный рост опухолевой ткани и накопление асцитической жидкости в брюшной полости в последующие дни заболевания так интенсивны, что они преобладают над процессами, ведущими к убыли в весе в результате кахексии животных, следствием чего является увеличение веса животных в течение 14–17 суток развития заболевания с колебаниями от 5% до 12% в сравнении с исходным весом.

Однако, в дальнейшем развивающаяся кахексия становится настолько выраженной, что, несмотря на рост опухолевой ткани и накопление асцитической жидкости в брюшной полости, начинается неуклонное падение веса подопытных животных, которое постепенно нарастает к моменту гибели подопытных животных. На протяжении 19–23 суток исследования вес подопытных животных падает с индивидуальными колебаниями для различных животных от 6% до 35% по отношению к исходному весу животных в начале опыта.

Приведенные данные о степени поражения организма злокачественным новообразованием в сопоставлении с изменением веса подопытных животных еще раз подтверждают положение о том, что

наблюдаемая цикличность изменения веса кроликов с карциномой Броуна-Пирс находится в определенной связи с развитием у животных опухолевой болезни, это является совершенно очевидным потому, что, забивая животных с привитой карциномой Броуна-Пирс на различных этапах развития опухолевого процесса, мы всегда одновременно забивали здоровых контрольных животных, находившихся в аналогичных условиях опыта, у которых вес в течение всего эксперимента практически не изменялся.

У забитых животных опытной и контрольной группы после вскрытия брюшной полости быстро извлекалась печень, которая тотчас взвешивалась на техно-аналитических весах. Затем на торсионных весах отвешивалось 0,5 грамма печеночной ткани для количественного определения гликогена в печени исследуемого животного, и примерно такое же количество печеночной ткани бралось для гистохимического исследования содержания гликогена в ней. Во всех случаях кусочки печени для этих анализов отсекались из одной и той же доли исследуемого органа. Из оставшейся большей части печени мы получали химически чистые препараты гликогенов, которые использовались для изучения структуры их молекул.

Для определения количества гликогена в печени подопытных животных мы всегда использовали методику Пфлюгера, модифицированную А.М. Генкиным (1946). Принцип ее сводится к гидролитическому расщеплению белков исследуемой ткани с помощью щелочи, осаждению гликогена из полученного гидролизата серноокислым калием и 96° спиртом, последующему кислотному гидролизу гликогена и определению образовавшейся при этом глюкозы по методу Хагедорна-Иенсена. По количеству найденной глюкозы высчитывается затем количество гликогена и выражается в процентах.

Исследование начиналось с того, что 0,5 г быстро извлеченной печени только что убитого животного помещалось в широкую

центрифужную пробирку с 1 мл горячей 60-процентной щелочи. Пробирка закрывалась стеклянной пробкой и помещалась на кипящую водяную баню на 45 минут, в течение которых содержимое пробирки перемешивалось через каждые 5-10 минут путем встряхивания. По окончании щелочного гидролиза в охлажденную пробирку добавлялось 0,5 мл 10-процентного раствора сернистого калия и 5 мл 96° спирта. Затем содержимое пробирки перемешивалось и оставлялось стоять на два часа, в течение которых производилось периодическое встряхивание содержимого пробирки. После двухчасового осаждения осадок центрифугировался в течение 30 минут, а жидкость над осадком осторожно удалялась путем отсасывания. К осадку и оставшейся в небольшом количестве жидкости добавлялось 2 мл дистиллированной воды, и пробирки ставились на горячую водяную баню до полного растворения осадка. Затем, после охлаждения, к содержимому пробирки прибавлялось 5 мл (двойной объем) 96° спирта, и, после встряхивания, закрытая стеклянной пробкой пробирка оставлялась стоять на два часа, в течение которых производилось периодическое встряхивание ее содержимого. После двухчасового осаждения производилось 30-минутное центрифугирование и последующее удаление прозрачной, слегка окрашенной жидкости, имевшейся над осадком. При отсасывании этой жидкости небольшое количество ее неизбежно оставалось над осадком. Поэтому пробирка помещалась в горячую водяную баню, где оставшаяся жидкость быстро испарялась. Пробирка находилась на водяной бане до исчезновения запаха спирта, после чего к оставшемуся, почти сухому остатку добавлялось 5 мл дистиллированной воды. Затем пробирка вновь ставилась на водяную баню до растворения осадка. После охлаждения содержимое пробирки

нейтрализовалось 10% раствором серной кислоты. Наличие нейтральной реакции устанавливалось с помощью лакмусовой бумажки. Количество 10% серной кислоты, пошедшее на нейтрализацию, точно учитывалось и фиксировалось в протоколе опыта. Далее пробирка с нейтрализованным содержимым оставалась стоять на 10 минут, после чего содержимое ее фильтровалось через ватный фильтр. По степени опалесценции фильтрата можно было уже ориентировочно судить о большем или меньшем содержании гликогена в исследуемой ткани. В зависимости от предполагаемого количества гликогена мы брали по 0,5 мл или по 1,0 мл нейтрализованного фильтрата и переносили в две узкие химические пробирки, которые являлись параллельными пробами для данной навески ткани. Вместе с тем 0,5 мл или 1 мл фильтрата помещались в две широкие пробирки, которые служили контролем в данном определении. Затем в каждую пробирку с нейтрализованным фильтратом добавлялось по 5 мл 2-нормальной серной кислоты, и общий объем в каждой пробирке доводился дистиллированной водой до 10 мл. После этого опытные пробы, закрытые стеклянными пробками, ставились в кипящую водяную баню на 2 часа, в течение которых происходило гидролитическое расщепление гликогена под влиянием серной кислоты. Содержимое контрольных проб нейтрализовалось 2-нормальной щелочью до слабо-щелочной реакции на лакмус. Пробирки с опытными пробами после двухчасового кислотного гидролиза охлаждались, и содержимое их переносилось в широкие пробирки, приспособленные для титрования. С целью полного количественного перенесения всех образовавшихся при гидролизе гликогена редуцирующих веществ каждая узкая химическая пробирка ополаскивалась двумя миллилитрами дистиллированной воды, которая сливалась

в соответствующую данной пробе широкую пробирку. Затем гидролизат нейтрализовался 2-нормальной щелочью до слабо-щелочной реакции на лакмус. После этого в опытных и контрольных пробах определялось количество редуцирующих веществ по методу Хагедорна-Менсена. С этой целью к содержимому пробирок прибавлялось по 2 мл точно отмеренного 0,005-нормального раствора железосинеродистого калия, после чего пробирки ставились на 15 минут в кипящую водяную баню. Затем, после охлаждения, к содержимому пробирок прибавлялось по три миллилитра тройной смеси, включающей в себя сернокислый цинк, иодистый калий и хлористый натрий. Сюда же прибавлялось по 2 мл 3% уксусной кислоты и по 2 капли 1% раствора крахмала, приготовленного на насыщенном растворе хлористого натрия. Добавление раствора крахмала приводило к появлению синего окрашивания, вследствие присутствия свободного йода, выделившегося при взаимодействии йодистого калия с избытком железосинеродистого калия, не восстановленного редуцирующими веществами, находящимися в данной пробе. Этот свободный йод оттитровывался точным 0,005-нормальным раствором тиосульфата натрия. Титрование производилось из микробюретки и продолжалось до исчезновения синей окраски, т.е. до обесцвечивания жидкости. Количество мл 0,005-нормального раствора тиосульфата натрия, идущее на титрование опытной и контрольной пробы, фиксировалось в протоколе опыта. Затем, как для опытной, так и для контрольной пробы, высчитывались средние величины, полученные из данных титрования двух параллельных проб, отличающихся друг от друга не более чем на 0,05 мл. По средним данным титрования, соответствующим опытной и контрольной пробам, по таблице мы находили соответствующие редукционные показатели, которые

указывают количество миллиграммов редуцирующих веществ, условно выраженных в количестве миллиграммов глюкозы, в опытной и контрольной пробах. Разность между редуциционными показателями опытной и контрольной пробы давала нам количество миллиграммов глюкозы, образовавшейся при кислотном гидролизе гликогена, содержащегося в 0,5 или 1,0 мл раствора гликогена. Умножая полученное число на общий объем раствора гликогена (с учетом объема добавленного для нейтрализации 10%-раствора серной кислоты), мы получали количество миллиграммов глюкозы во взятой нами навеске печеночной ткани, из которой данный раствор был получен. Исходя из полученных данных, производился расчет количества миллиграммов глюкозы на 100 граммов сырой печени. Затем, переводя миллиграммы в граммы и умножая полученное число на коэффициент 0,927, мы получали количество гликогена в исследуемой ткани, выраженное в процентах.

Этим же методом мы пользовались во всех случаях, где требовалось определить содержание гликогена в растворе или инкубационной смеси, для чего вместо навески печеночной ткани брали соответствующий объем исследуемого раствора.

Препаративное выделение гликогена из печени подопытных животных производилось нами по методу Остерна и Хабля (*R. Ostern, S. Hübner*, 1939), для чего быстро извлеченная печень только что убитого животного, после взвешивания, погружалась в ступку с охлажденным 5% раствором трихлоруксусной кислоты, количество которого составляло одну часть двойного объема по отношению к весу взятой печеночной ткани. Погруженная в раствор печень измельчалась вначале острыми ножницами, а затем растиралась пестиком до однородной массы, после чего в ступку приливалось

недостающее до двойного объема количество 5% раствора трихлоруксусной кислоты. В двойном объеме 5% трихлоруксусной кислоты печеночная ткань экстрагировалась на льду в течение часа, причем в процессе экстрагирования продолжалось дальнейшее растирание ее с помощью пестика в присутствии небольшого количества кварцевого песка. После этого полученный экстракт центрифугировался в больших центрифужных пробирках в течение 30 минут при 3000 об/мин. По окончании центрифугирования опалесцирующая надосадочная жидкость из всех пробирок сливалась в мерный цилиндр или мензурку, где измерялся объем полученной жидкости. Затем эта жидкость сливалась в колбу, куда добавлялся двойной объем 96° спирта. При добавлении спирта, после перемешивания, из раствора выпадал белый хлопьевидный осадок гликогена. Для лучшего осаждения колба оставлялась стоять на холоде в течение двух часов, после чего производилось центрифугирование, в результате которого отделялся выпавший осадок гликогена, который оставался на дне центрифужных пробирок. Прозрачная, слегка окрашенная, надосадочная жидкость сливалась, а к осадку гликогена в каждую пробирку добавлялись равные объемы горячей дистиллированной воды, после чего пробирки помещались на горячую водяную баню до полного растворения осадка. Из полученного раствора, после охлаждения, гликоген вновь осаждался двойным объемом 96° спирта. Такая процедура повторялась три раза, в результате чего осадок гликогена освобождался от возможных растворимых в воде примесей. После этого отцентрифугированный осадок гликогена промывался в 96° спирте и вновь центрифугировался с последующим сливанием надосадочной жидкости. Такое промывание осадка гликогена в спирте повторялось три раза, в результате чего

препарат гликогена освобождался от примесей, способных раствориться в спирте. Окончательная очистка полученного гликогена производилась путем трехкратного промывания осадка эфиром, с последующим центрифугированием после каждого промывания. В результате получался белоснежный, рассыпчатый порошок гликогена, который высушивался и хранился в эксикаторе над фосфорным ангидридом.

С целью проверки химической чистоты полученных препаратов гликогенов в каждом из них определялось содержание азота и фосфора. Количество азота в полученных препаратах определялось с помощью микрометода Кьельдаля в модификации И.И.Котлярова (1960). Принцип метода сводится к тому, что гликоген подвергается минерализации концентрированной серной кислотой, при этом углерод исследуемого соединения окисляется до углекислого газа, из водорода и кислорода образуется вода, сера серной кислоты восстанавливается и выделяется в виде сернистого газа, азот отщепляется в виде аммиака, который в присутствии серной кислоты превращается в серноокислый аммоний. Последний разлагается концентрированной щелочью с образованием аммиака, который перегоняется с парами воды в приемник, где он улавливается титрованным раствором серной кислоты. Избыток серной кислоты, не вступившей в реакцию с аммиаком, оттитровывается раствором щелочи той же нормальности. Параллельно ставится контроль на реактивы.

Для проведения исследования каждый выделенный из печени препарат гликогена растворялся в горячей, предварительно прокипяченной, бидистиллированной воде из расчета 20 мг/мл.

Точная концентрация гликогена в полученном растворе определялась путем кислотного гидролиза исследуемого полисахарида, для чего 0,1 мл полученного раствора с помощью микропипетки помещалось в узкую пробирку с 3,5 мл дистиллированной воды, куда, после перемешивания, добавлялось 1,5 мл 2-нормальной серной кислоты. Пробирки закрывались стеклянными пробками и ставились на кипящую водяную баню на 3 часа, после чего по количеству образовавшейся при гидролизе глюкозы высчитывалась точная концентрация гликогена в исследуемом растворе. Вместе с тем 0,5 мл приготовленного раствора гликогена, аккуратно без разбрызгивания, помещалось на дно Кьельдалевской колбы, куда добавлялось 10 капель концентрированной серной кислоты. Отверстие колбы закрывалось влажной марлевой пробкой, после чего вся колба равномерно прогревалась на пламени спиртовки, чтобы впоследствии при выпаривании жидкости устранить излишнее оседание водяных паров на стенках колбы. Затем жидкость постепенно выпаривалась при непрерывном покачивании нижнего конца колбы, что препятствовало бурному вскипанию и разбрызгиванию жидкости. Как только остаток жидкости темнел, и в колбе появлялись тяжелые белые пары сернистого ангидрида, выпаривание прекращалось, и вся колба вновь прогревалась для удаления осевших на стенках паров воды. После охлаждения к сжигаемой смеси прибавлялось 2 капли пергидроля, содержимое колбы перемешивалось легким взбалтыванием и вновь нагревалось до появления тяжелых белых паров, после чего нагревание продолжалось еще 20 секунд. Затем колба охлаждалась и в нее снова добавлялось 2 капли пергидроля. Сжигание повторялось в том же порядке до полного обесцвечивания жидкости в колбе. После охлаждения в перегонную

колбу, содержащую бесцветную жидкость, вносилось 10 мл дистиллированной воды, а в приемную колбочку аппарата Кьельдаля наливалось точно 2 мл 0,01-нормального раствора серной или соляной кислоты. Приемная колбочка устанавливалась под холодильник, кончик которого не доходил до 0,01-нормального раствора кислоты приблизительно на 1 см. После этого в перегонную колбу прибавлялось 18 капель 33% раствора гидрата окиси натрия, и колба немедленно включалась в микроаппарат Кьельдаля, модифицированный И.И.Котляровым. Дно перегонной колбы осторожно нагревалось пламенем спиртовки и в дальнейшем подогревалось для поддержания легкого кипения. Перегонка заканчивалась при уменьшении объема жидкости в перегонной колбе приблизительно до 4 мл. Затем производилось титрование жидкости, содержащейся в приемной колбочке. Для этого в колбочку вносили 1-2 капли раствора индикатора конго-рот, отчего жидкость окрашивалась в синий цвет, и производили титрование из микробюретки 0,01-нормальным раствором гидрата окиси натрия до появления красного окрашивания. Одновременно аналогично обрабатывалась вторая перегонная колба, предназначенная для контрольного определения азота, имевшегося в небольших количествах в реактивах, а также в воде. По разности результатов титрования контрольной и опытной пробы определяли какое количество кислоты связывалось с аммиаком, освободившимся при сжигании исследуемого вещества, и вычисляли содержание аммиака и азота в пробе, взятой для анализа, после чего высчитывали процентное содержание азота в изучаемом препарате гликогена.

Данные определения азота в препаратах гликогенов, выделенных из печени здоровых кроликов и пораженных карциномой

Броуна-Пирс, представлены в приложении в таблице II. Они свидетельствуют о том, что в препаратах гликогенов печени здоровых кроликов содержание азота колеблется от 0,013% до 0,053%, а в препаратах гликогенов, выделенных из печени животных, пораженных раком, обнаруживается от 0,012% до 0,050% азота, то есть примерно в одних и тех же количествах, соответствующих тем, которые находили в препаратах гликогенов и другие исследователи

Количество фосфора в полученных препаратах гликогена определялось по методу Фиске и Себерроу. Принцип метода сводится к тому, что фосфор реагирует с молибденовой кислотой, образуя фосформолибденовую кислоту, которая восстанавливается аминафтаолсульфоновой кислотой (эйконогеном) и сернистым натрием в молибденовую синь. По интенсивности развившейся окраски, определяемой колориметрически, вычисляют количество фосфора в анализируемой пробе, после чего рассчитывают концентрацию его в исследуемом материале в процентах.

Стандартный раствор, используемый при колориметрировании, готовили из однометального фосфорнокислого калия, который отвешивали на аналитических весах в количестве 0,1759 грамма и растворяли в небольшом количестве дистиллированной воды, помещенной в мерную колбу емкостью в 1 литр. После растворения соли прибавляли 10 мл 0,1-нормального раствора серной кислоты и доводили дистиллированной водой до метки. Такой раствор содержал 0,2 мг фосфора в 5 мл объема, следовательно, концентрация стандартного раствора была 0,004 мг/мл.

Раствор молибденовокислого аммония, используемый в работе, готовился путем растворения 25 граммов этой соли в 500 мл 0,1-нормального раствора серной кислоты, помещенной в литровую

мерную колбу, оставшийся объем которой, после полного растворения соли, заполнялся дистиллированной водой до метки.

Для приготовления раствора эйконогена, необходимого для проведения анализа, в колбу емкостью 100 мл отвешивали 14,25 грамма бисульфита натрия и 0,25 грамма аминафтаосульфоновой кислоты, прибавляли 80 мл воды и 10 мл 5-процентного раствора сернистокислового натрия. Содержимое колбы перемешивали. Если аминафтаосульфоновая кислота не растворялась, прибавляли по 0,2 мл 5-процентного раствора сернистокислового натрия до тех пор, пока не происходило полное растворение осадка, после чего объем доводили дистиллированной водой до 100 мл.

Для определения фосфора в исследуемом препарате готовился раствор гликогена, содержащий 20 мг/мл, концентрация которого каждый раз уточнялась с помощью кислотного гидролиза анализируемого полисахарида, описанным выше методом. После этого 1 мл раствора гликогена помещался в пробирку, куда прибавлялось 6-7 капель концентрированной серной кислоты и 1 мл концентрированной азотной кислоты. Содержимое пробирки перемешивалось и осторожно нагревалось до тех пор, пока не прекращалось выделение паров. К этому времени на дне пробирки оставалось несколько капель прозрачной жидкости, которая охлаждалась. Затем в пробирку добавлялось 5 мл дистиллированной воды, и содержимое пробирки переносилось в мерную колбу емкостью 50 мл. Пробирка трижды ополаскивалась 5-ю мл воды, которую каждый раз добавляли к жидкости в колбе, после чего туда вносилось 5 мл раствора молибденовокислого аммония и 2 мл раствора эйконогена.

Одновременно обрабатывался стандартный раствор, для чего в мерную колбу емкостью 50 мл отмеривалось 5 мл стандартного

раствора, 25 мл дистиллированной воды, 5 мл раствора молибденово-кислого аммония и 2 мл раствора эйконогена.

Затем опытные пробы и стандарты доводились до метки дистиллированной водой, тщательно перемешивались, после чего колориметрировались. По данным колориметрии опытной пробы и стандартного раствора, а также по объему ^и найденной концентрации взятого для анализа раствора гликогена и по известной концентрации стандартного раствора рассчитывалось процентное содержание фосфора в исследуемых препаратах гликогена.

Данные определения фосфора в препаратах гликогенов, выделенных из печени здоровых кроликов и пораженных карциномой Броуна-Пирс, представлены в приложении в таблице II. Они свидетельствуют о том, что содержание фосфора в препаратах гликогенов печени здоровых кроликов колеблется от 0,0011% до 0,0061%, а для различных препаратов гликогенов печени кроликов, пораженных карциномой Броуна-Пирс, эти колебания наблюдаются от 0,0010% до 0,0077%.

Полученные данные позволяют считать, что количество фосфора в полученных препаратах гликогенов ничтожно и обнаруживается лишь в виде следов.

Таким образом, на основании анализа результатов, полученных при исследовании выделенных нами препаратов гликогенов на содержание в них азота и фосфора, можно считать, что они являются достаточно чистыми и могут быть оценены как химически чистые вещества.

Только такие, предварительно доведенные до постоянного веса, препараты гликогенов использовались нами в дальнейшем для изучения показателей, характеризующих структуру этих

полисахаридов. Такими показателями в наших исследованиях служили: длина наружных и внутренних ветвей интересующих нас гликогенов, средняя величина их единицы цепи и степень ветвления, тип связей между глюкозными остатками в разветвленных молекулах гликогенов, а также электронномикроскопическая характеристика их структуры.

Для суждения о длине наружных ветвей гликогенов печени кроликов, пораженных карциномой Броуна-Пирс, а также здоровых животных, мы изучили кинетику процесса бета-амилолиза, осуществляемого под влиянием α -1,4-глюкан-мальтогидролазы, извлеченной из соевой муки по методу Баурна и сотрудников (E. Bourne, A. Masey, S. Peat, 1949).

Дополнительные данные о длине наружных ветвей интересующих нас полисахаридов мы получили, изучая Иод-гликогеновые кривые, построенные на основании результатов фотометрирования абсорбционных соединений гликогенов с йодом, по методике, разработанной Б.Н. Степаненко и Е.М. Афанасьевой (1947).

О степени ветвления исследуемых гликогенов мы судили по средней величине единицы цепи, найденной для каждого препарата гликогена с помощью периодатного метода, предложенного Поттером и Хассидом (A. Potter, Hassid, 1948).

Для определения типа связей между глюкозными остатками в гликогенах учитывалось число молей поглощенного периодата натрия, найденное методом Флери и Ланге (P. Fleury, J. Lange, 1933), и число молей, выделившейся муравьиной кислоты, определенное по методу Халсал, Хирст и Джонса (J. Halsall, E. Hirst, J. Jones, 1947) в модификации Ранкина и Джинса (J. Rankin, A. Jeanes, 1954), найденное при периодатном окислении полисахарида, рассчитанное на моль глюкозных остатков.

Все вышеприведенные методы подробно описаны нами ниже в соответствующих главах настоящей работы, также, как и расчеты, позволяющие на основании данных, полученных в эксперименте, иметь такие дополнительные характеристики о структуре гликогенов как их степень ветвления или длина внутренних ветвей молекул.

Наряду с химическими методами исследования для изучения структуры гликогенов печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс и здоровых животных мы использовали также физико-химические методы, такие, как хроматографический анализ и электронная микроскопия, которые описаны в соответствующих главах, посвященных изложению этих исследований.

Кроме всех вышеперечисленных методов мы применили в своей работе также гистохимический метод определения гликогена в тканях, разработанный А.Л.Шабадашем (1947). С помощью этого метода мы изучали динамику изменения содержания гликогена в печени кроликов в процессе развития в организме этих животных привитой карциномы Броуна-Пирс, что подробно описывается нами в главе, посвященной этим исследованиям, а также в приложении.

IV. СОБСТВЕННЫЕ НАБЛЮДЕНИЯ

I. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА БЕТА-АМИЛОЛИЗА ПОЛИСАХАРИДОВ С ЦЕЛЬЮ ИЗУЧЕНИЯ СТРУКТУРЫ ГЛИКОГЕНОВ ПЕЧЕНИ КРОЛИКОВ С КАРЦИНОМОЙ БРОУНА-ПИРС

Для выявления особенностей в структуре молекул гликогенов, полученных из печени животных, пораженных злокачественным новообразованием, мы изучили процесс бета-амилолиза гликогенов печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс и соответствующих препаратов гликогенов, выделенных из печени здоровых животных того же вида. Процесс бета-амилолиза осуществляется ферментом бета-амилозой (α -1,4-галакан-мальтогидролазой), которая катализирует распад α -1,4-связей в полисахаридах, отщепляя от них молекулы мальтозы. Последние отщепляются только от наружных ветвей полисахаридов со стороны нередуцирующих глюкозных остатков, так как бета-амилаза не способна разрушать α -1,6-связи, которые являются связями ветвления. Поэтому, достигнув в своем действии мест ветвления, бета-амилаза прекращает дальнейшее расщепление полисахарида. Следовательно, чем больше будет в молекуле полисахарида неразветвленных наружных цепей и чем они будут длиннее, тем больше будет степень расщепления исследуемого полисахарида бета-амилазой. Благодаря этому степень расщепляемости различных полисахаридов бета-амилазой может, в известной мере, характеризовать структуру их молекул.

В качестве ферментного препарата в наших опытах использовалась бета-амилаза, полученная из соевой муки по методу Баурна и сотрудников (E. Bourne, A. Mascay, S. Peat, 1949). Для этого 75 г соевой муки в течение 8 часов тщательно взбалтывалось с 380 мл 20% спирта. После прекращения взбалтывания взвесь

оставлялась до следующего дня для лучшего экстрагирования бета-амилазы. Затем производилось центрифугирование и осадок удалялся. Объем надосадочной жидкости, в которой содержалась бета-амилаза, измерялся, после чего к ней добавлялось такое количество спирта, чтобы конечная концентрация его в растворе составляла 65%. При такой концентрации спирта в растворе бета-амилаза выпадала в осадок, который отделялся центрифугированием, промывался спиртом, затем эфиром, и высушивался в эксикаторе над хлористым кальцием.

Полученный препарат бета-амилазы сохраняется длительное время, не теряя ферментативной активности. Однако, он может содержать альфа-амилазу и мальтазу, от которых препарат бета-амилазы должен быть тщательно очищен, что делается непосредственно перед опытом. Для этого готовится 0,3-0,4% раствор препарата фермента, который подкисляется с помощью 0,5N раствора соляной кислоты до $\text{pH} = 3,5 - 3,6$. Раствор с полученным значением водородного показателя оставляется на сутки в рефрижераторе. Образовавшийся при этом осадок удаляется центрифугированием, а pH полученного раствора доводится до 4,8. Приготовленный таким образом раствор бета-амилазы проверяется затем в течение 6-7 дней на содержание альфа-амилазы и мальтазы и в случае их отсутствия применяется для изучения расщепляемости полисахаридов.

Проверка чистоты раствора бета-амилазы осуществляется путем качественного изучения йодной реакции в процессе амилолиза крахмала. Для этого готовится инкубационная смесь, состоящая из 1 мл 0,5% раствора крахмала, 2 мл ацетатного буфера ($\text{pH} = 4,8$) и 3 мл раствора бета-амилазы, приготовленного вышеописанным образом. Инкубация осуществляется в термостате при температуре 37°C в течение 6-7 дней. Пробы для определения окрашивания

с Йодом берутся ежедневно в течение всей недели исследования, начиная с первого дня инкубации. Проба, проведенная с раствором Йода сразу после смешивания всех компонентов, входящих в инкубационную смесь, должна дать синее окрашивание, а во все последующие дни при проведении этой реакции будет наблюдаться фиолетовое окрашивание, если исследуемый ферментный препарат свободен от альфа-амилазы и мальтазы. Если же препарат загрязнен вышеуказанными ферментами, то окрашивание проб с раствором Йода с течением времени будет изменяться от фиолетового до красноватого и совершенно исчезнет к концу срока исследования. Такой препарат бета-амилазы не пригоден для работы без дополнительной очистки его от альфа-амилазы и мальтазы.

В наших исследованиях расщепление полисахаридов бета-амилазой производилось при помощи бета-амилазы, тщательно очищенной от альфа-амилазы и мальтазы, в оптимальных условиях ее действия.

В опытах, посвященных изучению кинетики процесса бета-амилолиза гликогенов печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс и соответствующих препаратов гликогенов печени здоровых животных, субстратами действия фермента служили 0,1% и 0,5% растворы интересующих нас гликогенов, а также растворы крахмала, взятые для сравнения в тех же концентрациях. Инкубационные смеси для определения процента расщепляемости полисахаридов готовились из 4 мл 0,4% раствора препарата бета-амилазы, 6 мл предварительно прокипяченного ацетатного буфера ($pH=4,8$) и 1 мл раствора полисахарида той или иной концентрации (0,1% или 0,5%), приготовленного на прокипяченной воде. Инкубационные смеси в течение всего срока опыта выдерживались при температуре $20^{\circ}C$.

Из каждой смеси, сразу после приготовления и перемешивания растворов, отбирались по 4 пробы: 2 пробы по 0,1 мл для

определения концентрации гликогена в смеси и 2 пробы по 1 мл для определения мальтозы, обеспечивающей исходную редукцию смеси. Затем пробы для определения редукции смесей брались через 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,5, 5,5, 7,0, 9,0, 12,0, 24,0 часа и далее на протяжении последующих суток до установления постоянных показателей редукции, что позволяло установить предел расщепляемости бета-амилазой изучаемых полисахаридов.

Во взятых пробах осаждались белки по методу Сомоги, для чего к 1 мл взятой инкубационной смеси прибавлялось по 1 мл 5% раствора сернокислого цинка и по 1 мл 0,3-нормального раствора гидрата окиси бария. При этом вышеуказанные растворы точно соответствовали один другому, для чего предварительно раствор гидрата окиси бария оттитровывался раствором сернокислого цинка в присутствии фенолфталеина так, чтобы при титровании шло равное по объему количество добавляемого раствора.

После тщательного перемешивания инкубационных смесей с растворами сернокислого цинка и гидрата окиси бария выпавший в пробирках осадок отфильтровывался, и из фильтратов отбирались пробы по 1 мл в широкие пробирки, в которых по редукции определялось количество мальтозы по модифицированному методу Хагедорна и Иенсена. Для этого к фильтратам, находившимся в широких пробирках, добавлялось по 2 мл 0,0025-нормального раствора железосинеродистого калия, после чего пробы ставились на кипящую водяную баню на 15 минут. После охлаждения к содержимому пробирок прибавлялось по 3 мл раствора, содержащего сернокислый цинк (5%), йодистый калий (2,5%), хлористый натрий (25%), и 2 мл 3% раствора уксусной кислоты, после чего выделившийся йод оттитровывался 0,0025-нормальным раствором тиосульфата натрия в при-

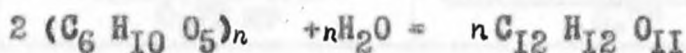
сутствии трех капель 0,1% раствора крахмала в качестве индикатора.

По количеству 0,0025-нормального раствора тиосульфата натрия, пошедшему на титрование каждой пробы и контроля, вычислялось количество миллиграммов мальтозы в инкубационной смеси, для чего использовалась предварительно составленная таблица. Для составления таблицы, позволяющей быстро найти количество миллиграммов мальтозы в миллилитре исследуемого раствора, опытным путем была установлена зависимость между количеством мальтозы и количеством миллилитров 0,0025-нормального раствора тиосульфата натрия, идущего на титрование йода, выделяющегося при взаимодействии того или иного количества мальтозы с железосинеродистым калием, в присутствии йодистого калия и сернокислого цинка, для чего была определена восстанавливающая способность целого ряда растворов мальтозы, концентрация которых находилась в пределах от 0,001 мг до 0,2 мг в 1 мл.

В пробах, взятых из инкубационных смесей для определения концентрации гликогена в них, производился кислотный гидролиз, для чего в узкие пробирки, закрываемые стеклянными пробками, предварительно наливалось по 1,5 мл 2-нормального раствора соляной кислоты и по 3,5 мл дистиллированной воды, куда с помощью микропипетки затем переносилось по 0,1 мл инкубационной смеси. После тщательного ополаскивания и выдувания содержимого микропипетки, пробирки закрывались пробками и помещались на кипящую водяную баню на 3 часа. После кислотного гидролиза содержимое пробирок охлаждалось, количественно переносилось в широкие пробирки, где с помощью 2-нормального раствора едкого натрия реакция смесей доводилась до нейтральной или слабо-

щелочной на лакмус. После этого глюкозу, образовавшуюся при кислотном гидролизе гликогена, определяли с помощью метода Хагедорна и Иенсена. По количеству найденной глюкозы определялась точная концентрация гликогена, имеющаяся в инкубационной смеси до начала бета-амилолиза.

Зная концентрацию гликогена в инкубационной смеси до начала бета-амилолиза, а также исходное количество мальтозы в ней, определив затем количество мальтозы, образовавшейся в процессе бета-амилолиза, можно рассчитать процент расщепляемости гликогена, учитывая стехиометрические соотношения при реакции гидролиза гликогена бета-амилазой:



На основании этого уравнения найденное количество миллиграмм мальтозы, образовавшейся за тот или иной период инкубации, необходимо умножить на коэффициент 0,95.

Пример расчета процента расщепляемости полисахарида бета-амилазой иллюстрируется в приведенной таблице № I.

Таким способом рассчитывался процент расщепляемости полисахаридов в процессе бета-амилолиза во все изучаемые нами сроки инкубации.

Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что во всех случаях бета-амилолиза процент расщепляемости полисахаридов увеличивался со временем, достигая определенного предела, что можно видеть на примере данных, приведенных в таблице № 2.

Таблица № 1

Вычисление процента расщепляемости полисахарида
бета-амилазой по результатам эксперимента

	Определение количества: гликогена		Определение количества мальтозы			
	До инкубации		До инкубации		После инкубации	
	Количество: Редукцион.	К-во мл: Редукц.	К-во мл: Редукц.	К-во мл: Редукц.	К-во мл: Редукц.	К-во мл: Редукц.
	мл. 0,005 N : показатель	0,0025 N : показат.	0,0025 N : показат.	0,0025 N : показат.	0,0025 N : показат.	0,0025 N : показат.
	р-ра $Na_2S_2O_3$ в мг глюкозы	р-ра $Na_2S_2O_3$ в мг мальтозы	р-ра $Na_2S_2O_3$ в мг мальтозы	р-ра $Na_2S_2O_3$ в мг мальтозы	р-ра $Na_2S_2O_3$ в мг мальтозы	р-ра $Na_2S_2O_3$ в мг мальтозы
Проба № 1	1,44	0,099	1,65	0,035	0,54	0,146
Проба № 2	1,44	0,099	1,65	0,035	0,54	0,146
Контроль	1,92	0,014	1,77	0,023	1,77	0,023
Расчет про- цента рас- щепляемости гликогена	$0,099 - 0,014 = 0,085 \text{ мг}$ $0,085 \cdot 10 \cdot 0,927 = 0,79 \text{ мг}$		$0,035 - 0,023 = 0,012 \text{ мг}$ $(0,122 - 0,012) \cdot 3 \cdot 0,95 \cdot 100 = 39,7\%$ $0,79$			

Таблица № 2

Изменение процента расщепляемости различных полисахаридов
в процессе бета-амилолиза

Время ин- кубации в часах	Название полисахаридов и их концентрация					
	Крахмал		Гликоген печени здорового кролика		Гликоген печени кролика с карцино- мой Бруна-Пирс	
	0,1% р-р	0,5% р-р	0,1% р-р	0,5% р-р	0,1% р-р	0,5% р-р
1,0	30,2	19,5	9,7	7,2	2,8	3,4
1,5	37,3	25,9	12,5	9,4	4,4	4,6
2,0	40,0	31,1	13,7	11,0	5,6	5,5
2,5	44,5	33,4	15,3	13,5	5,7	6,4
3,5	50,0	43,5	19,8	16,5	5,7	8,4
4,5	54,0	49,5	22,6	20,0	8,5	9,8
5,5	58,6	52,9	24,2	22,2	8,9	10,1
7,0	62,1	56,4	25,8	24,8	9,5	12,4
9,0	65,8	65,8	28,3	27,2	10,0	14,5
12,0	71,5	72,1	31,5	33,4	11,3	16,9
24,0	86,8	87,0	41,6	41,5	17,3	23,9

Полагая, что отличия в структуре полисахаридов, если они имеют место, должны оказать влияние на закономерность течения бета-амилолиза, мы решили изучить кинетику этого процесса. Анализируя кинетику изучаемого ферментативного процесса, мы исходили из общепринятого положения о том, что бета-амилаза (Е) действует на полисахарид (S), в результате чего образуется промежуточный комплекс, состоящий из фермента и субстрата (ES), который далее необратимо распадается с образованием мальтозы (М) остаточного декстрина (Д) и свободного фермента (Е):



Скорость данного ферментативного процесса находится по уравнению Михаэлиса и Ментена $V = \frac{V \cdot S}{K_m + S}$ или $V = \frac{V}{1 + \frac{K_m}{S}}$, где V — максимальная скорость процесса, K_m — константа Михаэлиса, S — концентрация субстрата в момент времени t .

Вместе с тем скорость любого ферментативного процесса можно выразить как $V = \frac{dy}{dt}$. Следовательно, можно написать, что $\frac{dy}{dt} = \frac{V}{1 + \frac{K_m}{S}}$ или $\frac{dy}{dt} = \frac{V}{\frac{S + K_m}{S}}$. Преобразовывая это уравнение, получаем: $dy \left(\frac{K_m + S}{S} \right) = V \cdot dt$; после интегрирования приведенного уравнения $\int \frac{dy \cdot K_m}{S} + \int dy = \int V \cdot dt$ мы будем иметь $K_m \cdot \ln \frac{S_0}{S_0 - y} + y = V \cdot t$ — уравнение Михаэлиса — Ментена в интегральной форме, где K_m — константа Михаэлиса, V — максимальная скорость реакции, t — время, S_0 и y — число связей в единице раствора, способных подвергаться деструкции в начале реакции и в момент времени t .

Этому уравнению можно придать иную форму, если принять, что $\frac{y}{S_0} = \frac{x}{x_0}$, поскольку отношение числа связей в единице раствора, расщепляющихся в момент времени t , к числу связей, способных расщепляться в начале реакции, пропорционально отношению процента расщепляемости полисахарида в данный момент

времени t к пределу его расщепляемости. Отсюда $y = s_0 \frac{x}{x_0}$. Подставляя значение y в интегральную форму уравнения Михаэлиса-Ментена, получаем уравнение: $K_m \cdot \ln \frac{s_0}{s_0 - s_0 \frac{x}{x_0}} + s_0 \frac{x}{x_0} = v \cdot t$; Преобразуем его следующим образом: $K_m \cdot \ln \frac{1}{1 - \frac{x}{x_0}} + s_0 \frac{x}{x_0} = v \cdot t$,
 $K_m \cdot \ln \frac{1}{\frac{x_0 - x}{x_0}} + s_0 \frac{x}{x_0} = v \cdot t$; $K_m \cdot \ln \frac{x_0}{x_0 - x} + s_0 \frac{x}{x_0} = v \cdot t$;

При делении каждого члена уравнения на одну и ту же величину, равную произведению $K_m \cdot x$, равенство не изменится, однако, уравнение примет другую форму, а именно: $\frac{\ln \frac{x_0}{x_0 - x}}{x} + \frac{s_0}{K_m \cdot x_0} = \frac{v}{K_m} \cdot \frac{t}{x}$, где $\frac{s_0}{K_m \cdot x_0}$ и $\frac{v}{K_m}$ в данный момент времени есть величины постоянные, которые можно обозначить буквами a и b . Следовательно, $a = \frac{s_0}{K_m \cdot x_0}$ или, если выразить ее через $y = s_0 \frac{x}{x_0}$, то $a = \frac{y}{2,303 \cdot K_m \cdot x}$; $b = \frac{v}{K_m} = \frac{v}{2,303 \cdot K_m}$; а уравнение примет вид: $\frac{\lg \frac{x_0}{x_0 - x}}{x} + a = b \frac{t}{x}$.

Это уравнение представляет собой уравнение прямой, поэтому, если значения функций $\frac{\lg \frac{x_0}{x_0 - x}}{x}$ и $\frac{t}{x}$ отложить на осях координат, то должна получиться прямая линия, при этом тангенс угла наклона прямой к оси абсцисс будет равняться величине b , а отрезок оси ординат при $\frac{t}{x} = 0$ даст значение a .

При проверке этого уравнения с применением наших экспериментальных данных мы действительно во всех случаях получили прямые, если откладывали на оси ординат величины, соответствующие $\frac{\lg \frac{x_0}{x_0 - x}}{x}$, а на оси абсцисс значения $\frac{t}{x}$, в чем легко убедиться, используя для построения графиков данные, приведенные в таблице № 2.

Из приведенных данных видно, что расположение прямых и угол наклона их по отношению к оси абсцисс не одинаков в случае

применения в качестве субстратов действия фермента различных полисахаридов.

В следующей таблице № 3 приводятся численные значения постоянных a и b для тех же полисахаридов, найденные способом наименьших квадратов.

Таблица № 3

Зависимость величин a и b от концентрации полисахаридов

Название полисахарида:	К р а х м а л		Гликоген печени здорового кро- лика		Гликоген печени кролика с карци- номой Броуна- :Пирс	
Концентра- ция в %	0,5	0,1	0,5	0,1	0,5	0,1
a	0,364	0,508	0,587	0,707	0,628	1,840
b	0,02393	0,02345	0,00970	0,0102	0,00273	0,00701

Используя эти показатели и несколько преобразовав вышеприведенное уравнение прямой, мы получили следующие кинетические уравнения для полисахаридов, данные о которых представлены в таблицах № 2 и № 3.

$$\lg \frac{x_0}{x_0 - x} - 0,364x = 0,02393t$$

$$\lg \frac{x_0}{x_0 - x} - 0,508x = 0,02345t$$

$$\lg \frac{x_0}{x_0 - x} - 0,587x = 0,00970t$$

$$\lg \frac{x_0}{x_0 - x} - 0,707x = 0,0102t$$

$$\lg \frac{x_0}{x_0 - x} - 0,628x = 0,00273t$$

$$\lg \frac{x_0}{x_0 - x} - 1,840x = 0,00701t$$

При этом средние отклонения наблюдаемых величин от вычисленных для каждой серии опытов составляли от 0,7% до 2,3%, что свидетельствует о пригодности наших уравнений для характеристики количественных изменений при бета-амилолизе полисахаридов.

В таблице № 4 для примера приводятся наблюдаемые величины $\lg \frac{x_0}{x_0 - x}$, полученные из данных эксперимента (Н) и соответствующие теоретически вычисленные величины (В) при различной относительной расщепляемости ($\frac{x}{x_0}$) 0,1% раствора гликогена печени здорового кролика бета-амилазой в зависимости от $\frac{t}{x}$. Для каждого опыта приводится отклонение наблюдаемых данных от вычисленных (Δ) в процентах, найденное как $\frac{H - B}{B} \cdot 100$.

Анализируя далее полученный материал, мы видим, что в уравнениях, которыми мы пользуемся, перед коэффициентом стоит знак минус, в то время как в выведенном нами исходном уравнении прямой перед соответствующим коэффициентом стоит обратный знак. Это значит, что в ходе бета-амилолиза имеет место термическая инактивация фермента или же инактивация фермента происходит в результате образования комплекса бета-амилазы с продуктами гидролиза полисахарида.

Термическая инактивация фермента в условиях наших опытов исключена. Можно допустить, что фермент образует комплексы с декстринами, однако, это не должно отразиться на скорости ферментативного процесса, так как общее количество бета-амилазы, связанной с декстринами, и той части полисахарида, из которой образуются декстрины, приблизительно остается постоянной.

Остается предположить, что фермент комплексуется с мальтозой, образующейся в процессе бета-амилолиза полисахарида,

Таблица № 4

Величины, характеризующие бета-амилолиз 0,1 -процентного раствора гликогена, выделенного из печени здорового кролика

Кинетическое уравнение $\lg \frac{X_0}{X_0 - X} = 0,707 x = 0,0102 t$

$\frac{X}{X_0}$ в %		16,6	21,4	23,4	26,2	33,9	38,7	41,4	44,1	48,4	53,8	71,1	85,6
$\frac{t}{X}$		10,3	12,0	14,8	16,3	17,7	19,9	22,7	27,1	32,0	38,1	57,7	95,9
$\lg \frac{X_0}{X_0 - X}$	H	0,812	0,832	0,846	0,861	0,907	0,933	0,959	0,980	1,015	1,066	1,298	1,682
	B	0,812	0,829	0,858	0,873	0,887	0,911	0,938	0,983	1,033	1,095	1,295	1,684
Откл. H от B в% (Δ)		0,0	+0,4	-1,4	-1,4	+2,2	+3,0	+2,2	-0,3	-1,7	-2,7	+0,2	-0,1

H — наблюдаемые величины, полученные из данных эксперимента;

B — теоретически вычисленные величины.

следствием чего является инактивация фермента, а следовательно и торможение изучаемого ферментативного процесса.

Схематически это можно представить так:

$E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + M + D$ (1); $E + M \rightleftharpoons EM$ (2), где E — фермент бета-амилаза, S — субстрат полисахарид, ES — полисахаридбета-амилазный комплекс, M — мальтоза, D — остаточный декстрин, EM — мальтознобета-амилазный комплекс.

При этих условиях концентрация активной массы фермента в инкубационной смеси уменьшается, в результате чего уменьшится и скорость ферментативной реакции. Для проверки правильности высказанного положения мы проанализировали кинетику системы, образующейся в условиях наших опытов.

По закону действующих масс константа равновесия реакции образования полисахарид-бета-амилазного комплекса $K_m = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]}$, а константа равновесия реакции образования мальтозно-бета-амилазного комплекса $K_m = \frac{[M][E]}{[ME]}$. Если при этом принять исходную концентрацию полисахарида в инкубационной смеси равной S , концентрацию образовавшегося полисахарид-бета-амилазного комплекса — a , концентрацию мальтозно-бета-амилазного комплекса — b , то в момент равновесия реакций концентрация свободной бета-амилазы в инкубационной смеси будет равна $e - a - b$, концентрация свободного полисахарида s , а концентрация свободной мальтозы $s_0 - s$. Подставляя эти значения концентраций в выше-написанные уравнения получаем:

$$K_m = \frac{s(e - a - b)}{a}, \text{ а } K_m = \frac{(s_0 - s)(e - a - b)}{b}$$

Возьмем отношение этих констант $\frac{K_m}{K_m} = \frac{s \cdot b}{(s_0 - s) \cdot a}$, откуда $K_m \cdot a (s_0 - s) = K_m \cdot s \cdot b$, а $b = \frac{K_m}{K_m} \cdot a \frac{(s_0 - s)}{s}$; если

теперь значение b подставить в уравнение, характеризующее константу равновесия полисахарид-бета-амилазного комплекса, то $K_m = \frac{s(e-a - \frac{K_m}{K_m} \cdot a \frac{s_0-s}{s})}{a}$, откуда $K_m \cdot a = s \cdot e - s \cdot a - \frac{K_m}{K_m} \cdot a (s_0-s)$.

Это уравнение можно преобразовать следующим образом:

$$K_m \cdot a + s \cdot a + \frac{K_m}{K_m} \cdot a (s_0-s) = s \cdot e \text{ или } a[K_m + s + \frac{K_m}{K_m}(s_0-s)] = s \cdot e$$

$$\text{откуда } a = \frac{s \cdot e}{K_m + s + \frac{K_m}{K_m}(s_0-s)}.$$

Как известно $V = \frac{dy}{dt} = - \frac{ds}{dt}$, следовательно, скорость распада полисахарид-бета-амилазного комплекса $V = - \frac{ds}{dt} = K \cdot a$. Отсюда $-\frac{ds}{dt} = \frac{K \cdot s \cdot e}{K_m + s + \frac{K_m}{K_m}(s_0-s)}$; но $K \cdot e = V$ — максимальная скорость процесса, поэтому можно написать

$$-\frac{ds}{dt} = \frac{s \cdot V}{K_m + s + \frac{K_m}{K_m}(s_0-s)}.$$

Произведем ряд преобразований этого уравнения, в результате которых получим: $-ds \left[\frac{K_m + s + \frac{K_m}{K_m}(s_0-s)}{s} \right] = V \cdot dt$;

$$-\frac{ds \cdot K_m}{s} - ds - \frac{K_m}{K_m} \cdot \frac{s_0}{s} \cdot ds + \frac{K_m}{K_m} \cdot ds = V \cdot dt;$$

$$-\left(\frac{ds}{s} K_m + \frac{ds}{s} \cdot s_0 \frac{K_m}{K_m}\right) - \left(ds - ds \frac{K_m}{K_m}\right) = V \cdot dt;$$

$$-\frac{ds}{s} \left(K_m + \frac{K_m}{K_m} \cdot s_0\right) - ds \left(1 - \frac{K_m}{K_m}\right) = V \cdot dt;$$

После интегрирования вышеприведенного уравнения будем иметь: $-\left(K_m + \frac{K_m}{K_m} \cdot s_0\right) \cdot \ln s - \left(1 - \frac{K_m}{K_m}\right) \cdot s = V \cdot t + C$, где C есть постоянная интегрирования. Значение этой величины можно узнать, если принять $t = 0$, а $s = s_0$, когда $V \cdot t = 0$. При этих условиях $-\left(K_m + \frac{K_m}{K_m} \cdot s_0\right) \cdot \ln s_0 - \left(1 - \frac{K_m}{K_m}\right) \cdot s_0 = C$.

Подставим теперь значение C в интегральную форму нашего уравнения, в результате чего получим:

$$\begin{aligned} -\left(K_m + \frac{K_m}{K_m} \cdot s_0\right) \ln s - \left(1 - \frac{K_m}{K_m}\right) s = \\ = V \cdot t - \left(K_m + \frac{K_m}{K_m} \cdot s_0\right) \ln s_0 - \left(1 - \frac{K_m}{K_m}\right) \cdot s_0 \end{aligned}$$

После ряда преобразований будем иметь:

$$-\left(K_m + \frac{K_m}{K_m} \cdot s_0\right) \ln s - \left(1 - \frac{K_m}{K_m}\right) \cdot s + \left(K_m + \frac{K_m}{K_m} \cdot s_0\right) \ln s_0 + \left(1 - \frac{K_m}{K_m}\right) s_0 = r \cdot t;$$

$$\left(K_m + \frac{K_m}{K_m} \cdot s_0\right) (\ln s_0 - \ln s) + \left(1 - \frac{K_m}{K_m}\right) (s_0 - s) = r \cdot t;$$

$$\left(K_m + \frac{K_m}{K_m} \cdot s_0\right) \ln \frac{s_0}{s} + \left(1 - \frac{K_m}{K_m}\right) (s_0 - s) = r \cdot t;$$

Но $s = s_0 - y$, откуда $y = s_0 - s$, учитывая это, вышеприведенное уравнение можно написать следующим образом:

$$\left(K_m + \frac{K_m}{K_m} \cdot s_0\right) \ln \frac{s_0}{s_0 - y} + \left(1 - \frac{K_m}{K_m}\right) y = r \cdot t \quad \text{или}$$

$$K_m \left(1 + \frac{s_0}{K_m}\right) \ln \frac{s_0}{s_0 - y} + \left(1 - \frac{K_m}{K_m}\right) y = r \cdot t.$$

В результате всех преобразований мы получили уравнение, аналогичное уравнению Михаэлиса-Ментена в интегральной форме: $K_m \cdot \ln \frac{s_0}{s_0 - y} + y = r \cdot t$, от которого наше уравнение отличается лишь некоторыми постоянными коэффициентами при переменной величине y .

Анализируя полученное уравнение, мы видим, что если $K_m > K_m$ и, следовательно, отношение $\frac{K_m}{K_m} > 1$, перед y появится знак минус (-). Таким образом, отрицательный знак может иметь место в этом уравнении только при условии, что константа равновесия полисахарид-бета-амилазного комплекса (K_m) больше константы равновесия мальтозно-бета-амилазного комплекса (K_m), а это свидетельствует о том, что при изучаемом нами процессе действительно происходит комплексообразование бета-амилазы с мальтозой. Вследствие этого количество свободного фермента в инкубационной смеси уменьшается и, как результат, наблюдается торможение процесса бета-амилолиза полисахаридов. Этим, вероятно, можно было объяснить появление отрицательного знака перед коэффициентом a в кинетических уравнениях, используемых нами

для характеристики изучаемого ферментативного процесса, поскольку

$$a = \frac{\gamma}{2,303 \cdot K_m \cdot X}$$

Для окончательного доказательства высказанного положения о торможении процесса бета-амилолиза вследствие образования в системе мальтозно-бета-амилазных комплексов мы решили использовать метод капилляризационной хроматографии, описанный А.М.Генкиным (1956).

С этой целью на полоски хроматографической бумаги размером 8 x 25 см на расстоянии 4 см от края наносился раствор мальтозы в одном случае и смесь растворов мальтозы и бета-амилазы в другом. Капли быстро подсушивались на воздухе, и полоски бумаги помещались в хроматографическую камеру, где подвешивались вертикально, погружаясь ближайшим к месту нанесения концом в фосфатный буфер (рН = 7,2). Камера плотно прикрывалась крышкой на 1,5 часа, в течение которых растворитель поднимался по бумажным полоскам на высоту 13-15 см. После этого бумажки высушивались и обрабатывались сначала в ацетоновом растворе азотнокислого серебра, затем в спиртовом растворе щелочи с целью выявления мальтозы, которая обнаруживалась в виде коричневых пятен. После высушивания полоски бумаги погружались в раствор тиосульфата натрия, где находились до обесцвечивания фона, а затем тщательно промывались водой и высушивались.

Полученные хроматограммы, представленные на рисунке № I, свидетельствуют о том, что мальтоза комплексуется с бета-амилазой. На это указывает тот факт, что при движении смеси растворов мальтозы и бета-амилазы на хроматограмме ясно виден размазанный след, обладающий редуцирующими свойствами, чего не наблюдается на контрольной хроматограмме, где наносился только раствор мальтозы, которая продвинулась с растворителем одним компактным пятном.

Это со всей очевидностью говорит о комплексообразовании мальтозы с бета-амилазой ($E + M \rightleftharpoons EM$), а наличие "хвоста" на хроматограмме, по-видимому, объясняется тем, что комплекс EM в силу равновесия в системе распадается и поскольку процесс этот идет во времени, то частицы мальтозы, освободившиеся при распаде комплекса в более поздние сроки, не успевают продвинуться так далеко, как основная масса свободной мальтозы, которая не была связана в комплексе или освободилась из него на первых этапах движения растворителя. Замедление скорости движения частиц мальтозы можно объяснить здесь только связыванием мальтозы с последующим освобождением ее из комплекса или же сохранением редуцирующих свойств мальтозы тогда, когда она находится в связанном состоянии и движется вместе с белком-ферментом, имеющим характерное расположение на бумаге, так как комплексоваться в условиях нашего опыта она могла только с бета-амилазой.

Таким образом, кинетическим методом и методом хроматографического анализа нами доказано, что бета-амилаза образует комплексы с мальтозой, следствием чего является торможение процесса бета-амилолиза полисахаридов.

Убедившись в образовании мальтозно-бета-амилазных комплексов, мы решили рассмотреть вопрос о скорости распада полисахаридно-ферментных комплексов в условиях изучаемого нами процесса.

С этой целью для обратимых процессов мы использовали закон действующих масс, а для необратимого процесса простейший закон кинетики, согласно которому скорость распада полисахаридно-ферментного комплекса как необратимого процесса равняется

$V = K \cdot a$ (I), где K — константа скорости этой реакции, a — концентрация полисахарид-бета-амилазного комплекса. При этом константа равновесия реакции образования полисахарид-бета-амилаз-



Рис. 1. Восходящие капилляризационные хроматограммы раствора мальтозы, содержащего 20 мг исследуемого вещества в 1 мл (I), и раствора мальтозы той же концентрации в присутствии бета-амилазы (II).

В обоих случаях объем наносимой на хроматографическую бумагу капли - 5 μ л.

Растворитель - фосфатный буфер
(pH = 7,2)

Температура в камере + 20°C. Время продвижения фронта растворителя - 1,5 часа.

Окраска хроматограмм - ацетоновым раствором азотнокислого серебра.

ного комплекса $K_m = \frac{s(e-a-b)}{a}$ (3), если принять ранее принятые обозначения концентраций полисахаридно-ферментного комплекса (а), полисахаридмальтозного комплекса (б) и полисахарида, имеющегося в начале реакции s_0 . Используя три полученных уравнения, можно определить величину V , для чего необходимо произвести ряд преобразований.

Разделив уравнение (2) на уравнение (3) $\frac{K_m}{K_m} = \frac{s \cdot b}{a(s_0 - s)}$, находим значение $b = \frac{K_m \cdot a(s_0 - s)}{K_m \cdot s}$; подставим значение b в уравнение (2), в результате чего получим: $K_m = \frac{s[e-a-\frac{K_m \cdot a(s_0 - s)}{s}]}{a}$. Далее освобождаемся от знаменателя и находим значение a :

$$K_m a = e \cdot s - a \cdot s - \frac{K_m}{K_m} \cdot a(s_0 - s);$$

$$K_m \cdot a + a \cdot s + \frac{K_m}{K_m} \cdot a(s_0 - s) = s \cdot e;$$

$$a[K_m + s + \frac{K_m}{K_m}(s_0 - s)] = s \cdot e;$$

$$a = \frac{s \cdot e}{K_m + s + \frac{K_m}{K_m}(s_0 - s)} = \frac{e \cdot s}{K_m + s + \frac{K_m}{K_m} \cdot s_0 - \frac{K_m}{K_m} \cdot s} =$$

$$= \frac{e \cdot s}{K_m + \frac{K_m}{K_m} \cdot s_0 + s - \frac{K_m}{K_m} \cdot s} = \frac{e \cdot s}{K_m(1 + \frac{s_0}{K_m}) + s(1 - \frac{K_m}{K_m})}.$$

Полученное значение a подставляем в уравнение (1), в результате имеем: $V = \frac{K \cdot e \cdot s}{K_m(1 + \frac{s_0}{K_m}) + s(1 - \frac{K_m}{K_m})}$, но $K \cdot e = V$, где V — максимальная скорость процесса.

Следовательно $V = \frac{V \cdot s}{K_m(1 + \frac{s_0}{K_m}) + s(1 - \frac{K_m}{K_m})}$; K_m , K_m и s_0 для данного процесса есть величины постоянные, поэтому $K_m(1 + \frac{s_0}{K_m})$ можно обозначить одной буквой d , а

$1 - \frac{K_m}{K_m}$ обозначить буквой z . Тогда $V = \frac{V \cdot s}{d + s \cdot z}$.

Разделим теперь числитель и знаменатель дроби на z . Получим уравнение $V = \frac{\frac{V}{z} \cdot s}{\frac{d}{z} + s}$, которое представляет собой уравнение Михаэлиса-Ментена, где $\frac{V}{z} = V'$ — кажущаяся максимальная скорость, постоянная для данного процесса, а $\frac{d}{z} = K'_m$ — кажущаяся константа Михаэлиса, зависящая только от начальной

концентрации субстрата, то есть величина постоянная для данного изучаемого процесса.

Таким образом, скорость распада полисахаридно-ферментного комплекса подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментена $V = \frac{V' \cdot S}{K_m + S}$, однако, при наличии торможения этого процесса продуктами распада константа Михаэлиса K_m и максимальная скорость процесса V не истинные, а кажущиеся, а именно: $K'_m = \frac{\alpha}{z}$ или $K'_m = \frac{K_m (1 + \frac{S_0}{K_m})}{1 - \frac{K_m}{K_m}}$, а $V' = \frac{V}{z}$ или $V' = \frac{V}{1 - \frac{K_m}{K_m}}$.

Следовательно, для характеристики изучаемого процесса при наличии торможения бета-амилолиза образующейся при распаде полисахарида мальтозой можно использовать ранее приведенное уравнение, в основе которого лежит уравнение Михаэлиса-Ментена.

Убедившись в этом, мы продолжили анализ полученного нами уравнения $K_m (1 + \frac{S_0}{K_m}) \ln \frac{S_0}{S_0 - y} + (1 - \frac{K_m}{K_m}) y = V \cdot t$. При этом мы исходили из того, что $\frac{y}{S_0} = \frac{x}{x_0} = x'$, где y — число связей, расщепляющихся бета-амилазой в момент времени t , S_0 — число связей, способных расщепляться этим ферментом в начале реакции, x — процент расщепляемости полисахарида в момент времени t , x_0 — предел расщепляемости полисахарида в процентах, а следовательно x' — отношение числа образовавшихся молекул мальтозы к моменту времени t от начала реакции к числу молекул мальтозы, имеющихся в инкубационной смеси к концу реакции.

Разделив все члены уравнения на $K_m (1 + \frac{S_0}{K_m})$ получаем: $\ln \frac{S_0}{S_0 - y} + \frac{1 - \frac{K_m}{K_m}}{K_m (1 + \frac{S_0}{K_m})} y = \frac{V}{K_m (1 + \frac{S_0}{K_m})} \cdot t$, где $\frac{1 - \frac{K_m}{K_m}}{K_m (1 + \frac{S_0}{K_m})}$ и $\frac{V}{K_m (1 + \frac{S_0}{K_m})}$ есть величины постоянные, которые обозначим соответственно p и q . Тогда уравнение примет следующий вид: $\ln \frac{S_0}{S_0 - y} + py = qt$. Подставим теперь

в него значение $y = s_0 \frac{x}{x_0}$, в результате чего получаем:

$$\ln \frac{s_0}{s_0 - s_0 \frac{x}{x_0}} + p \cdot s_0 \cdot \frac{x}{x_0} = q \cdot t \text{ или } \ln \frac{x_0}{x_0 - x} + p \cdot s_0 \frac{x}{x_0} = q \cdot t.$$

Но $\frac{x}{x_0} = x'$, а $p \cdot s_0$ есть величина постоянная, обозначим ее a' , q так же величина постоянная, назовем ее b' . Тогда наше уравнение будет таким: $\ln \frac{x_0}{x_0 - x} + a' \cdot x' = b' \cdot t$.

Разделив каждый член равенства на x' , получим уравнение:

$$\frac{\ln \frac{x_0}{x_0 - x}}{x'} + a' = b' \frac{t}{x'}.$$

Из изложенного вытекает, что в этом уравнении постоянные a' и b' отличаются от постоянных a и b в ранее приводимом уравнении $\ln \frac{x_0}{x_0 - x} = a + b \frac{t}{x}$, и если между a и b с одной стороны, и природой, а также концентрацией полисахаридов, с другой, не удастся обнаружить четкой взаимосвязи, то введение a' и b' в уравнение, характеризующее бета-амилолиз, позволяет выявить некоторые закономерности.

В таблице № 5 приводятся численные значения постоянных величин a' и b' для различных полисахаридов, сильно отличающихся по своей структуре, о чем свидетельствуют приведенные в этой же таблице данные о длине их наружных и внутренних цепей, полученные в специально проведенных экспериментах, которые будут представлены в последующих главах настоящей работы.

Из большого количества исследованных препаратов интересующих нас полисахаридов мы изучили в данном случае те гликогены, которые отличаются по соотношению величин, характеризующих длину наружных и внутренних ветвей их молекул, в связи с чем нами были проанализированы аномальный по строению гликоген, выделенный из печени кролика с карциномой Броуна-Пирс, часто встречающийся гликоген печени ракового животного, препарат гликогена печени здорового кролика и крахмал.

Таблица № 5

Зависимость величин α' и β' от концентрации
и природы полисахаридов

Название полисахарида	:Концентрация: :полисахарида: : в %	α'	β'	:Длина: :наруж: :ных: :цепей:	:Длина: :внут- :ренних: :цепей:	:Отнош. :длины :нар.и :длине :внут.
Крахмал	0,1	1,070	0,05230	Большая	Мал.	Большая
	0,5	0,840	0,05520			
Гликоген печени здорового кролика	0,1	0,952	0,01370	8,7	7,5	1,15
	0,5	0,875	0,01430			
Гликоген печени ракового кролика	0,1	0,973	0,00370	6,0	8,4	0,71
	0,5	0,862	0,00390			
Гликоген печени ракового кролика	0,1	0,957	0,00265	13,9	24,8	0,56
	0,5	0,835	0,00230			

Из приведенных данных со всей очевидностью вытекает, что для различных полисахаридов, сильно отличающихся своей структурой, величина α' практически остается постоянной при одной и той же концентрации субстрата в инкубационной смеси. Как видно из таблицы, при бета-амилолизе 0,1% растворов различных полисахаридов величины α' равны 1,070, 0,952, 0,973, 0,953, что в среднем составляет 0,978, а при бета-амилолизе 0,5% растворов тех же полисахаридов эти величины равны соответственно 0,840, 0,875, 0,862, 0,835 или в среднем 0,853; следовательно, величина α' не зависит от природы полисахарида, расщепляющегося в

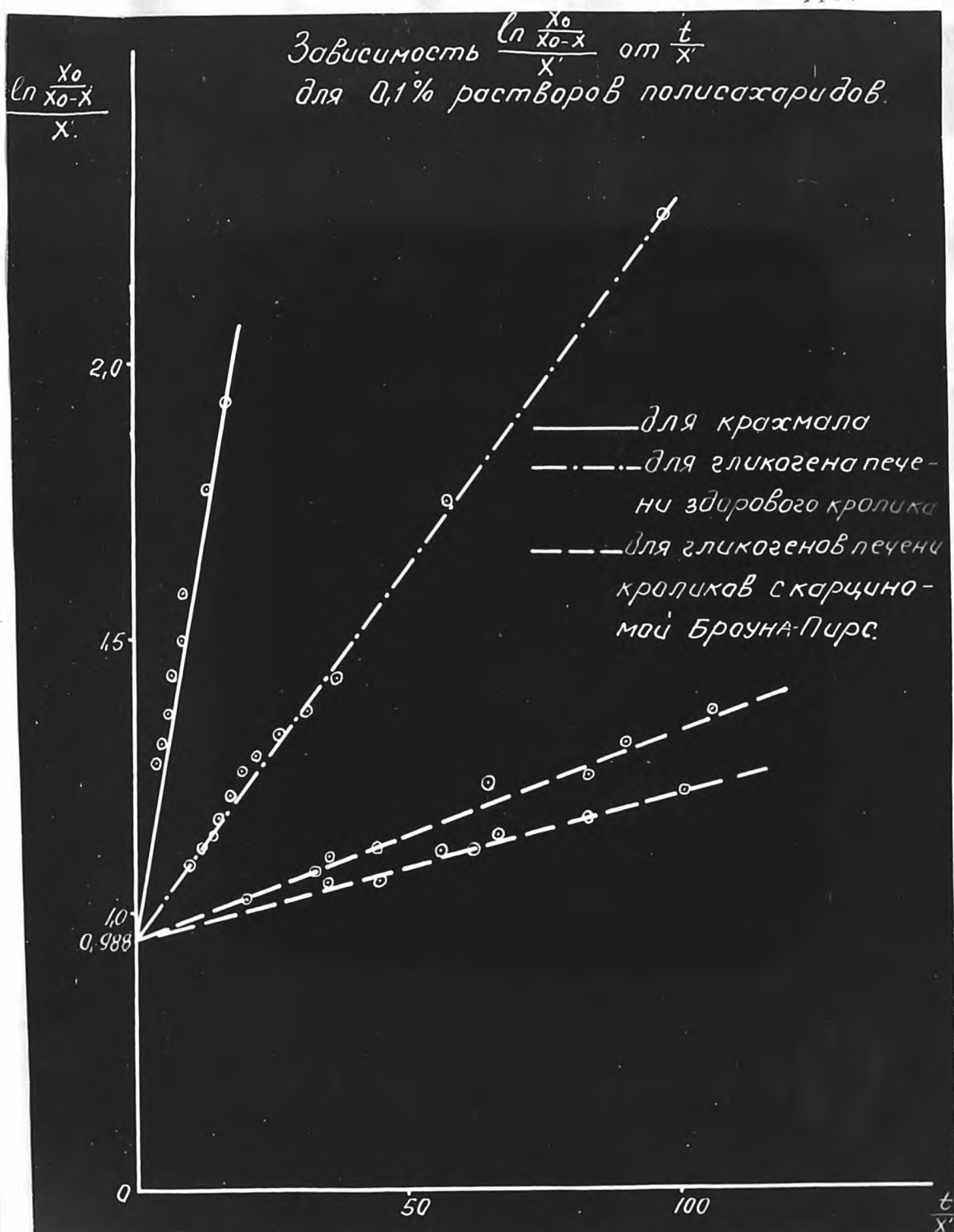


Рис. 2. Графическое изображение процесса бета-амилолиза с помощью кинетического уравнения

$$\frac{\ln \frac{x_0}{x_0-x}}{x'} = a' + b' \frac{t}{x'}$$

когда в качестве субстратов

действия фермента служили гликогены печени здоровых кроликов, пораженных карциномой Броуна-Пирса, и крахмал, взятые в инкубационные смеси в виде 0,1% растворов.

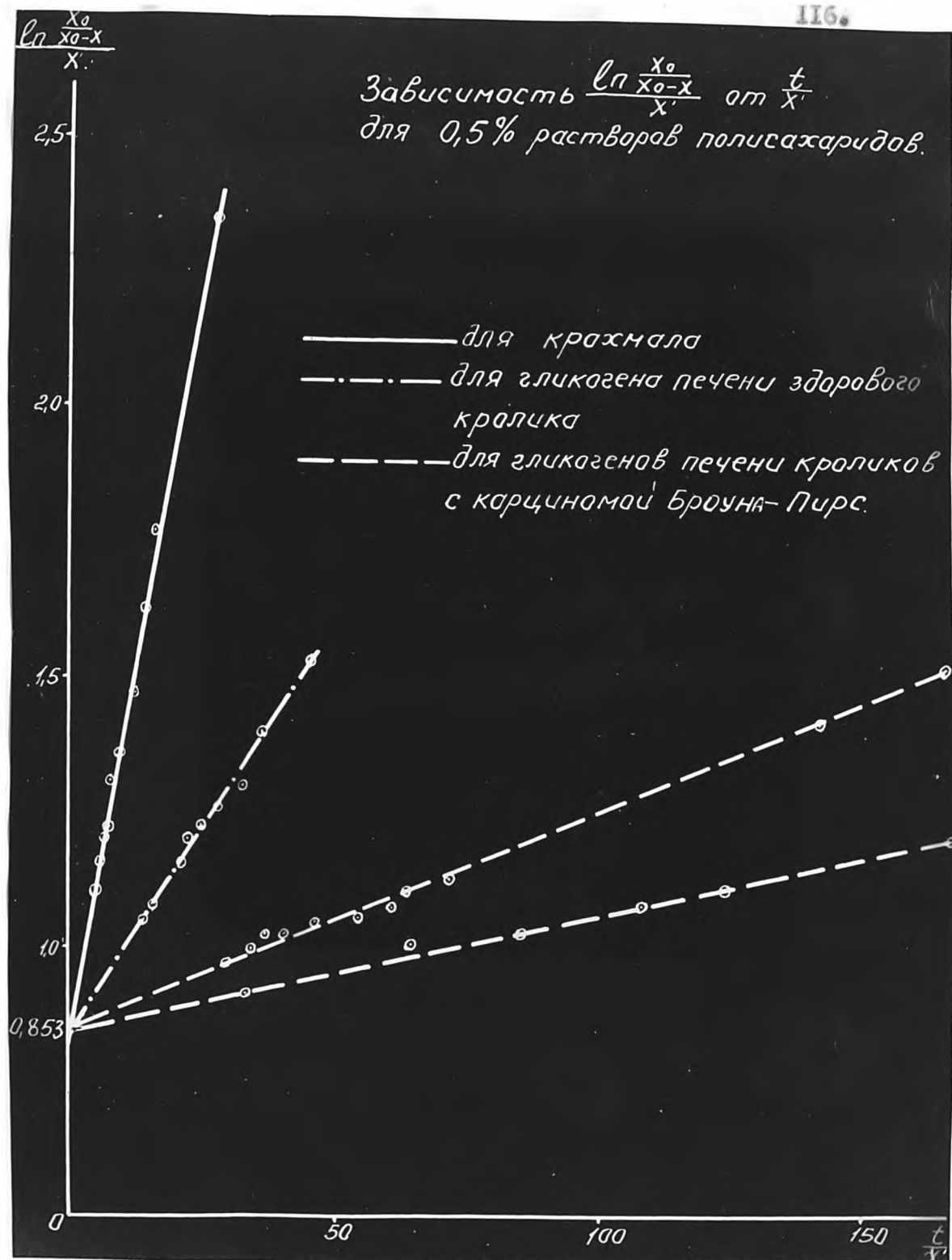


Рис. 3. Графическое изображение процесса бета-амилолиза с помощью кинетического уравнения

$$\ln \frac{x_0}{x_0-x} = a' + b' \frac{t}{x'}$$

когда в качестве субстратов действия фермента служили гликогены печени здоровых кроликов, пораженных карциномой Броуна-Пирса, и крахмал, взятые в инкубационные смеси в виде 0,5% растворов.

процессе бета-амилолиза. Она лишь незначительно меняется в зависимости от изменения концентрации субстрата действия бета-амилазы в инкубационной смеси.

Сказанное наглядно иллюстрируется на рисунках № 2 и № 3, где все прямые при том или ином постоянном значении s , пересекаются в одной точке, лежащей на оси ординат. Следовательно, надо полагать, что константы диссоциации полисахарид-бета-амилазных комплексов для всех изученных полисахаридов одинаковы.

Из данных, представленных в таблице № 5, следует, далее, что постоянные v' , которые характеризуют максимальные скорости процесса бета-амилолиза, для различных полисахаридов различны. Вместе с тем они приблизительно одинаковы для одного и того же полисахарида, взятого в инкубационную смесь в различных концентрациях. Так при бета-амилолизе крахмала величина v' в случае использования 0,1% раствора равна 0,05230, а при наличии в инкубационной смеси 0,5% раствора она равна соответственно 0,05520. При бета-амилолизе гликогена, выделенного из печени здорового кролика, величины v' для растворов, взятых в вышеуказанных концентрациях, соответственно равняются 0,01370 и 0,01430; при бета-амилолизе гликогенов печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс величины v' характеризуются еще меньшими цифрами, а именно 0,00370 в случае использования в качестве субстрата действия фермента 0,1% раствора гликогена и 0,00390 при наличии в инкубационной смеси 0,5% раствора этого полисахарида в одном случае, и 0,00265 и 0,00230 соответственно в другом.

Сопоставление этих данных свидетельствует о том, что величины v' , практически не изменяясь в зависимости от концентрации полисахарида в инкубационной смеси, сильно отличаются по

своему значению при использовании в качестве субстрата действия бета-амилазы полисахаридов, отличающихся по своей структуре. Примером может служить тот факт, что величина δ' для крахмала более, чем в 20 раз превышает эту величину, найденную для одного из гликогенов, выделенных из печени раковых животных. Это обстоятельство несомненно свидетельствует о том, что постоянная δ' как-то связана со структурой полисахаридов, расщепляемых бета-амилазой при изучаемом нами ферментативном процессе. И действительно при сопоставлении величин, характеризующих отношение длины наружных и внутренних цепей в том или ином полисахариде, с постоянными δ' , найденными для соответствующих полисахаридов, обнаруживается определенный параллелизм, а именно, чем меньше вышеупомянутое отношение, тем меньше величина δ' .

Следовательно, скорость реакции бета-амилолиза находится в прямой зависимости от соотношения длин наружных и внутренних цепей в полисахаридах, поэтому константа скорости этой реакции будет неодинаковой при наличии в инкубационной смеси различных полисахаридов, являющихся субстратами действия фермента в этой реакции. Понятно, что скорость процесса бета-амилолиза определяется не только длиной наружных цепей полисахарида, на которые непосредственно действует фермент, но имеет значение, как фактор, определяющий скорость этого процесса, и длина внутренних цепей сложной молекулы полисахарида. Это, вероятно, связано с тем, что бета-амилаза, присоединяясь к внутренним цепям молекулы полисахарида, не обладая способностью расщеплять их, тем не менее инактивируется, будучи в связанном состоянии. При этом, чем больше внутренние цепи, тем больше должна быть выражена инактивация фермента, что и приводит к уменьшению величины δ' в наших опытах. При исследовании полисахаридов с одинаковыми

внутренними цепями должна существовать прямая зависимость между длиной наружных цепей и скоростью процесса бета-амилолиза — чем короче наружные цепи, тем меньше будет скорость ферментативной реакции, вследствие чего, как показали наши исследования, гликогены, выделенные из печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс, характеризуются меньшей степенью бета-амилолиза, чем гликогены, полученные из печени здоровых животных того же вида.

Это положение, вытекающее из анализа кинетики процесса бета-амилолиза интересующих нас полисахаридов, было затем проверено нами в дополнительно проведенных исследованиях на большем материале, когда изучению было подвергнуто 30 препаратов гликогенов печени кроликов, пораженных карциномой Броуна-Пирс, и 27 препаратов гликогенов печени здоровых кроликов, исследуемых параллельно в качестве контрольных.

В этих опытах была использована вышеописанная методика изучения процесса бета-амилолиза, однако, сроки взятия проб из инкубационных смесей были несколько изменены. Пробы для определения редукции смесей в этой серии опытов брались через каждые полчаса в течение четырех часов опыта, а затем через 24 часа действия бета-амилазы. Инкубация смесей проводилась при температуре 37°C .

Результаты проведенных исследований выявили ранее обнаруженную закономерность, поскольку при обработке их вышеописанным методом с применением выведенного кинетического уравнения во всех случаях получались прямые линии. Однако, данные, характеризующие динамику бета-амилолиза изучаемых нами полисахаридов, не всегда давали возможность сразу с полной определенностью решить вопрос о различии в проценте расщепляемости

препаратов гликогенов, выделенных из печени здоровых кроликов и пораженных злокачественным новообразованием, так как в ряде случаев полученные величины были близки друг к другу, или указывали лишь на тенденцию к снижению процента расщепляемости гликогенов печени раковых животных по сравнению со здоровыми, что можно видеть в таблице № 6.

Таблица № 6

Динамика бета-амилолиза гликогенов, полученных из печени здоровых кроликов и с карциномой Броуна-Пирс

Время инку- бации в часах:		0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	24,0
% расщепляемости гликогенов печени	кроликов с карциномой Броуна-Пирс	28,2	32,9	33,3	38,2	40,2	42,2	42,5	43,8	44,5
		27,2	33,2	34,4	35,3	37,3	37,6	38,1	39,0	43,1
		19,4	27,5	29,0	29,7	31,1	32,0	32,8	33,5	36,0
		29,4	30,8	31,4	32,0	32,6	33,4	34,0	34,8	35,2
		16,6	18,6	19,2	19,9	21,2	21,8	22,4	23,0	30,2
		20,0	24,3	25,0	25,7	26,4	27,1	27,5	27,8	29,3
		28,7	31,0	31,8	32,7	33,6	34,4	35,2	35,9	36,4
		19,1	23,1	24,0	25,1	25,8	26,2	26,6	29,1	31,7
		20,2	28,5	31,0	32,4	33,3	35,4	36,4	37,3	38,2
		21,3	30,1	31,8	32,2	33,4	33,6	33,9	36,2	38,6
		19,1	27,4	28,8	29,9	30,6	30,9	31,4	33,8	36,3
		29,8	35,7	37,4	37,8	38,1	38,6	39,0	39,4	41,0
	здоровых кроликов	26,8	32,4	35,8	37,3	38,6	39,6	39,7	40,4	45,9
		19,1	24,7	30,3	31,6	32,5	33,0	33,7	34,1	40,9
		22,6	27,0	30,9	32,5	35,6	37,3	37,4	37,9	41,0
		22,5	28,3	31,8	34,0	35,3	36,2	36,6	37,0	44,0
		19,8	27,6	34,0	37,6	38,8	40,0	40,5	41,0	46,5
		23,2	30,4	31,2	32,3	32,5	33,5	34,2	38,0	41,9
		30,8	32,2	34,2	35,0	36,0	36,7	37,4	40,3	44,4
		27,4	33,0	36,0	36,8	37,4	38,0	38,2	41,1	44,0
		21,5	28,3	30,7	32,4	33,0	34,0	34,7	38,1	41,5
		20,0	29,6	31,6	32,8	34,2	35,4	35,7	39,4	42,8
		23,4	25,8	27,4	28,3	29,6	30,4	31,0	32,0	39,9
		29,1	31,4	32,1	32,8	33,2	33,6	34,3	37,2	40,1

Поэтому для решения вопроса о наличии или отсутствии структурных особенностей в молекулах изучаемых полисахаридов, следствием чего может явиться различная степень бета-амилолиза их, полученные данные были подвергнуты математической обработке. Прежде всего мы решили выяснить имеются ли достоверные различия в степени бета-амилолиза гликогенов, выделенных из печени здоровых и раковых кроликов, в начальный период нашего исследования и в конце его. Для этого мы нашли среднюю арифметическую (\bar{M}), среднее квадратическое отклонение (σ), среднюю ошибку (m) и критерий достоверности (t) для всех наших данных, полученных при исследовании бета-амилолиза через 30 минут и через 24 часа инкубации при наличии в инкубационных смесях в одном случае гликогенов, выделенных из печени здоровых животных, в другом — из печени кроликов, больных раком. По критерию достоверности мы определили далее вероятность различия изучаемого признака (P).

Результаты статистической обработки этих данных сведены в таблицу № 7.

Из приведенных данных видно, что при 0,5-часовой инкубации $p < 0,01$, а при 24-часовой инкубации $p < 0,02$, что указывает на достоверные различия в изучаемых показателях. Следовательно, полученные данные позволяют сделать заключение, что как в начале бета-амилолиза, так и в конце этого процесса степень расщепления гликогенов печени здоровых и больных раком кроликов неодинакова.

Далее интересно было выяснить имеются ли эти различия на протяжении всего процесса бета-амилолиза, каковы они и как они

Таблица № 7

Сравнительные данные статистических индексов, характеризующих процесс бета-амилолиза гликогенов печени здоровых кроликов и с карциномой Броуна-Пирс (через 0,5 и 24 часа инкубации)

Время инкубации: в часах	Препараты : гликогенов: печени кроликов	Статистические индексы				
		M	$\pm \sigma$	$\pm m$	t	p
0,5	здоровых	24,9	4,266	1,01	2,66	<0,01
	раковых	21,1	3,661	1,01		
24	здоровых	40,8	4,099	0,95	2,46	<0,02
	раковых	36,1	6,403	1,67		

выявляются в различные сроки воздействия бета-амилазы на интересующие нас субстраты. Для ответа на поставленные вопросы при изучении динамики процесса бета-амилолиза и для лучшего выявления возможных отличий при действии бета-амилазы на гликогены, выделенные из печени здоровых и больных раком животных, мы использовали еще один метод вариационно-статистического анализа, который наглядно иллюстрирует распределение изучаемых признаков.

Весь имеющийся материал, полученный при изучении бета-амилолиза гликогенов как здоровых, так и раковых животных, мы разбивали на классы, количество которых определяли из расчета

$I + 3,3 \lg n$, где n — число последований, проведенных в каждой изучаемой группе. Затем вычисляли величину классового промехутка, равную размаху значений от минимума до максимума, деленному на принятое число классов по формуле

$$K = \frac{\max. - \min.}{1 + 3,3 \lg n}$$
, где K — величина класса, $\max.$ — максимальное значение, $\min.$ — минимальное значение, n — число проведенных опытов. Далее определяли вариацию w — середину класса, f — частоту класса, f_n — накопленную частоту вариационного ряда, после чего вычерчивали кумулянты, представляющие собой графическое изображение распределения в виде кривых, на оси ординат которых откладывались точки, соответствующие накопленным частотам вариационного ряда, а на оси абсцисс значения вариаций.

Таким способом были обработаны результаты опытов, полученные при определении процента расщепляемости гликогенов печени здоровых и раковых кроликов при воздействии на них бета-амилазой в течение 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 и 24 часов инкубации. Число классов, найденное по вышеприведенной формуле, во всех случаях равнялось шести. Вычисленные величины K , w и f_n представлены в таблице № 8

Результаты вариационно-статистического анализа данных, характеризующих бета-амилолиз гликогенов печени здоровых кроликов и с карциномой Бруна-Лирс

Время инкубации в часах	:Препараты : :гликогенов : :печени : :кроликов :	:К :	:Вариация : :накоплен- : :ная часто- : :та :	к л а с с ы					
				I	2	3	4	5	6
0,5	здоровых	2,4	W	19,6	22,0	24,4	26,8	29,3	31,6
			fn	3	7	12	20	25	27
	раковых	3,2	W	16,8	20,0	23,2	26,4	29,6	32,8
			fn	3	14	18	22	26	29
1,0	здоровых	1,7	W	25,5	27,2	28,9	30,6	32,3	34,0
			fn	3	8	12	16	20	23
	раковых	3,0	W	20,0	23,0	26,0	29,0	32,0	35,0
			fn	1	6	12	16	22	23
2,0	здоровых	1,8	W	28,6	30,5	32,3	34,1	35,9	37,8
			fn	6	9	16	19	23	27
	раковых	3,2	W	21,5	24,7	27,8	31,1	34,3	37,1
			fn	1	6	13	22	26	28
3,0	здоровых	1,9	W	30,0	31,9	34,8	35,7	37,6	39,5
			fn	4	6	12	15	19	23
	раковых	3,4	W	23,4	26,8	30,4	33,6	37,0	40,2
			fn	1	5	8	15	18	22
4,0	здоровых	1,9	W	31,2	33,2	35,2	37,2	39,2	41,2
			fn	1	8	11	14	15	20
	раковых	3,6	W	24,7	28,3	31,9	35,5	39,2	42,8
			fn	2	7	13	16	19	23
24,0	здоровых	1,7	W	37,8	39,4	41,1	42,8	44,5	46,3
			fn	1	5	13	18	21	27
	раковых	3,0	W	29,9	32,9	35,9	38,9	41,9	44,9
			fn	3	9	18	21	26	29

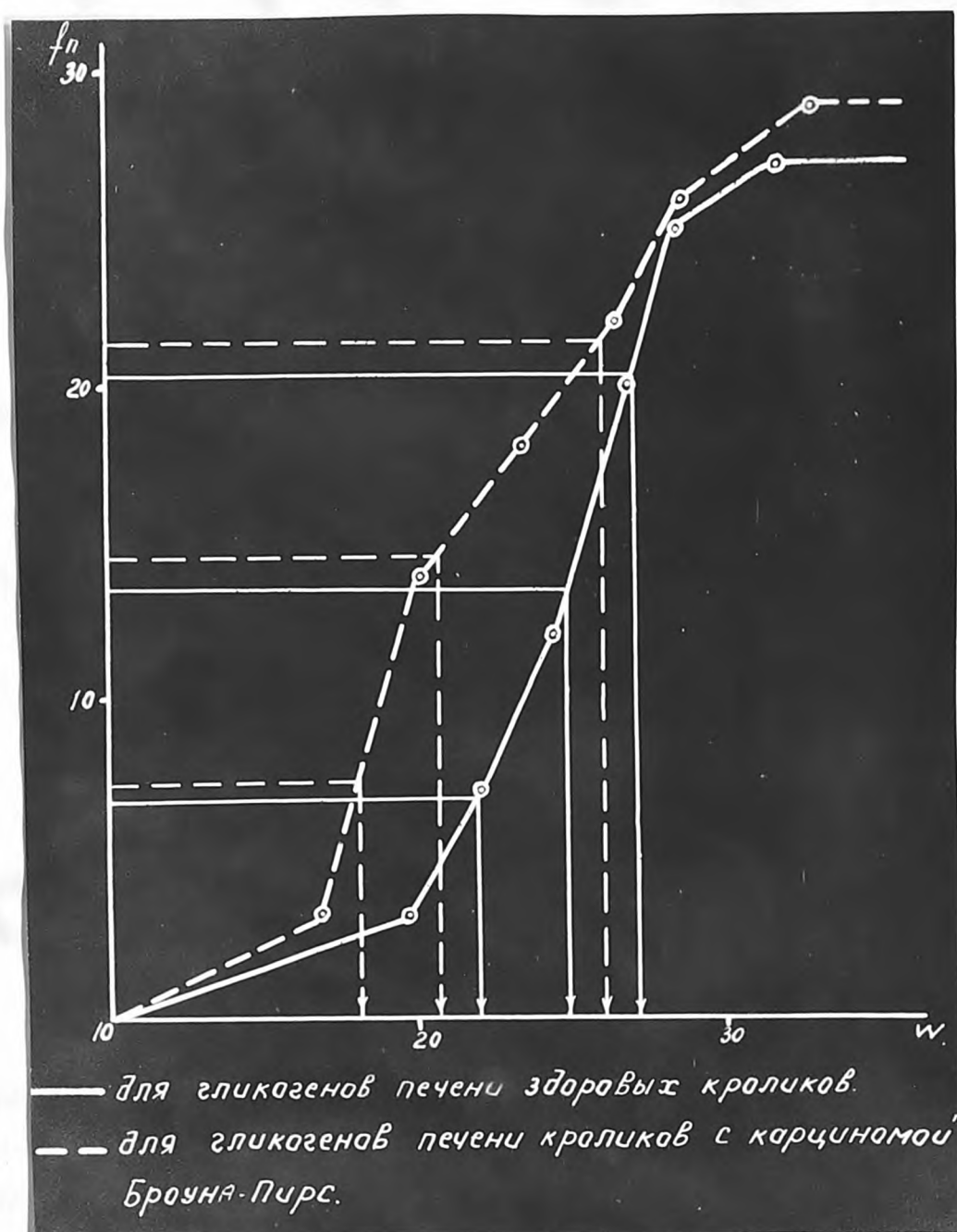


Рис. 4. Кумуляты величин, показывающих процент расщепляемости гликогенов печени здоровых кроликов и с карциномой Броуна-Пирс под влиянием бета-амилазы, действовавшей на них при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ и $\text{pH} = 4.8$ в течение 30-ти минут.

Из приведенных данных видно, что величины K , найденные для всех сроков исследования бета-амилолиза, неодинаковы в случае инкубации гликогенов печени здоровых или раковых животных. При наличии в качестве субстрата гликогенов, выделенных из печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс, эти величины во всех случаях выше, чем при наличии в инкубационной смеси гликогенов, полученных из печени здоровых кроликов. Это указывает на то, что при исследовании гликогенов раковых животных имеют место более выраженные колебания в показателях, характеризующих процент расщепляемости гликогенов бета-амилазой, чем при изучении бета-амилолиза в присутствии гликогенов печени здоровых кроликов.

Вычерченные кумуляты, представленные на рис. 4-9, с очевидностью показывают, что расщепление гликогенов печени животных опытной и контрольной группы под влиянием бета-амилазы протекает неодинаково, о чем свидетельствует тот факт, что во все сроки исследования кривые не совмещаются одна с другой. При анализе полученных кривых выявляется определенная закономерность, которая выражается в том, что кумуляты, характеризующие бета-амилолиз гликогенов печени раковых кроликов, во все сроки инкубации смещены влево по отношению к соответствующим кривым, отражающим бета-амилолиз гликогенов печени здоровых кроликов. Отсюда вытекает, что степень расщепляемости препаратов гликогенов печени кроликов, пораженных карциномой Броуна-Пирс, характеризуется более низкими цифрами, чем степень бета-амилолиза гликогенов печени контрольных животных.

Это положение подтверждается и при более глубоком анализе полученных кривых, произведенном с использованием квантилей. Квантиль — это такое значение признака, которое отсекает в

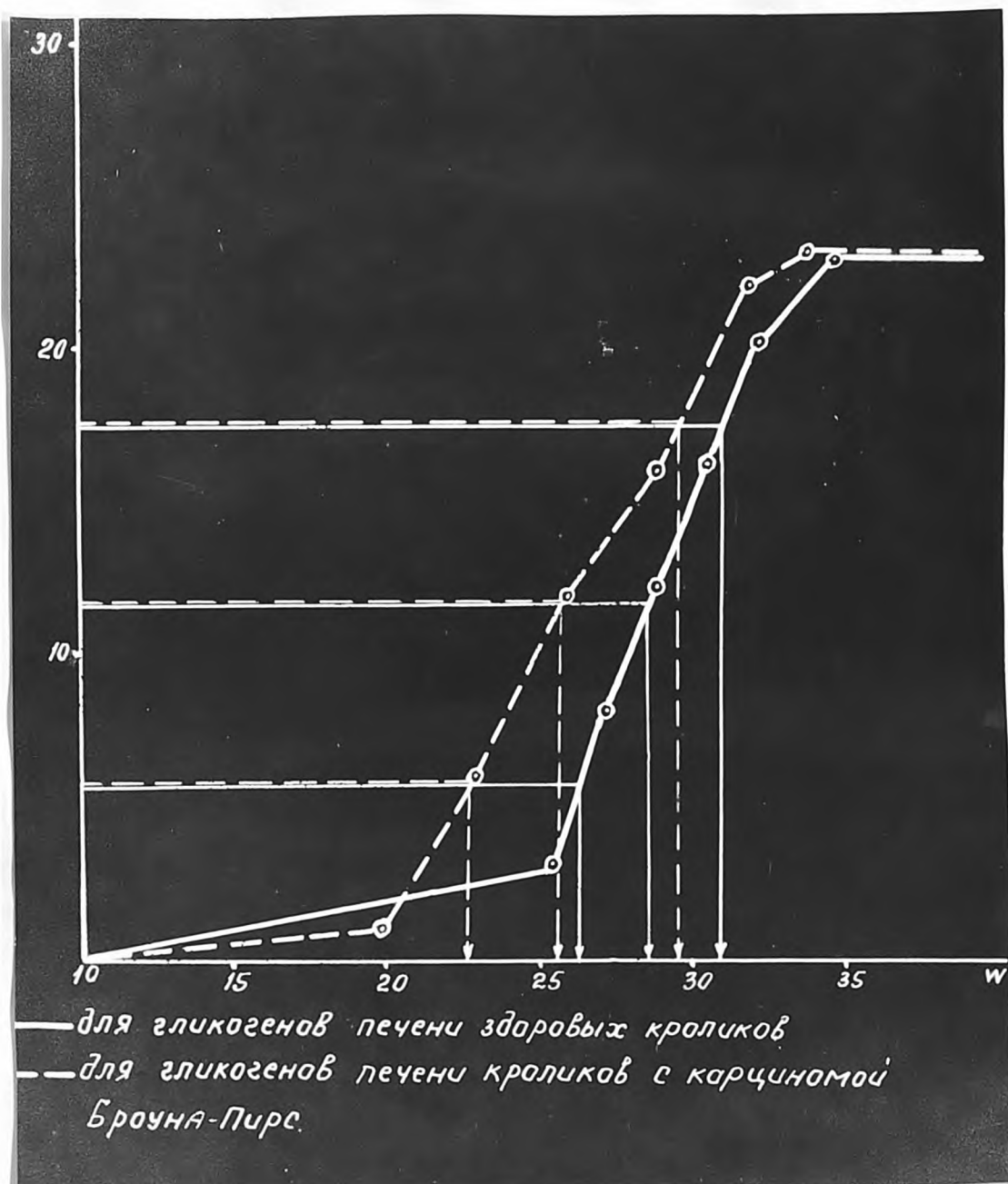


Рис.5 . Кумуляты величин, показывающих процент расщепляемости гликогенов печени здоровых кроликов и с карциномой Броуна-Пирса под влиянием бета - амилазы, действовавшей на них при температуре $+ 37^{\circ}\text{C}$ и $\text{PH} = 4,8$ в течение I-го часа.

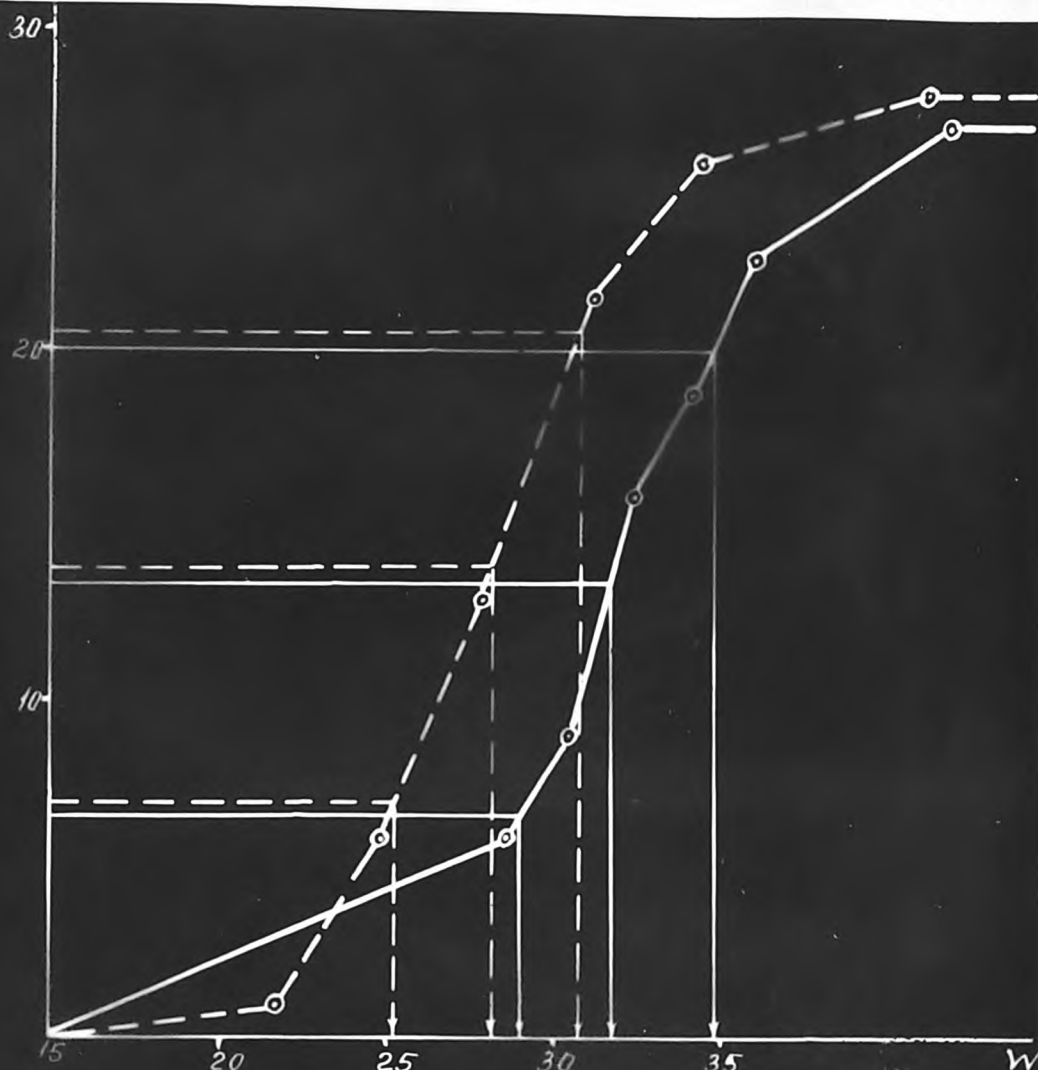
распределении определенную часть значений признаков больше себя и определенную часть значений признаков меньше себя. Таким показателем разнообразия признаков является, в частности, медиана, характеризующаяся тем значением признака, которое разделяет всю исследуемую группу на две равные части: одна часть имеет значение признака меньшее, чем медиана, а другая половина — большее. Медиана обладает свойствами средних величин изучаемого признака. Поэтому, сравнивая цифры, характеризующие медиану двух исследуемых групп признаков, мы можем судить о различии или совпадении их. Для того, чтобы найти медиану, надо на оси ординат найти точку, соответствующую 50% числа всех исследуемых признаков. Из этой точки далее необходимо провести горизонтальную прямую до пересечения с кумулятой и из точки пересечения опустить перпендикуляр на ось ординат. Точка пересечения перпендикуляра с осью ординат покажет значение медианы.

Нами были найдены значения медиан для всех кумулят, характеризующих различные сроки процесса бета-амилолиза гликогенов печени здоровых кроликов и пораженных карциномой Броуна-Пирс. Полученные результаты представлены в таблице № 9.

Таблица № 9

Данные, характеризующие медианы, соответствующие степени бета-амилолиза гликогенов печени здоровых кроликов и с карциномой Броуна-Пирс

Препараты гликогенов печени кроликов	Время инкубации в часах					
	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0	24,0
здоровых	24,8	28,6	31,7	34,7	34,6	41,2
раковых	20,6	25,8	28,1	31,8	31,9	34,6



— для гликогенов печени здоровых кроликов.

- - - для гликогенов печени кроликов с карциномой Бруна-Пирс.

Рис. 6. Кумуляты величин, показывающих процент расщепляемости гликогенов печени здоровых кроликов и с карциномой Бруна-Пирс под влиянием бета-амилазы, действовавшей на них при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ и $\text{pH} = 4,8$ в течение 2-х часов.

Приведенные данные убедительно говорят за то, что гликогены, полученные из печени больных раком животных, под действием бета-амилазы расщепляются в меньшей степени, чем гликогены печени здоровых кроликов. При чем это различие в степени расщепляемости изучаемых полисахаридов наблюдается на всем протяжении бета-амилолиза.

Далее интересно было выяснить степень разнообразия значений изучаемого показателя при исследовании бета-амилолиза, когда в качестве субстратов действия фермента использовались гликогены печени здоровых кроликов и пораженных карциномой Броуна-Пирс. Для этого мы воспользовались получением квартилей, которые также как медиана относятся к группе показателей, объединяемых общим названием — квантили. Три квартиля разделяют исследуемую группу на четыре равночисленные части, при этом второй квартиль соответствует медиане, а расстояние между первым и третьим квартилем является одним из показателей степени разнообразия значений изучаемого признака в данной группе. Определение величины квартилей аналогично определению величины медианы. Разница заключается только в том, что наряду с точкой, соответствующей 50% числа всех исследуемых признаков, надо найти точки, соответствующие 25% и 75% числа исследуемых признаков. Отложив эти точки на оси ординат, проведя из них горизонтальные прямые до пересечения с кумулятой и опустив перпендикуляры на ось ординат, определяется значение величины 1-го и 3-го квартилей, после чего по их разности находится показатель степени разнообразия значения изучаемого признака (Н.А.Плохинский, 1961).

Мы нашли эти величины для всех кривых, характеризующих бета-амилолиз как гликогенов печени здоровых кроликов, так и пораженных раком. Полученные нами данные представлены в таблице № 10.

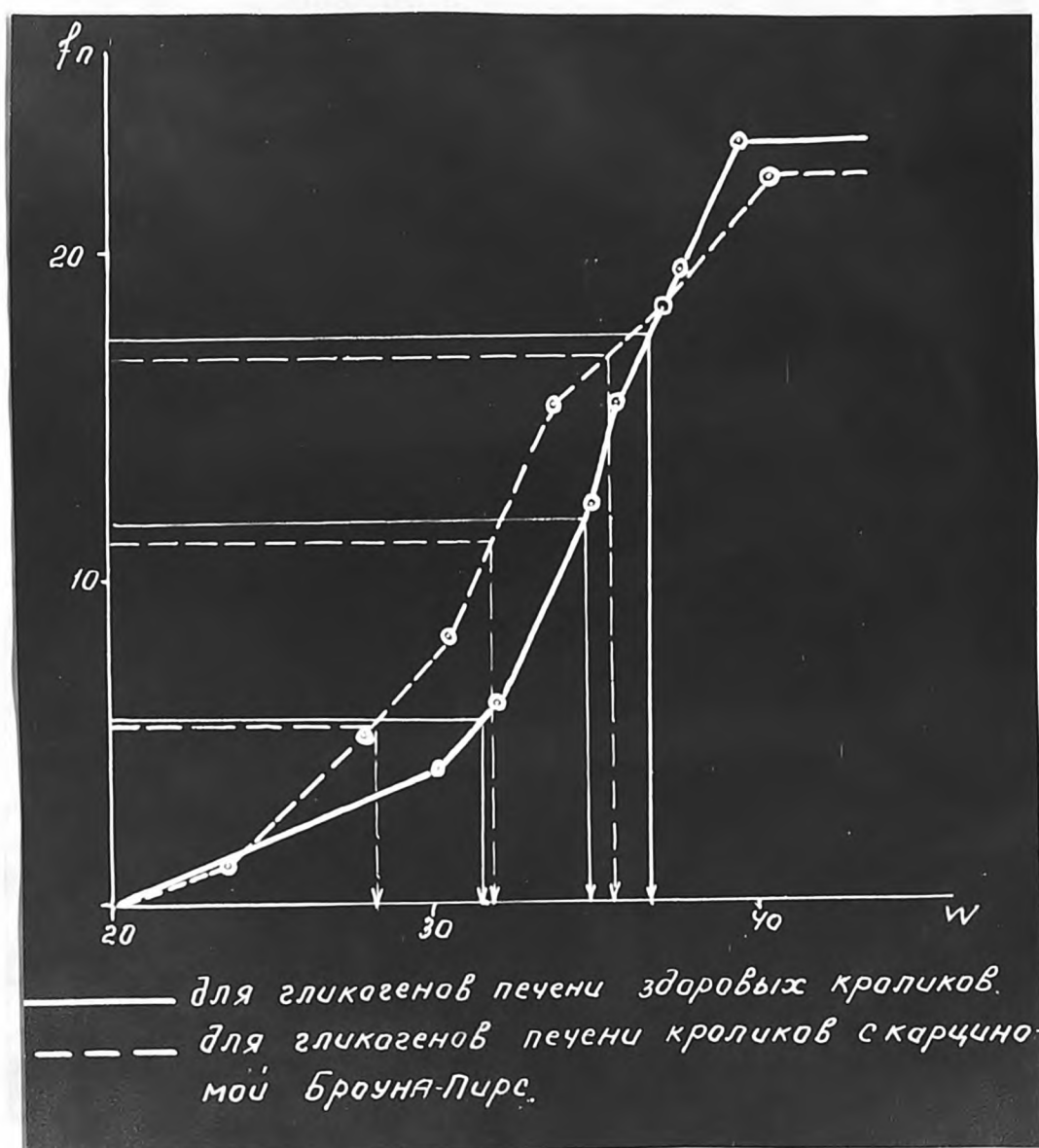


Рис. 7. Кумуляты величин, показывающих процент расщепляемости гликогенов печени здоровых кроликов и с карциномой Броуна - Пирса под влиянием бета - амилазы, действовавшей на них при температуре $+ 37^{\circ}\text{C}$ и $\text{PH} = 4,8$ в течение 3-х часов.

При анализе данных, входящих в I-й и 3-й квартили, мы снова приходим к выводу, что гликогены, выделенные из печени животных, пораженных раком, расщепляются бета-амилазой в меньшей степени, чем гликогены печени здоровых кроликов, что вытекало также из сравнительных данных вариаций, соответствующих медианам обеих исследуемых групп животных.

Таблица № 10

Данные, характеризующие степень разнообразия признаков и квартили, соответствующие величинам степени бета-амилолиза гликогенов печени здоровых кроликов и с карциномой Броуна-Пирс

Квантили	:Препараты :		Время инкубации в часах					
	:гликогенов:							
	:печени	: кроликов	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0	24,0
I-й квартиль	здоровых		21,8	26,4	29,0	31,4	32,4	39,8
	раковых		18,1	22,7	24,2	28,2	29,5	32,0
3-й квартиль	здоровых		27,0	31,0	34,8	36,8	38,2	44,2
	раковых		26,0	29,6	31,0	35,5	37,0	39,2
степень разнооб- разия	здоровых		5,2	4,6	5,8	5,4	5,8	4,4
	раковых		7,9	6,9	6,8	7,3	7,5	7,2

Из приведенных данных следует далее, что величина степени разнообразия значений изучаемого нами показателя во все сроки исследования оказалась большей для серии опытов, где в качестве субстрата бета-амилолиза использовались гликогены, выделенные из печени кроликов с привитой карциномой Броуна-Пирс, по сравнению с этой величиной, полученной в контрольной серии опытов.

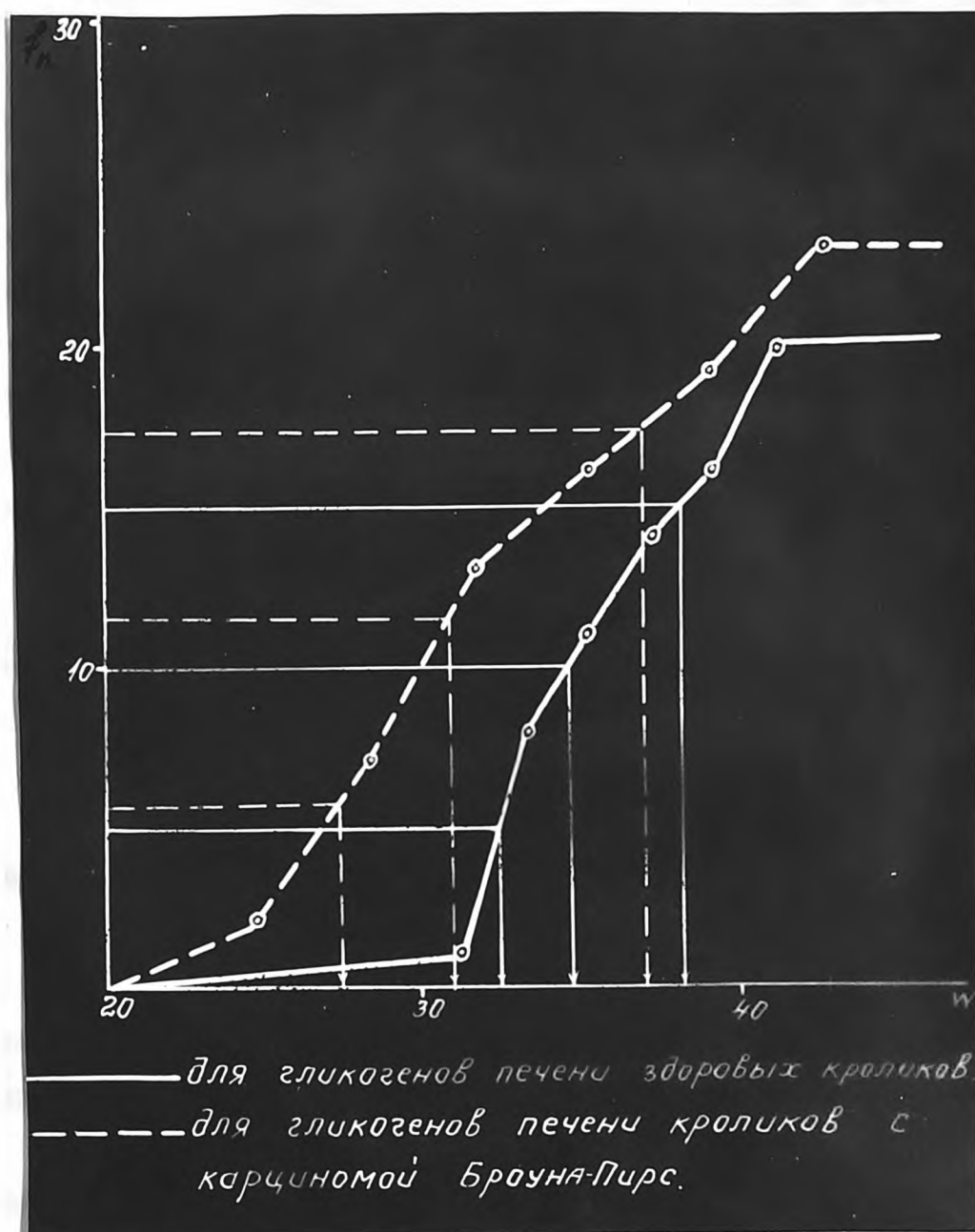


Рис.8. Кумуляты величин, показывающих процент расщепляемости гликогенов печени здоровых кроликов и с карциномой Броуна - Пирс под влиянием бета - амилазы, действовавшей на них при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ и $\text{PH} = 4,8$ в течение 4-х часов.

Если в опытной группе величина степени разнообразия признаков колеблется от 6,8 до 7,9, то для контрольной группы она колеблется от 4,4 до 5,8. В различные сроки исследования эта величина для бета-амилолиза, протекающего с гликогенами из печени раковых животных в качестве субстрата, в 1,2 - 1,6 раз выше, чем в контрольной серии опытов. Причем на различных этапах бета-амилолиза отношение степени разнообразия для опытной группы к этой же величине для контрольной группы опытов мало отличается друг от друга и соответствует в среднем 1,4. Это обстоятельство говорит за то, что различия, найденные в степени бета-амилолиза гликогенов, выделенных из печени здоровых и больных раком животных, обусловлены неодинаковой структурой полисахаридов, которые служили субстратом действия бета-амилазы в той и другой группе опытов.

В пользу этого говорят также данные, полученные нами при изучении влияния инсулина и адреналина на бета-амилолиз препаратов гликогенов печени здоровых кроликов и с карциномой Броуна-Пирс, где наблюдалось неодинаковое влияние одного и того же гормона на интенсивность протекания и характер этого процесса.

Все это говорит о том, что гликогены, синтезируемые в печени больного раком животного, имеют некоторые структурные особенности по сравнению с гликогенами, образующимися в печени здорового организма, на что указывает различная степень бета-амилолиза изученных полисахаридов. Поскольку бета-амилаза может действовать лишь на наружные ветви сложной молекулы полисахарида, отщепляя от них молекулы мальтозы только до мест ветвления, надо полагать, что меньшая степень бета-амилолиза, обнаруженная нами в случае действия бета-амилазы на

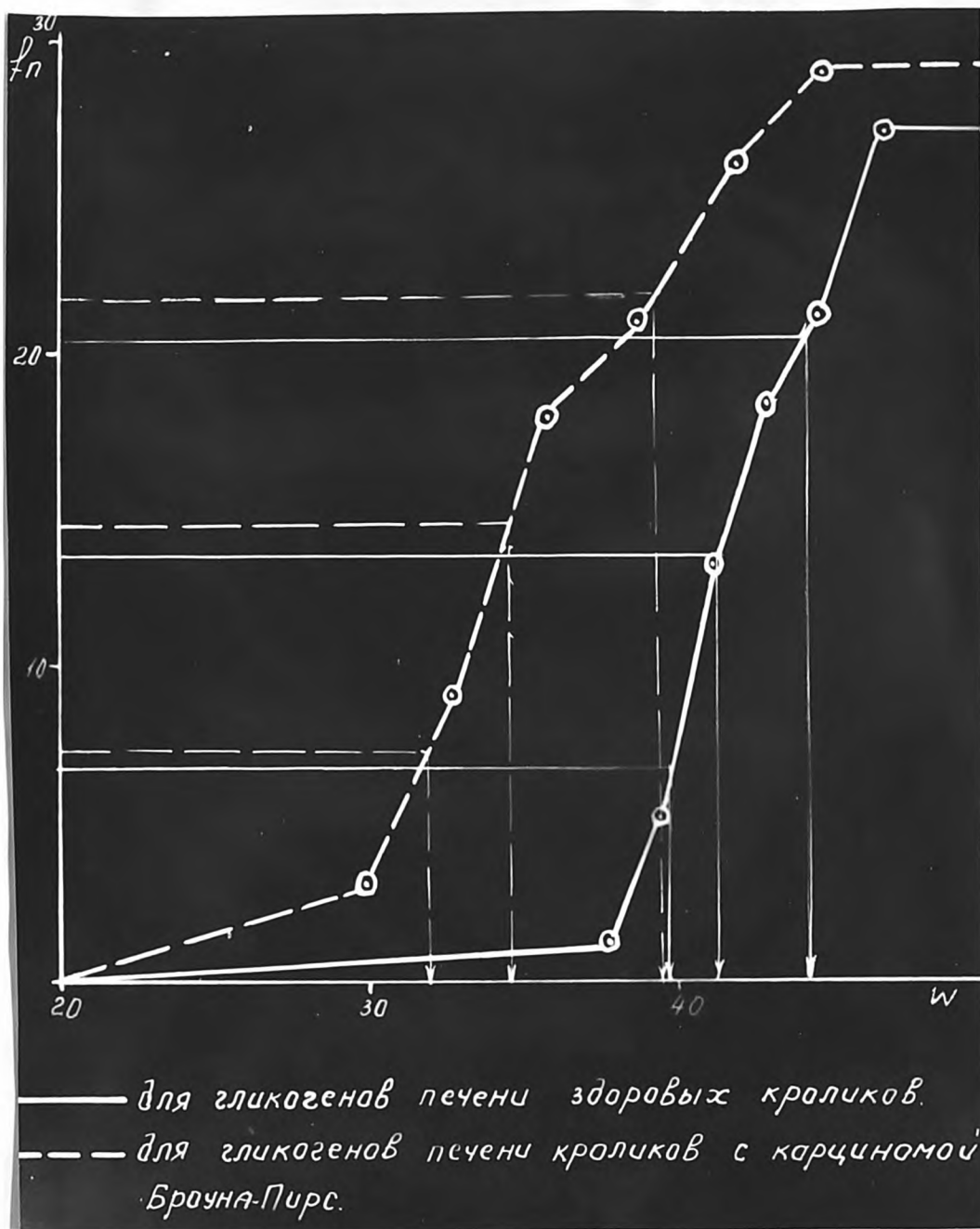


Рис.9. Кумуляты величин, показывающих процент расщепляемости гликогенов печени здоровых кроликов и с карциномой Бруна - Пирс под влиянием бета - амилазы, действовавшей на них при температуре $+ 37^{\circ}\text{C}$ и $\text{PH} = 4,8$ в течение 24-х часов.

гликогены печени раковых животных, указывает на наличие более коротких наружных ветвей в молекулах этих гликогенов по сравнению с наружными ветвями молекул гликогенов, полученных из печени здоровых животных. Кроме того, гликогены печени раковых животных отличаются, повидимому, большим разнообразием в строении молекул, о чем говорит более высокая степень разнообразия в проценте расщепляемости этих гликогенов бета-амилазой по сравнению с этой величиной для гликогенов печени группы здоровых контрольных животных.

Необходимо было уточнить детали различия в строении исследуемых полисахаридов, выяснить причины большего разнообразия структурных особенностей гликогенов, выделенных из печени животных с привитой карциномой Броуна-Пирс, что было сделано нами в последующих сериях опытов.

- 0 -

За помощь в изучении методов математической обработки экспериментальных материалов и кинетики ферментативных процессов выражаю искреннюю признательность и приношу большую благодарность доценту М.Н.Кирееву.

2. ИЗУЧЕНИЕ ИОД-ГЛИКОГЕНОВЫХ КРИВЫХ, ПОЛУЧЕННЫХ В РЕЗУЛЬТАТЕ ФОТОМЕТРИРОВАНИЯ АБСОРБЦИОННЫХ СОЕДИНЕНИЙ ИОДА С ГЛИКОГЕНАМИ ПЕЧЕНИ КРОЛИКОВ, ПОРАЖЕННЫХ КАРЦИНОМОЙ БРОУНА-ПИРС

Реакция гликогена с Иодом была известна со времени открытия этого полисахарида (C. Bernard, 1857). В течение всех последующих лет она привлекала к себе пристальное внимание исследователей, стремившихся расшифровать ее природу (A. Meyer, 1886; J. Young, 1937; K. Freudenberg, E. Schaaf, J. Dimpert, J. Ploetz, 1939; K. Meyer, P. Bernfeld, 1941; M. Swanson, 1948 и др.). Однако, наиболее основательные исследования, посвященные этому вопросу, были проведены в нашей стране (Б.Н. Степаненко, Е.М. Афанасьева, 1947-1949; Е.М. Афанасьева, 1954). Они дали возможность составить представление о механизме взаимодействия Иода с гликогенами в этой реакции и выдвинуть теорию, согласно которой молекулы Иода при Иод-гликогеновой реакции располагаются в витках спиралей боковых цепей полисахарида, благодаря чему интенсивность и оттенок окраски, возникающей при этой реакции, зависят от длины наружных ветвей исследуемого гликогена.

Учитывая вышеизложенное, мы решили, пользуясь Иодной реакцией и методом получения абсорбционных кривых, разработанным Б.Н. Степаненко и Е.М. Афанасьевой (1949), проверить сделанное нами заключение о наличии более коротких наружных ветвей в молекулах гликогенов, выделенных из печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс, в сравнении с гликогенами печени здоровых животных.

Для этого предварительно препараты, выделенные из печени животных опытной и контрольной группы, высушивались в эксикаторе

над фосфорным ангидридом при комнатной температуре до постоянного веса. Перед каждым опытом проверялся титр 0,1-нормального раствора йода в йодистом калии, приготовленного на фосфатном буфере ($\text{pH}=7,0$). Затем навески исследуемых гликогенов по 8,1 мг (на сухой вес) растворялись в фосфатном буфере ($\text{pH}=7,0$) в мерных колбочках на 50 мл. Применение фосфатного буфера в качестве растворителя гликогена и йода в йодистом калии вызвано тем, что степень поглощения, определяющая высоту расположения абсорбционной кривой, неодинакова при различных pH исследуемого раствора. Наибольшая степень поглощения в точке максимума была отмечена авторами метода при $\text{pH}=7,0$.

Авторами показано также, что лучшие результаты фотометрирования получаются тогда, когда в кювете с толщиной слоя жидкости 5 мм находится 0,162 мг гликогена (то есть 1 микроэквивалент глюкозного остатка) и 0,685 мг йода, (т.е. 5 микроэквивалентов йода). Для получения такого соотношения приготовленный вышеуказанным способом раствор гликогена из мерной колбочки переносился в две градуированные пробирки, закрываемые стеклянными пробками, по 2 мл в каждую. Затем в пробирку № 1 к взятому количеству раствора гликогена с помощью микропипетки добавлялось 0,1 мл вышеупомянутого 0,1-нормального раствора йода в йодистом калии. Далее объем жидкости в пробирке доводился фосфатным буфером ($\text{pH}=7$) до 4 мл. В пробирку № 2 к взятому раствору гликогена добавлялся фосфатный буфер ($\text{pH}=7,0$) до получения общего объема, равного 4 мл. В пробирку № 3 в небольшое количество фосфатного буфера микропипеткой вносилось 0,1 мл 0,1-нормального раствора йода, и объем жидкости в пробирке доводился фосфатным буфером ($\text{pH} = 7,0$) до 4 мл.

Содержимое всех пробирок тщательно перемешивалось и оставлялось стоять в течение 10 минут, после чего производилось фотометрирование с помощью электрофотоколориметра модели ФЭКН-57. Фотометрирование производилось с двумя парами кювет, имеющих толщину , равную 5 мм. Перед открытой диафрагмой электрофотоколориметра помещались две кюветы, в одной из которых содержался раствор гликогена с йодом в фосфатном буфере, а в другой - чистый фосфатный буфер. Во второе гнездо электрофотоколориметра помещалась вторая пара кювет, содержащая раствор йода в одной кювете и раствор гликогена в другой. Такое расположение кювет исключало влияние опалесценции раствора гликогена и окраски самого раствора йода на результаты фотометрирования.

Фотометрирование растворов гликогенов печени раковых и здоровых кроликов производилось нами со светофильтрами, имеющими эффективную длину волны, равную 450, 480, 540, 570, 630, 660, 750 μ , при этом было исследовано 28 препаратов гликогенов, выделенных из печени кроликов, пораженных карциномой Броуна-Пирс, и 27 препаратов гликогенов, полученных из печени здоровых контрольных животных. Полученные данные приводятся в таблице № II.

Представленные результаты анализов легли в основу графического изображения тех закономерностей, которые могли выявиться в процессе проведения этих исследований, для чего на оси абсцисс откладывались величины, характеризующие эффективную длину волны исследуемого в том или ином случае светофильтра, а на оси ординат - соответствующие величины экстинкции.

Таблица № II

Величины экстинкций, полученные для светофильтров, имеющих различную эффективную длину волны (м) при электрофотоколориметрии растворов гликогенов печени здоровых кроликов и с карциномой Броуна-Пирс

Препараты гликогенов печени кроликов											
з д о р о в ы х						р а к о в ы х					
0,630 м	0,570 м	0,540 м	0,480 м	0,450 м	0,420 м	0,630 м	0,570 м	0,540 м	0,480 м	0,450 м	0,420 м
8	0,35	0,46	0,49	0,52	0,50	0,15	0,39	0,48	0,50	0,52	0,53
0	0,38	0,47	0,50	0,52	0,50	0,24	0,34	0,44	0,47	0,50	0,52
9	0,38	0,46	0,49	0,52	0,50	0,22	0,30	0,44	0,48	0,52	0,53
5	0,32	0,44	0,47	0,51	0,49	0,15	0,23	0,43	0,46	0,49	0,51
5	0,34	0,46	0,49	0,52	0,50	0,19	0,33	0,44	0,47	0,51	0,48
6	0,36	0,47	0,50	0,51	0,49	0,20	0,30	0,43	0,46	0,50	0,51
1	0,38	0,48	0,50	0,51	0,50	0,26	0,36	0,45	0,48	0,51	0,48
5	0,35	0,45	0,48	0,51	0,49	0,17	0,27	0,43	0,46	0,50	0,51
0	0,30	0,43	0,48	0,51	0,49	0,17	0,26	0,44	0,47	0,50	0,51
0	0,38	0,49	0,51	0,52	0,50	0,21	0,31	0,43	0,45	0,50	0,51
8	0,35	0,44	0,47	0,50	0,48	0,21	0,30	0,45	0,47	0,51	0,48
7	0,38	0,45	0,48	0,51	0,49	0,27	0,36	0,44	0,47	0,50	0,51
1	0,29	0,44	0,47	0,50	0,47	0,15	0,24	0,42	0,47	0,51	0,49
4	0,34	0,44	0,47	0,51	0,48	0,21	0,32	0,42	0,46	0,50	0,46
9	0,36	0,45	0,48	0,51	0,50	0,11	0,23	0,41	0,45	0,50	0,47
7	0,29	0,43	0,47	0,50	0,47	0,20	0,27	0,41	0,46	0,50	0,51
3	0,30	0,43	0,47	0,50	0,48	0,25	0,35	0,46	0,48	0,50	0,51
6	0,36	0,45	0,48	0,51	0,49	0,25	0,34	0,44	0,47	0,50	0,51
7	0,34	0,46	0,50	0,51	0,50	0,22	0,30	0,43	0,47	0,50	0,48
0	0,30	0,42	0,45	0,49	0,43	0,16	0,26	0,42	0,46	0,50	0,48
6	0,34	0,45	0,48	0,51	0,48	0,22	0,32	0,41	0,45	0,49	0,50
0	0,37	0,45	0,48	0,51	0,49	0,17	0,26	0,42	0,47	0,50	0,48
2	0,30	0,42	0,46	0,50	0,47	0,16	0,29	0,41	0,45	0,50	0,47
3	0,30	0,43	0,47	0,50	0,48	0,19	0,25	0,41	0,46	0,49	0,47
6	0,36	0,44	0,47	0,49	0,48	0,17	0,25	0,41	0,45	0,48	0,49
0	0,30	0,42	0,45	0,49	0,43	0,23	0,33	0,42	0,45	0,48	0,49
2	0,31	0,42	0,45	0,49	0,50	0,19	0,27	0,42	0,45	0,48	0,49
						0,16	0,30	0,41	0,44	0,48	0,49

По данным полученных экстинкций были вычерчены абсорбционные кривые соединений исследуемых полисахаридов с йодом, образцы которых приведены на рис.10.

Анализ йод-гликогеновых кривых показал, что при фотометрировании с йодом растворов гликогенов, полученных из печени здоровых кроликов, максимум поглощения света во всех случаях обнаруживался при работе со светофильтром, имеющим эффективную длину волны равную 480 мμ . При фотометрировании с йодом в тех же условиях растворов гликогенов, выделенных из печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс, максимум абсорбции в этой части спектра наблюдался лишь в 39,3% случаев. При исследовании же большей части препаратов гликогенов этой группы, составляющей 60,7%, положение максимума абсорбции сдвигалось в коротковолновую часть спектра и обнаруживалось при светофильтре с эффективной длиной волны, равной 450 мμ .

Это подтверждает положение, установленное нами при изучении процесса бета-амилолиза интересующих нас полисахаридов о том, что при развитии в организме злокачественного новообразования в печени животного начинают синтезироваться гликогены с более короткими наружными ветвями в молекуле, чем у здоровых животных. Это заключение абсолютно правомочно для той части исследованных гликогенов, при фотометрировании которых мы наблюдали определенный сдвиг максимума поглощения света в коротковолновую часть спектра.

Однако, в ряде случаев йод-гликогеновые кривые, полученные как при исследовании гликогенов печени здоровых, так и раковых животных, располагались очень близко одна к другой, что очень затрудняло сравнение кривых и не давало возможности с полной

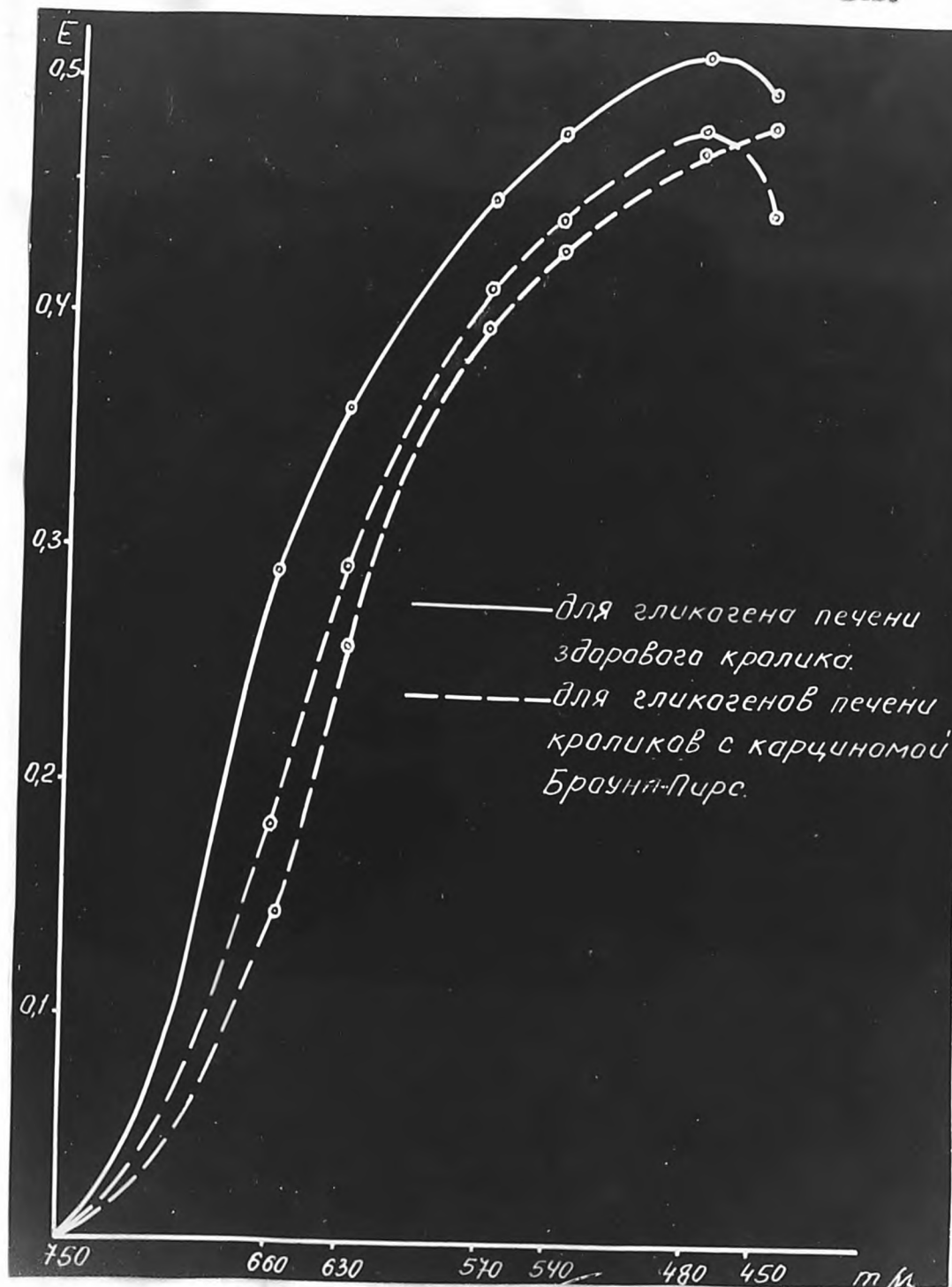


Рис. 10. Кривые абсорбционных соединений мода с гликогенами печени здоровых кроликов и с карциномой Браун-Пирс.

определенностью решить вопрос о наличии сходства или различия в структуре изучаемых полисахаридов. Это привело к необходимости провести более глубокий анализ полученных данных, что мы сделали с помощью вариационно-статистического метода, дающего возможность наглядно иллюстрировать распределение изучаемых показателей в виде кумулят.

Прежде всего мы решили выяснить имеются ли существенные отличия в показателях экстинкций, найденных при фотометрировании с каждым из вышеуказанных светофильтров, для растворов гликогенов, выделенных из печени здоровых и больных раком животных. С этой целью отдельно анализировались данные, характеризующие экстинкции, полученные при снятии абсорбционных кривых соединений полисахаридов с йодом с тем или иным светофильтром, и результаты, полученные для гликогенов печени здоровых кроликов, сравнивались с таковыми, полученными для гликогенов печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс.

Для этого все данные, характеризующие экстинкции, ~~характеризующие экстинкции~~, полученные как для гликогенов печени здоровых, так и раковых животных, разбивались на классы, затем определялась величина классового промежутка, вариация, накопленная частота вариационного ряда, подобно тому, как это делалось в предыдущей серии опытов.

Данные вариаций и накопленных частот вариационного ряда, найденные для каждого светофильтра в отдельности, представлены в таблице № 12. Полученные результаты изображены графически в виде кумулят, при построении которых на оси абсцисс откладывались значения вариаций, а на оси ординат — накопленные частоты вариационного ряда. Кумуляты, построенные для каждого светофильтра, представлены на рис. II-16.

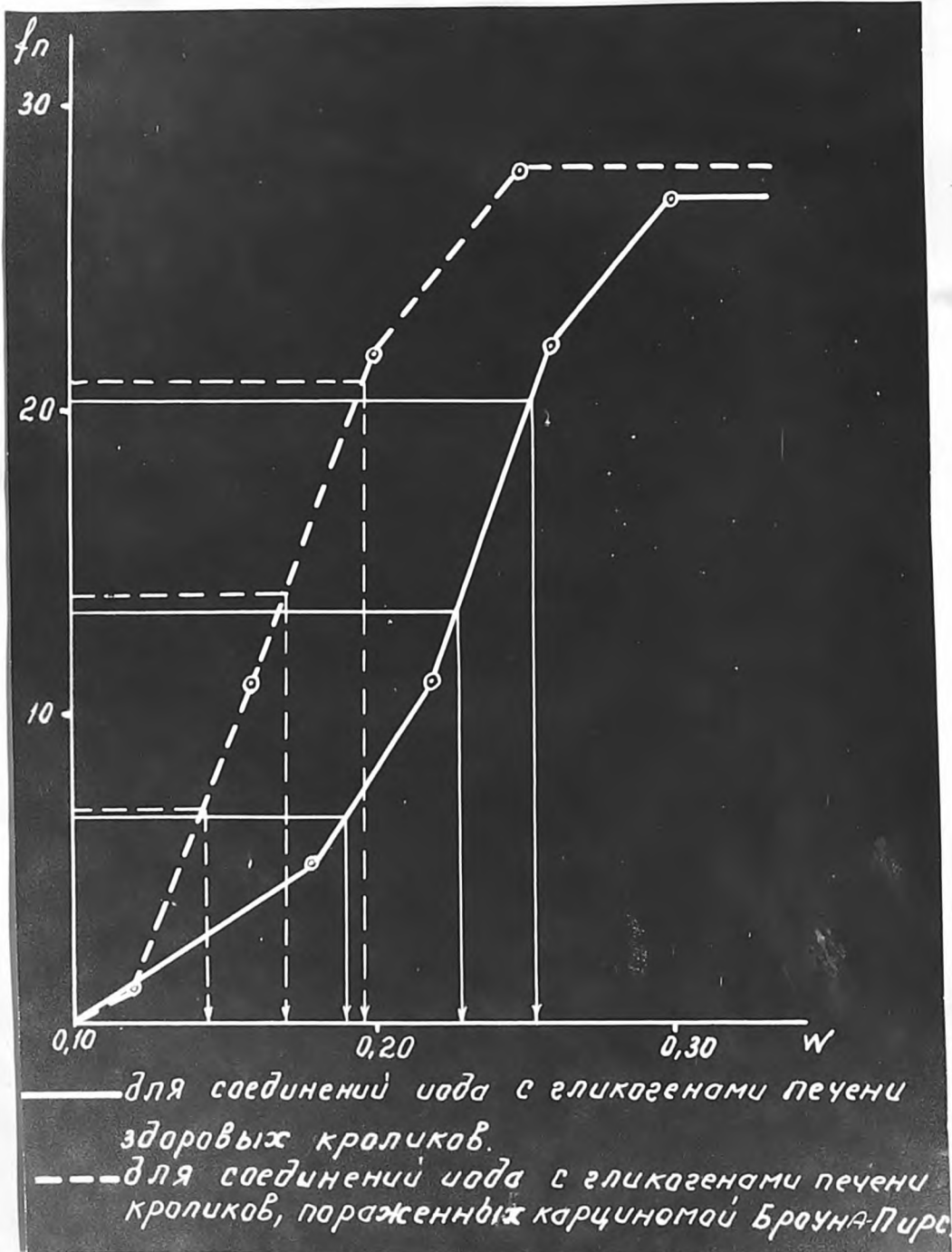


Рис. II. Кумуляты величин экстинкций, полученных при электрофотоколориметрии соединений иода с гликогенами печени здоровых кроликов и с карциномой Броуна - Пирса, при работе со светофильтром, имеющим эффективную длину волны 660 $m\mu$.

Таблица № 12.

Результаты вариационно-статистического анализа данных, характеризующих величины экстинкции, полученных для светофильтров с различной эффективной длиной волны при электрофотоколориметрии растворов гликогенов печени здоровых кроликов и с карциномой Броуна-Пирс

Эффектив-:Препараты:Вариация : ная длина:гликоге- : волны све-нов пече- : тофильтра:ни кроли- : в <i>mμ</i> :ков :тота :			К л а с с ы			
			I	2	3	4
660	здоровых	<i>w</i>	0,18	0,22	0,26	0,30
		<i>fn</i>	5	11	22	27
	раковых	<i>w</i>	0,12	0,16	0,20	0,25
		<i>fn</i>	1	11	22	28
630	здоровых	<i>w</i>	0,30	0,33	0,36	0,39
		<i>fn</i>	9	14	22	27
	раковых	<i>w</i>	0,24	0,28	0,32	0,37
		<i>fn</i>	8	17	24	28
570	здоровых	<i>w</i>	0,43	0,45	0,47	0,49
		<i>fn</i>	8	19	25	27
	раковых	<i>w</i>	0,42	0,44	0,46	0,48
		<i>fn</i>	13	24	27	28
540	здоровых	<i>w</i>	0,46	0,48	0,50	0,52
		<i>fn</i>	4	19	26	27
	раковых	<i>w</i>	0,45	0,47	0,49	0,51
		<i>fn</i>	8	24	27	28
480	здоровых	<i>w</i>	0,49	0,50	0,51	0,52
		<i>fn</i>	4	10	22	27
	раковых	<i>w</i>	0,48	0,49	0,50	0,52
		<i>fn</i>	3	7	22	28
450	здоровых	<i>w</i>	0,44	0,46	0,48	0,50
		<i>fn</i>	1	2	11	27
	раковых	<i>w</i>	0,47	0,49	0,51	0,53
		<i>fn</i>	5	15	25	28

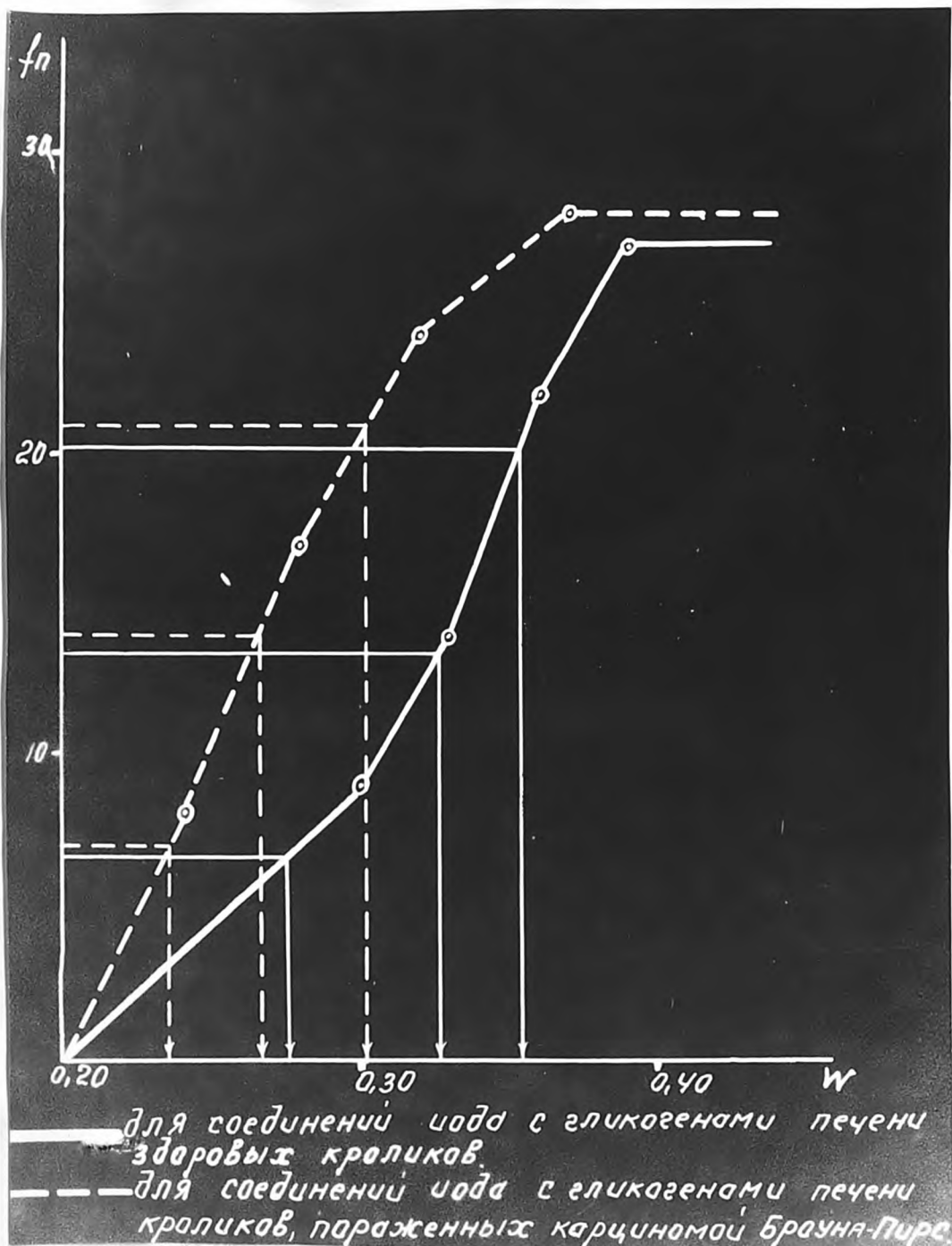


Рис. 12. Кумуляты величин экстинкций, полученных при электрофотоколориметрии соединений воды с гликогенами печени здоровых кроликов и с карциномой Брауна - Пирса, при работе со светофильтром, имеющим эффективную длину волны $630\text{ м}\mu$

При анализе этих кривых выявляется, что кумуляты, полученные при обработке данных, касающихся гликогенов печени здоровых кроликов, имеют иное расположение на графиках по сравнению с кривыми, характеризующими гликогены печени животных, пораженных злокачественным новообразованием. Для всех светофильтров, за исключением светофильтра с эффективной длиной волны 450 $m\mu$, кумуляты для гликогенов печени раковых животных смещены влево по отношению к соответствующим кривым, характеризующим гликогены печени здоровых кроликов. При этом, чем больше величина эффективности светопропускания светофильтра, тем дальше отстоят друг от друга кумуляты, вычерченные для препаратов гликогенов печени здоровых и раковых животных. По мере уменьшения эффективной длины волны светофильтра, используемого при фотометрировании, кривые, полученные для обеих групп исследуемых препаратов гликогенов, все больше и больше сближаются друг с другом. При работе со светофильтром с эффективной длиной волны 480 $m\mu$, когда определяется максимум поглощения для всех препаратов гликогенов, выделенных из печени здоровых животных, и для части гликогенов печени раковых кроликов, наблюдается особенно сильное сближение изучаемых нами кривых. Однако и здесь кумулята, характеризующая распределение экстинкций препаратов гликогенов раковых животных, располагается несколько ближе к оси ординат, чем таковая, полученная для гликогенов печени здоровых животных.

Такое взаимное расположение кривых на графике с несомненностью указывает на то, что при соединении гликогенов с йодом развивается неодинаковая окраска в случае исследования гликогенов печени здоровых или раковых животных, что и выразилось в различной экстинкции при фотометрировании. Это различие в экстинкции, а следовательно и в окраске соединений изучаемых нами

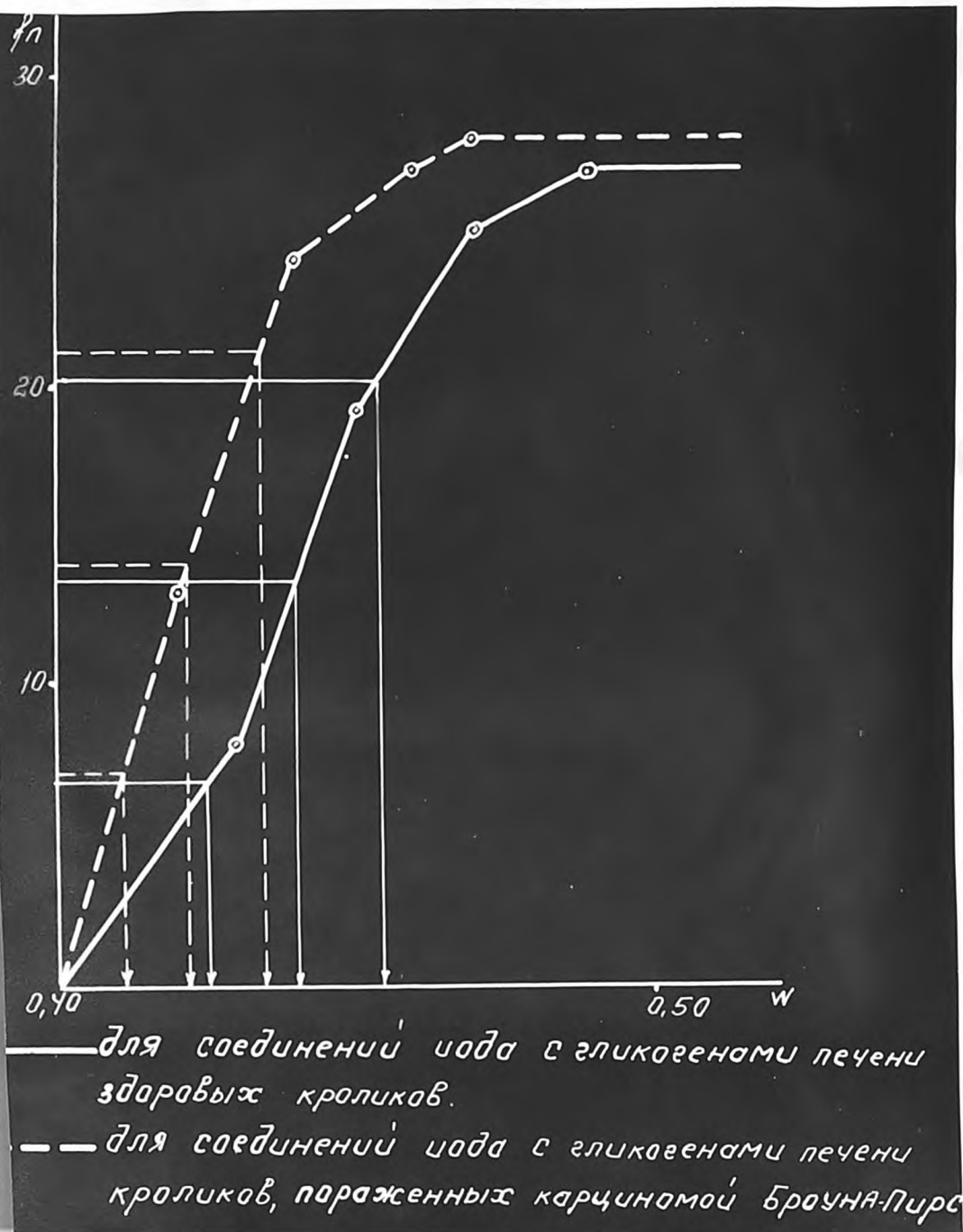


Рис. 13. Кумуляты величины экстинкций, полученных при электрофотоколориметрии соединений мода с гликогенами печени здоровых кроликов и с карциномой Броуна-Пирса, при работе со светофильтром, имеющим эффективную длину волны 570 $m\mu$.

полисахаридов с йодом, лучше всего выявляется при фотометрировании со светофильтрами, имеющими большую эффективную длину волны. Распределение изучаемого признака с помощью вариационно-статистического метода указывает на более низкую экстинкцию, определяемую при анализе гликогенов печени животных, пораженных раком, поскольку кумуляты, отражающие распределение этих величин располагаются ближе к оси ординат, чем кумуляты этого же признака, полученные для препаратов гликогенов здоровых контрольных животных. Как указывалось выше, это имеет место при работе со всеми использованными нами светофильтрами, кроме светофильтра с эффективной длиной волны 450 $m\mu$.

Кумуляты, вычерченные на основании результатов фотометрирования растворов гликогенов печени здоровых и раковых кроликов со светофильтром, имеющим эффективную длину волны 450 $m\mu$, как видно на рис. 16, пересекаются. Следовательно, при работе с этим светофильтром у какой-то части препаратов гликогенов печени раковых животных обнаруживается большая величина экстинкции, чем при аналогичном исследовании гликогенов печени здоровых кроликов. Такое положение можно объяснить тем, что при использовании этого светофильтра, фотометрируя растворы гликогенов печени здоровых кроликов, мы во всех случаях имеем уже спад экстинкции после максимума, а фотометрируя гликогены печени раковых животных, мы для большей части препаратов обнаруживаем здесь максимум поглощения, что естественно дает увеличение экстинкции. Для того, чтобы убедиться действительно ли это так, мы отдельно обработали статистически данные фотометрирования тех препаратов гликогенов печени раковых кроликов, которые имели максимум поглощения в этой части спектра. Полученные данные мы изобразил графически в виде дополнительной кумуляты, представленной на рис. 16.

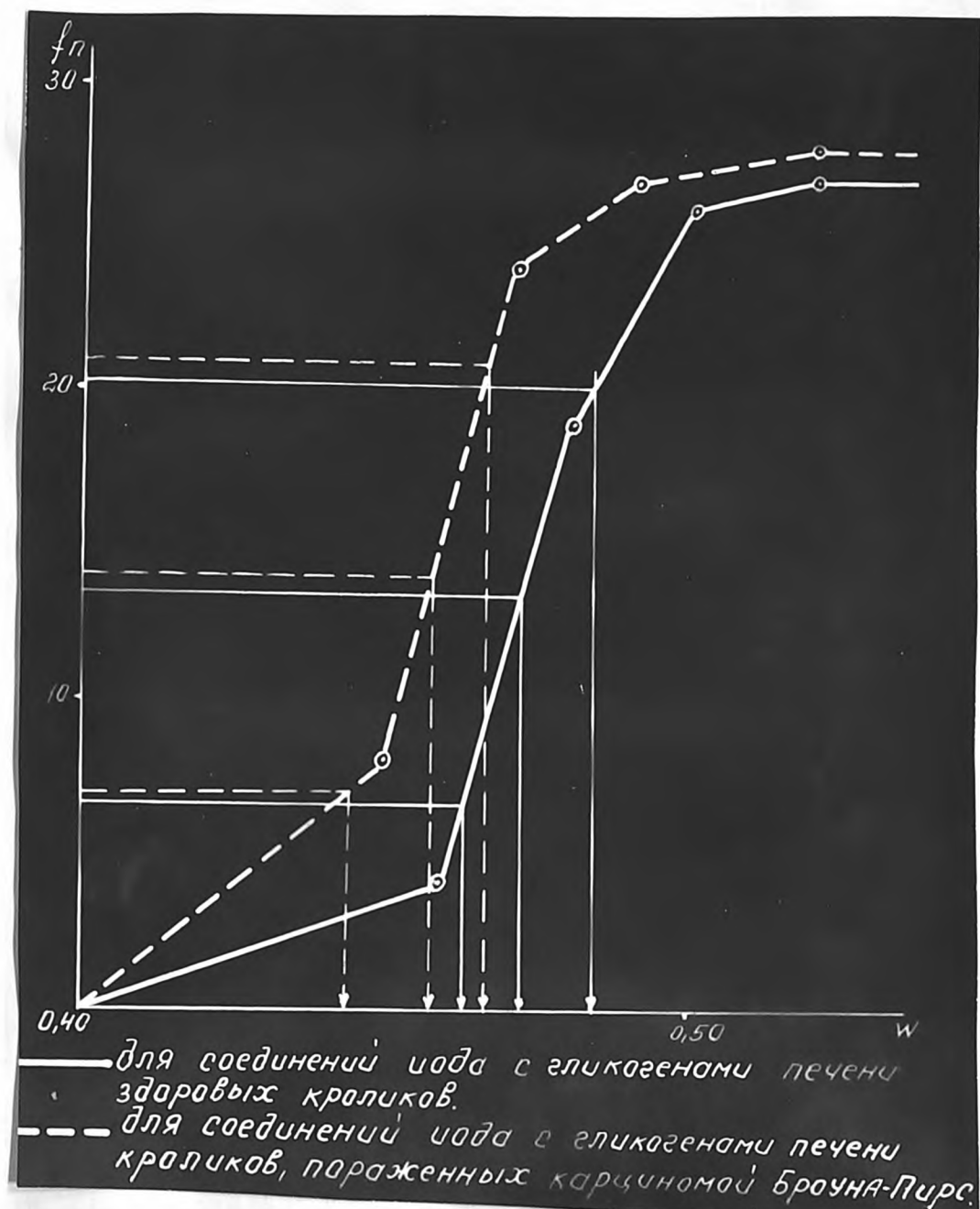


Рис. 14. Кумуляты величины экстинкций, полученных при электрофотоколориметрии соединений иода с гликогенами печени здоровых кроликов и с карциномой Броуна - Пирса, при работе со светофильтром, имеющим эффективную длину волны 540 $m\mu$.

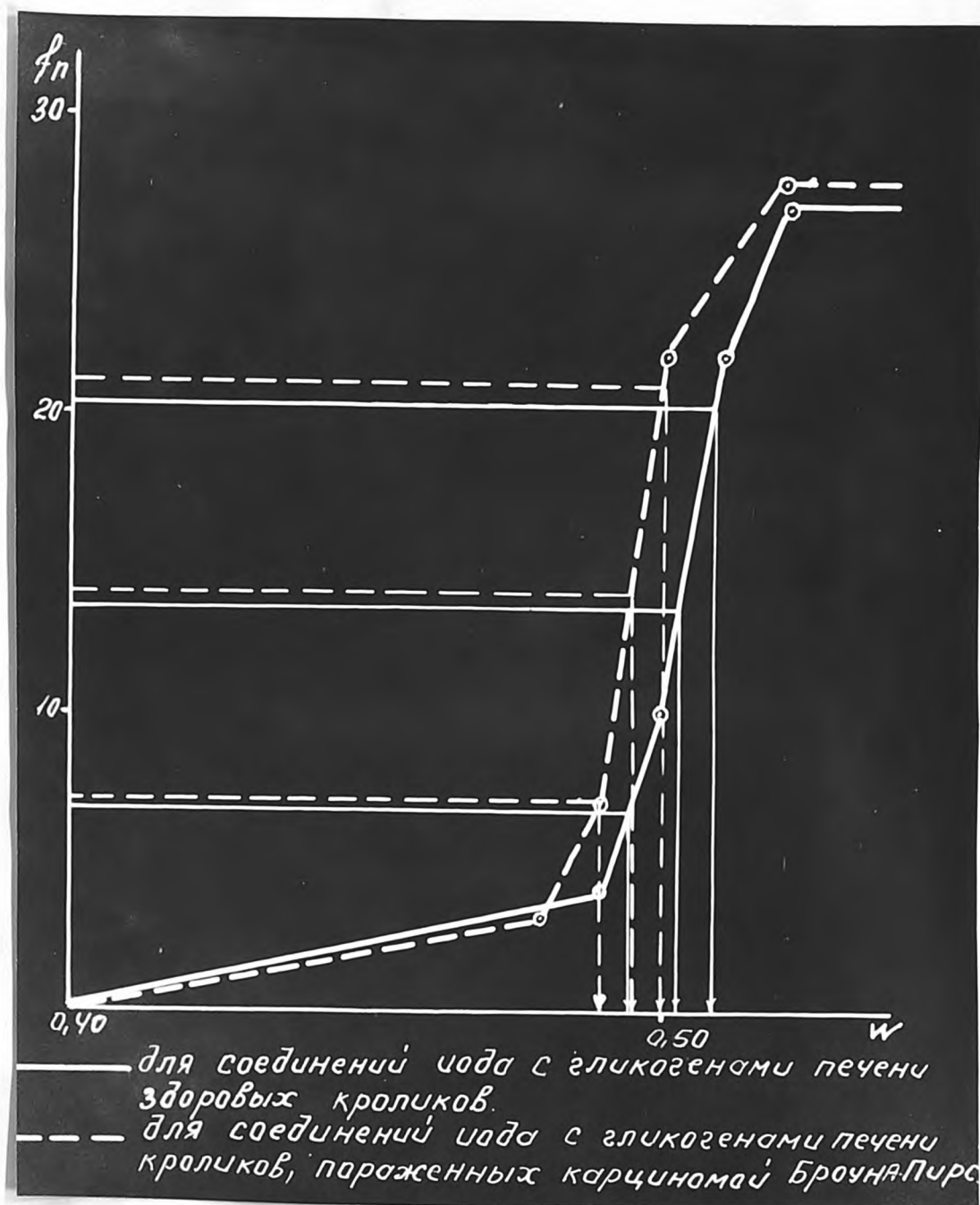
Как видно из графика, эта кумулята сместилась вправо по отношению к соответствующей кривой, построенной на основании результатов исследования препаратов гликогенов печени здоровых кроликов. Это со всей очевидностью подтверждает положение о том, что пересечение изучаемых нами кумулят при работе с данным светофильтром связано с наличием максимума поглощения в этой части спектра для большей части изучаемых нами раковых препаратов гликогенов.

Более глубокий анализ вышеприведенных кривых был произведен нами с использованием квантилей, методика получения которых подробно описана в предыдущей главе работы. Найденные для всех кумулят значения 1-го, 2-го и 3-го квантилей представлены в таблице № 13.

Таблица № 13

Данные, характеризующие квантили, соответствующие величинам экстинкций для светофильтров с различной эффективной длиной волны при электрофотоколориметрии растворов гликогенов печени здоровых кроликов и с карциномой Броуна-Пирс

Квантили	:Препараты : :гликогенов : :печени : :кроликов :	Эффективная длина волны светофильтров в мμ					
		660	630	570	540	480	450
Первый	здоровых	0,19	0,28	0,43	0,46	0,49	0,47
	раковых	0,14	0,23	0,41	0,44	0,48	0,46
Второй (медиана)	здоровых	0,23	0,33	0,44	0,47	0,50	0,48
	раковых	0,17	0,27	0,42	0,46	0,49	0,48
Третий	здоровых	0,25	0,35	0,46	0,49	0,51	0,49
	раковых	0,19	0,30	0,44	0,47	0,50	0,50



Ри.15. Кумуляты величин экстинкций, полученных при электрофотоколориметрии соединений иода с гликогенами печени здоровых кроликов и с карциномой Броуна-Парка, при работе со светофильтром, имеющим эффективную длину волны 480 $m\mu$.

При сравнении полученных данных распределения изучаемого признака видно, что величины экстинкций при фотометрировании йод-гликогенов печени раковых животных везде, за исключением двух случаев, ниже, чем эти величины, найденные при исследовании соединений с йодом гликогенов, полученных из печени здоровых животных. Это уменьшение экстинкций не более, чем в 1,3 раза в каждом из рассмотренных квартилей, по мере уменьшения эффективной длины волны светофильтров постепенно падает и в конце концов практически исчезает. В двух случаях, где не обнаруживается уменьшение изучаемого показателя, не наблюдается и его увеличения, так как в одном случае имеется равенство экстинкций, а в другом лишь незначительная тенденция к увеличению. Причина этого явления была вскрыта нами выше.

Таким образом, на основании результатов исследования йод-гликогеновых кривых мы можем прийти к заключению, что при развитии в организме кролика карциномы Броуна-Пирс в печени синтезируются гликогены с более короткими наружными ветвями, чем в норме, поскольку максимум поглощения соединений этих гликогенов с йодом в основной своей массе смещается в коротковолновую часть спектра, что подтверждено статистически. Следовательно, результаты этих исследований полностью согласуются с теми данными, которые были получены нами ранее при исследовании процесса бета-амилолиза интересующих нас полисахаридов.

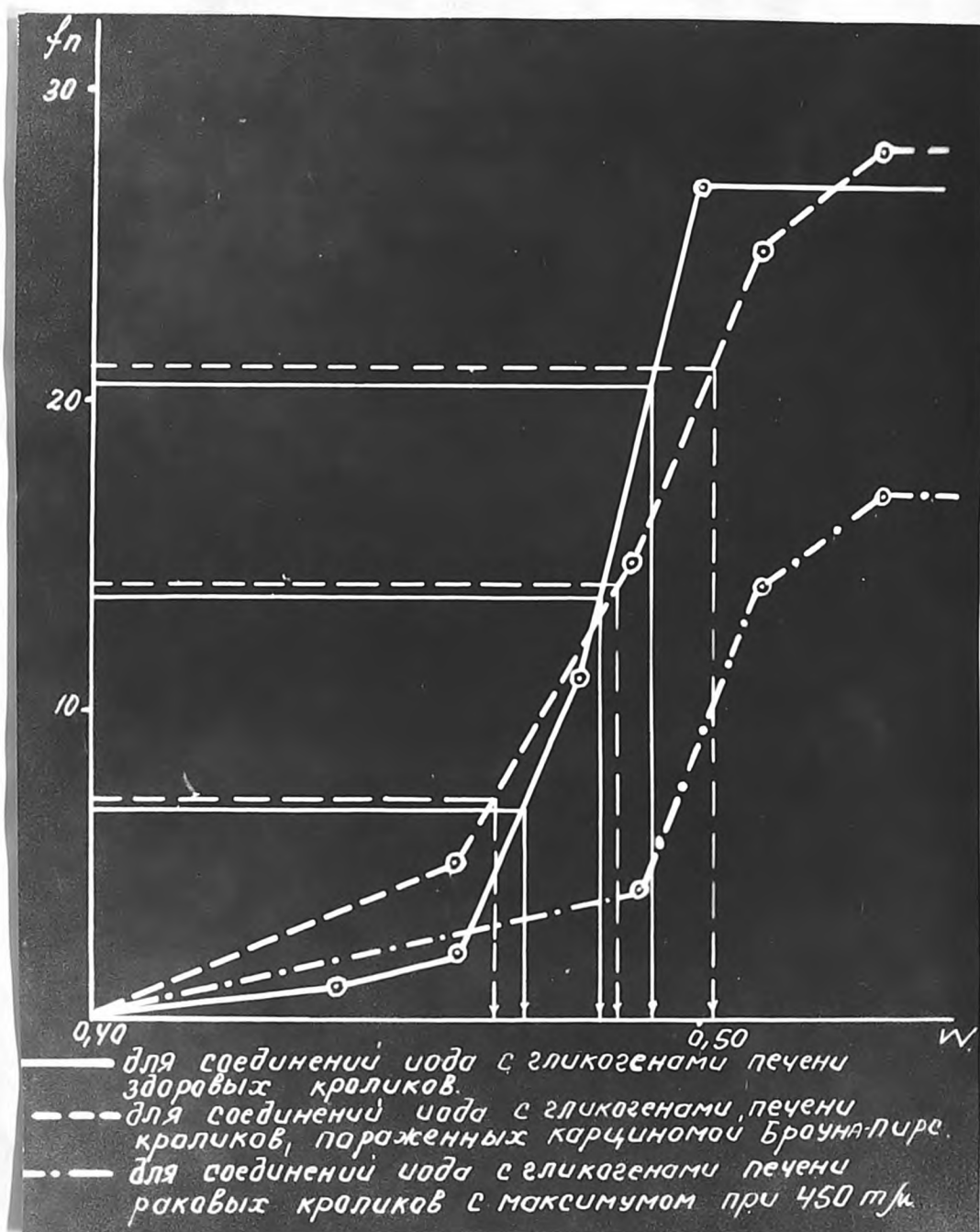


Рис. 16. Кумуляты величин экстинкций, полученных при электрофотоколориметрии соединений иода с гликогенами печени здоровых кроликов и с карциномой Броуна-Пирса, при работе со светофильтром, имеющим эффективную длину волны 450 $m\mu$.

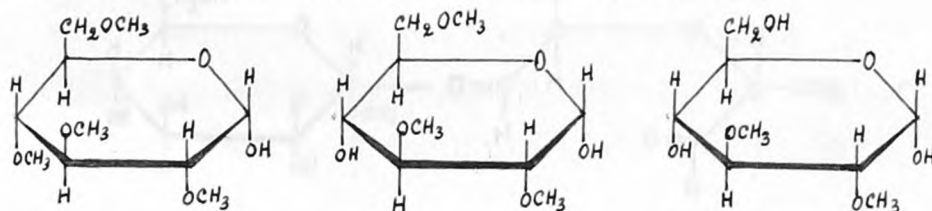
3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СРЕДНЕЙ ВЕЛИЧИНЫ ЕДИНИЦЫ ЦЕПИ ГЛИКОГЕНОВ ПЕЧЕНИ КРОЛИКОВ С КАРЦИНОМОЙ БРОУНА-ПЕРС И ИЗУЧЕНИЕ СТЕПЕНИ ВЕТВЛЕНИЯ МОЛЕКУЛ ЭТИХ ПОЛИСАХАРИДОВ

Одним из методов, дающих возможность судить о структуре молекул полисахаридов, является определение величины их единицы цепи, то есть числа, показывающего сколько глюкозных остатков приходится на каждый концевой неальдегидный конец молекулы полисахарида. Единица цепи дает возможность судить о степени ветвления полисахарида, так как степень ветвления характеризуется отношением числа глюкозных остатков, представляющих точки ветвления, к общему числу глюкозных остатков в молекуле. При большом количестве точек ветвления, что имеет место в сильно разветвленных полисахаридах типа гликогенов, числа концевых неальдегидных остатков глюкозы и точек ветвления можно считать равными, а следовательно единица цепи и степень ветвления являются величинами обратными друг другу, так как единица цепи выражается отношением $\frac{a}{m}$, а степень ветвления — отношением $\frac{n}{a}$, где a — общее число глюкозных остатков, m — число концевых неальдегидных остатков глюкозы, n — число точек ветвления в молекуле полисахарида, при этом $m = n + 1 \approx n$.

Из сказанного ясно, что для определения единицы цепи необходимо найти общее число глюкозных остатков в исследуемом полисахариде и число концевых нередуцирующих глюкозных остатков в нем.

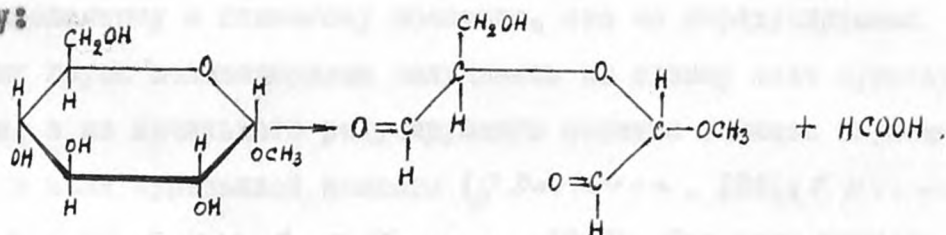
Определение общего числа глюкозных остатков в полисахариде осуществляется путем полного кислотного гидролиза исследуемого полисахарида с последующим определением восстанавливающей способности образовавшейся при гидролизе глюкозы. Определение концевых нередуцирующих глюкозных остатков в полисахариде долгое

время производилось методом метилирования и исследования продуктов гидролиза метилированных производных полисахаридов. При этом в условиях полного метилирования атомы водорода всех свободных гидроксильных групп полисахарида замещались метильными группами. Нередуцирующие концевые глюкозные остатки, содержавшие по четыре свободных гидроксильных группы, давали при метилировании и последующем гидролитическом расщеплении глюкозидных связей 2,3,4,6-тетраметилглюкозу, промежуточные звенья 2,3,6-триметилглюкозу и звенья в точках ветвления 2,3-диметилглюкозу:

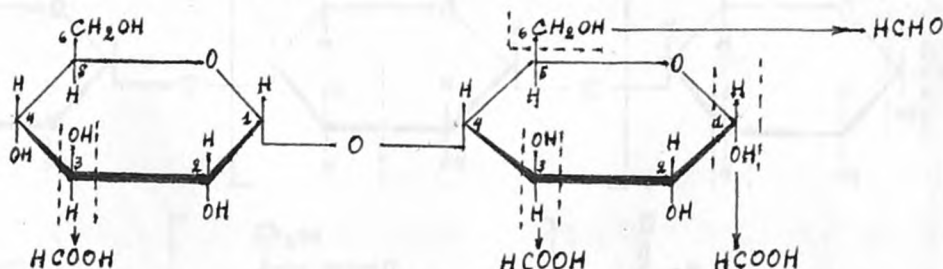


Содержание 2,3,4,6-тетраметилглюкозы в продуктах гидролиза метилированного полисахарида давало возможность судить о количестве концевых нередуцирующих групп в исследуемом полисахариде. (W. Naworth, E. Percival, 1931). Однако, метод метилирования является малодоступным в связи с тем, что для анализа требуются большие количества исследуемого препарата, которые не всегда возможно получить (до 30 г.). Кроме того, метилирование сильно разветвленных полисахаридов, каковыми являются гликогены, протекает чрезвычайно медленно в связи с затрудненным доступом метилирующего агента к свободным гидроксильным группам внутренних частей молекулы. Это требует многократного повторения метилирования, что может привести к потерям и гидролизу неметилированного продукта. Фракционирование и анализ метилпроизводных также являются длительными и трудоемкими процессами.

Все это привело к необходимости разработки более простого метода определения концевых групп полисахаридов, каковым явился метод периодатного окисления. Взаимствуя основную идею из работы Малапраде (*L. Malaprade, 1928*) по окислению гликолей йодной кислотой Джексон и Гедсон (*E. Jackson, C. Hudson, 1937*) обнаружили в своих исследованиях, что при действии солей йодной кислоты на метилглюкопиранозид гликозидное кольцо разрывается с выделением третьего углеродного атома, превращающегося в муравьиную кислоту:



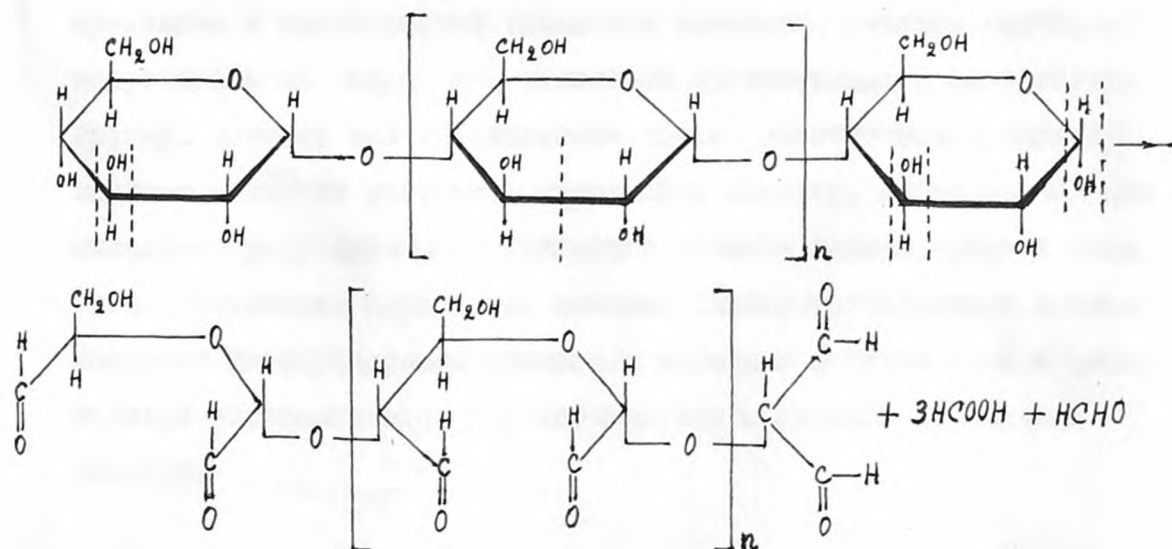
Дальнейшее изучение периодатного окисления показало, что восстанавливающие дисахариды, такие как мальтоза, состоящие из двух глюкопиранозных остатков, соединенных α -1,4-связью, при окислении периодатом также дают муравьиную кислоту. В этом случае муравьиная кислота образуется из каждого глюкозного остатка, входящего в дисахарид, причем из редуцирующего остатка глюкозы образуется два моля муравьиной кислоты, а из нередуцирующего глюкозного остатка образуется один моль муравьиной кислоты:



Это послужило предпосылкой к тому, чтобы окисление с помощью солей йодной кислоты применить к полисахаридам, поскольку полисахариды можно рассматривать как гомологи мальтозы.

Каждая концевая группа полисахарида соответствует нередуцирующему глюкозному остатку мальтозы, а начало цепи, имеющее глюкозный остаток со свободным полуацетальным гидроксилом, аналогично редуцирующему остатку мальтозы. Поэтому можно было ожидать, что окисление полисахаридов периодатом будет протекать аналогично окислению мальтозы.

Проведенные исследования подтвердили это предположение. Окисление с помощью периодата, примененное к целлюлозе, крахмалу, амилопектину и гликогену показало, что из нередуцирующих концевых групп полисахаридов получалось по одному молю муравьиной кислоты, а из начального редуцирующего остатка глюкозы выделялось два моля муравьиной кислоты (*G. Davidson*, 1941; *F. Brown, T. Halsall, E. Hirst, J. Jones*, 1948). При этом периодатом окислялись и глюкозные остатки, образующие промежуточные линейные участки цепей полисахаридов, однако, вычленения атомов углерода в виде муравьиной кислоты при этом не происходило; наблюдался лишь разрыв связи между вторым и третьим углеродными атомами в каждом из промежуточных глюкозных остатков, и у этих атомов углерода появлялись альдегидные группы:



Таким образом, при окислении периодатом неразветвленных полисахаридов, таких как амилоза, из каждого моля исследуемого полисахарида образуется три моля муравьиной кислоты также, как при окислении мальтозы. Следовательно, на долю концевых нередуцирующих групп приходится только одна треть всего количества муравьиной кислоты, образующейся при периодатном окислении. Поэтому определение концевых групп в этом случае может быть сведено к определению количества молей муравьиной кислоты с учетом при расчете того обстоятельства, что число концевых нередуцирующих групп равняется одной трети числа молей образовавшейся при периодатном окислении муравьиной кислоты.

Аналогично идет окисление периодатом и разветвленных полисахаридов, то есть одна молекула муравьиной кислоты образуется из нередуцирующего концевого глюкозного остатка и две молекулы из редуцирующего остатка глюкозы, который является началом цепи. Промежуточные глюкозные остатки окисляются с образованием альдегидных групп без выделения муравьиной кислоты. Однако, в сильно разветвленных полисахаридах, таких как амилопектин, а тем более гликоген, число нередуцирующих концевых групп очень велико по сравнению с единственным глюкозным остатком, имеющим свободный полуацетальный гидроксил, способный превратиться в альдегидную группу. Поэтому при исследовании сильно разветвленных полисахаридов можно не учитывать муравьиную кислоту, образующуюся при окислении редуцирующего глюкозного остатка полисахаридной цепи. Этим количеством муравьиной кислоты обычно пренебрегают, и число концевых нередуцирующих глюкозных остатков считают равным числу молекул образовавшейся при периодатном окислении муравьиной кислоты.

Метод периодатного окисления нашел широкое применение для определения концевых нередуцирующих групп в сильно разветвленных полисахаридах, поскольку использование его позволило проще и точнее определять величину единицы цепи различных представителей сильно разветвленных полисахаридов, в частности, гликогенов.

Следствием этого явилось появление значительного количества исследований, посвященных определению единицы цепи гликогенов, выделенных из органов различных животных и синтезированных вне организма (*M. Abdel-Akher, F. Smith, 1951; M. Schlamowitz, 1951; Е.М.Афанасьева, Б.Н.Степаненко, 1956; Е.Е.Гончарова, 1957; А.С.Кайнова, 1953 и др.*).

Интересуясь строением гликогенов, синтезируемых в печени кроликов, пораженных карциномой Броуна-Пирс, мы тоже решили воспользоваться периодатным методом определения величины единицы цепи, поскольку с помощью этого показателя мы имели возможность дать дополнительную характеристику структуре молекул интересующих нас полисахаридов, тем более, что ни в одной из работ, посвященных определению единицы цепи гликогенов, не изучались эти полисахариды, выделенные из органов животных, пораженных злокачественным новообразованием.

Величину единицы цепи гликогенов, выделенных из печени здоровых кроликов и с карциномой Броуна-Пирс, мы определяли по методу Поттера и Хассида (*A. Potter, W. Hassid, 1948*).

Периодат натрия, необходимый для определения концевых нередуцирующих групп интересующих нас полисахаридов, мы получали из периодата калия с помощью ионно-обменной колонки по методу, предложенному Р.А.Рутберг (1959). Для этого в ионно-обменную

колонку помещался предварительно смоченный дистиллированной водой катионит KU_2 , имеющий нейтральную реакцию. Затем на горячей, только что вскипяченной дистиллированной воде готовился 6% раствор периодата калия, который горячим пропусклся через колонку, заправленную вышеуказанной смолой. После ионно-обменной реакции из колонки в подставленную колбу стекал раствор периодата натрия. Для контроля за ходом ионно-обменного процесса время от времени мы брали пробы стекающего из колонки раствора и следили за появлением осадка при его охлаждении. Если при этом раствор оставался прозрачным, значит ионно-обменный процесс протекал нормально и из колонки вытекал раствор периодата натрия, если же при охлаждении раствора появлялась муть, значит ионно-обменный процесс закончился и из колонки начал стекать раствор периодата калия, имеющий ничтожную растворимость в холодной воде.

Полученный таким образом раствор периодата натрия сливался в чашки, которые помещались на кипящую водяную баню для выпаривания. После выпаривания раствора получался белый порошок периодата натрия, который использовался нами для периодатного окисления полисахаридов.

Окисляющее действие полученного периодата натрия предварительно проверялось на чистом препарате мальтозы, представляющем собой моногидрат $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$. Этот препарат мальтозы высушивался до постоянного веса, после чего 220 мг его растворялось в 10 мл предварительно прокипяченного 3% раствора хлористого натрия. К смеси добавлялось 10 мл 0,35 М раствора проверенного периодата натрия, и бюксы со смесью, плотно закрытые крышками, помещались в рефрижератор с температурой $4-6^{\circ}C$, где в

течение всего времени исследования находились в темноте, поскольку при воздействии света периодат натрия разрушается. Параллельно ставился контроль, в котором мальтоза отсутствовала.

По теоретическим расчетам на основании всего вышеизложенного при полном окислении периодатом натрия одного моля мальтозы следует ожидать образования трех молей муравьиной кислоты. Необходимо было выяснить сколько же потребуется времени для полного окисления мальтозы, полученным нами периодатом натрия, в наших условиях опыта. Для этого через определенные промежутки времени из инкубационных смесей мы брали пробы по 1 мл, избыток периодата натрия в них разрушали добавлением нескольких капель этилен-гликоля, через час после добавления которого определяли количество муравьиной кислоты, образующейся при окислении мальтозы.

Муравьиная кислота в пробах определялась путем титрования 0,01-нормальным раствором гидрата окиси натрия до появления зеленого окрашивания в присутствии смеси метилрота и метиленовой сини в качестве индикатора. По данным титрования опытной и контрольной проб рассчитывали число молей муравьиной кислоты, приходящейся на каждый моль мальтозы.

Как показали опыты, количество муравьиной кислоты в инкубационной смеси постепенно увеличивалось, достигая трех молей на каждый моль мальтозы к 25 часам инкубации, когда на титрование 1 мл опытной проб в условиях нашего опыта расходовалось 9,46 мл 0,01-нормального раствора гидрата окиси натрия, а на титрование контроля — 0,06 мл того же раствора.

$$\text{Следовательно: } \frac{(9,46 - 0,06) \cdot 0,01 \cdot 20 \cdot 360}{1000 \cdot 0,220} = 3,07$$

молей муравьиной кислоты.

Проделав вышеописанные предварительные опыты, убедившись в доброкачественности полученного периодата натрия, установив сроки инкубации для периодатного окисления мальтозы, мы решили далее проверить будут ли применимы эти сроки в условиях нашего эксперимента для изучения интересующих нас гликогенов, которые, как указывалось выше, окисляются периодатом натрия аналогично мальтозе.

Для этого мы брали навески доведенных до постоянного веса гликогенов (порядка 100 мг), растворяли каждую навеску в 5 мл предварительно прокипяченного 3% раствора хлористого натрия, добавляли равный объем 0,35-молярного раствора периодата натрия, параллельно ставили контроль без гликогена, и полученные смеси с боксах с притертыми крышками оставляли в темноте при температуре 4-6°C. Из этих смесей через 3, 5, 10, 20, 25, 30, 40 часов мы отбирали пробы по 1 мл и определяли количество молей образовавшейся муравьиной кислоты, также, как это делалось в случае периодатного окисления мальтозы.

Эти опыты показали, что при периодатном окислении гликогенов, также, как при окислении мальтозы, увеличение количества муравьиной кислоты в инкубационных смесях прекращалось к 25 часам инкубации. Определение количества муравьиной кислоты в пробах, взятых в более поздние сроки, показало, что сверх-окисления исследуемых нами полисахаридов не наблюдалось. Поэтому в своих основных исследованиях, посвященных определению единицы цепи гликогенов печени кроликов, пораженных карциномой Броуна-Пирс, с параллельным определением этого показателя для гликогенов печени здоровых кроликов, мы проводили инкубацию гликогенов с периодатом натрия не менее 25 часов.

В этих опытах навески исследуемых полисахаридов были уменьшены нами до 40 мг в связи с тем, что количество гликогена в печени животных, пораженных раком, резко снижается, и не всегда можно располагать большими количествами выделенного препарата полисахарида. Соответственно уменьшалась навеска гликогена в контрольном определении.

Взятые навески обоих исследуемых групп полисахаридов растворялись каждая в 2 мл предварительно прокипяченного 3% раствора хлористого натрия, после чего концентрация гликогена в полученных растворах определялась с помощью кислотного гидролиза, как в предыдущих сериях исследования.

Из оставшегося в каждой пробирке исходного раствора гликогена по 1 мл его переносилось в бюксы с плотно закрывающимися крышками, куда добавлялось по 1 мл 0,35-молярного раствора периодата натрия, параллельно ставился контроль без гликогена, и смеси помещались в рефрижератор, где инкубировались в темноте при температуре $4-6^{\circ}\text{C}$ в течение 25 часов. По истечении этого срока к каждой инкубационной смеси добавлялось по 3-4 капли этилен-гликоля для разрушения избытка периодата натрия и через час после этого путем титрования 0,01-нормальным раствором гидрата окиси натрия в присутствии индикатора, представляющего собой смесь метилрота и метиленовой сини, определялось количество муравьиной кислоты, образовавшейся при периодатном окислении исследуемых полисахаридов.

Как указывалось выше, при периодатном окислении сильно разветвленных полисахаридов, каковыми являются гликогены, количеством муравьиной кислоты, образовавшейся из редуцирующих глюкозных остатков, пренебрегают, и считают число молей

выделившейся муравьиной кислоты равным числу нередуцирующих концевых глюкозных остатков. Поэтому величину единицы цепи можно рассчитать по следующей формуле: $N = \frac{a}{162} : B$, где a — количество гликогена в 1 мл раствора, 162 — эквивалентный вес глюкозного остатка, B — число эквивалентов образовавшейся муравьиной кислоты.

Описанным методом мы определили величину единицы цепи для всех препаратов гликогенов, исследованных ранее методом получения абсорбционных кривых соединений этих гликогенов с йодом и путем расщепляемости их бета-амилазой.

Единица цепи гликогенов, выделенных из печени кроликов, пораженных карциномой Броуна-Пирс, в основной массе исследованных препаратов колебалась от 13,2 до 18,2. Эта же величина, определяемая параллельно для препаратов гликогенов печени здоровых контрольных животных, колебалась от 14,6 до 20,9. При сравнении этих данных трудно было прийти к определенному суждению во влиянии развивающегося в организме злокачественного новообразования на изучаемый нами показатель, поскольку обнаруживаемая тенденция к снижению единицы цепи у гликогенов печени кроликов больных раком могла оказаться и случайной. В связи с этим возникла необходимость в статистической обработке полученных результатов. Для этого для обеих групп исследуемых препаратов мы нашли среднюю арифметическую (M), среднее квадратическое отклонение (σ), среднюю ошибку (m), затем вычислили критерий достоверности (t), по которому определили вероятность различия изучаемого признака (p). Полученные при статистической обработке данные приводятся в таблице № 14.

Таблица № 14

Сравнительные данные статистических индексов средних величин единицы цепи, полученных для гликогенов печени здоровых кроликов и пораженных карциномой Броуна-Пирс

Препараты гликогенов печени кроликов	Статистические индексы				
	M	$\pm \sigma$	$\pm m$	t	P
здоровых	17,8	1,21	0,23	4,706	< 0,001
раковых	16,2	1,37	0,25		

Из приведенных результатов статистической обработки полученного материала следует, что в показателях единицы цепи, найденных при сравнении препаратов гликогенов, выделенных из печени здоровых и раковых кроликов, имеют место достоверные различия. Эти данные указывают на то, что при развитии в организме животного злокачественного новообразования в печени его синтезируются гликогены с меньшей единицей цепи, чем в норме. Следовательно, степень ветвления гликогенов печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс больше, чем степень ветвления гликогенов печени здоровых животных того же вида, причем в ряде случаев эти величины для обеих исследуемых групп гликогенов совпадают, а найденные различия в изучаемом показателе хотя и достоверны, но очень малы. Это послужило предпосылкой к тому, чтобы положение об уменьшении единицы цепи и об увеличении степени ветвления гликогенов печени животных, больных раком, к которому мы пришли на основании своих исследований, проверить с помощью другого вариационно-статистического метода, использованного

нами в предыдущих главах работы. Также, как указывалось выше, были высчитаны вариации и накопленные частоты для найденных классов, после чего были построены кумуляты для этих величин, характеризующих единицу цепи препаратов гликогенов, выделенных из печени здоровых и раковых животных.

Полученные данные представлены в таблице № 15, а вычерченные кумуляты на рис. 17.

Таблица № 15.

Результаты статистической обработки данных, характеризующих среднюю величину единицы цепи гликогенов печени здоровых кроликов и пораженных карциномой Броуна-Пирс

Препараты гликогенов печени кроликов	Вариация : Накоплен- ная час- тота	К л а с с ы					
		I	2	3	4	5	6
здоровых	<i>W</i>	15,1	15,7	17,3	17,9	19,5	20,6
	<i>f_n</i>	1	4	11	24	26	27
раковых	<i>W</i>	13,6	14,5	15,4	16,3	17,4	18,1
	<i>f_n</i>	2	3	10	19	24	29

Обработка полученного материала этим методом вариационно-статистического анализа, как и ранее примененным методом, вновь указывает на различия в изучаемом нами показателе, поскольку кумулята, построенная по данным обработки результатов единицы цепи гликогенов печени раковых животных не совмещается с соответствующей кумулятой, полученной для гликогенов печени здоровых контрольных животных. Из приведенного графика видно, что кумулята, характеризующая распределение изучаемого признака

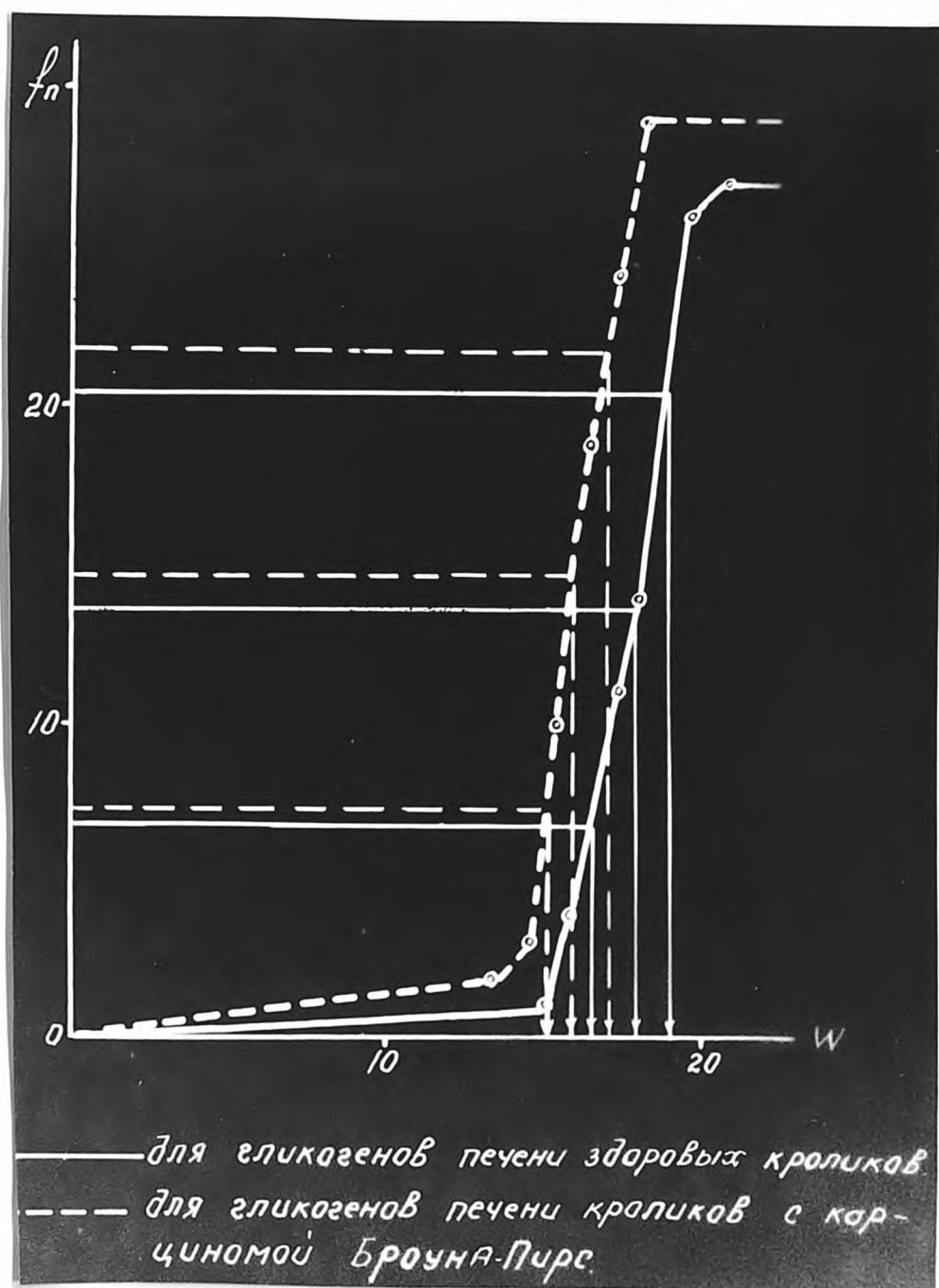


Рис.17. Кумуляты величин, характеризующих единицу цепи гликогенов печени здоровых кроликов и с карциномой Броуна-Пирса.

для гликогенов печени раковых животных, располагается ближе к оси ординат, чем подобная кривая, отражающая распределение данного признака в норме. Следовательно, единица цепи гликогенов, синтезируемых в печени кроликов с привитой карциномой Броуна-Пирс, характеризуется меньшими цифрами, чем единица цепи гликогенов печени здоровых кроликов. За это же говорит и анализ полученных кривых с помощью квартилей, методика изучения которых была подробно описана ранее. Данные, полученные при анализе кривых этим методом, приводятся в таблице № 16.

Таблица № 16

Значения различных квартилей, найденные для величин единицы цепи гликогенов печени здоровых кроликов и пораженных карциномой Броуна-Пирс

Препараты : гликогенов : печени : кроликов :	К в а р т и л и		
	Первый	Второй (медиана)	Третий
здоровых	16,4	17,8	18,8
раковых	15,0	15,8	17,0

Таким образом, различные методы вариационно-статистического анализа, использованные нами при обработке данных, полученных при изучении единицы цепи интересующих нас полисахаридов, позволяют нам прийти к определенному заключению о том, что при развитии в организме животного злокачественного новообразования в печени, как правило, синтезируются гликогены с меньшей единицей цепи, чем в норме, а следовательно они имеют большую степень ветвления, чем гликогены, печени здоровых животных

Исключение в этом отношении представляли два препарата гликогена, выделенные из печени животных с привитой карциномой Броуна-Пирс, имевшие необычно большую величину единицы цепи, значительно превышающую таковую всех исследованных препаратов гликогенов, полученных из печени как здоровых, так и раковых животных. Для одного из описываемых препаратов величина единицы цепи была найдена равной 39,7, а для другого она равнялась 61,8. Оба эти препарата имели соответственно малую степень ветвления, что было подтверждено в дальнейшем и другими методами исследования, о которых речь пойдет ниже. Оба аномальных препарата гликогена были выделены из печени кроликов, забитых на 6-й день развития карциномы Броуна-Пирс, что периодически делалось нами в порядке контрольного эксперимента с целью проверки степени развития опухолевого процесса, когда имело место падение веса животных, однако опухолевых разрастаний пальпировать еще не удавалось. При вскрытии обоих животных, забитых в разное время, на сальнике, в области желудка и селезенки были обнаружены незначительные опухолевые разрастания, а также уплотнение и некоторое увеличение яичек вследствие прорастания их опухолевой тканью. Со стороны других органов видимых отклонений от нормы обнаружено не было. Тем не менее, гликогены, выделенные из печени этих животных, оказались явно аномальными, резко отличающимися от всех других препаратов гликогенов.

Полагая, что возможно это связано со сроком развития опухолевого процесса, мы решили исследовать динамику изменения величины единицы цепи гликогенов печени в связи с развитием злокачественного новообразования в организме животного. С этой целью кролики с привитой карциномой Броуна-Пирс забивались нами

начиная с третьего дня после перевивки опухолевого штамма, во все последующие дни развития опухолевого процесса до тех пор, пока из печени животных удавалось выделить гликоген в количествах, достаточных для определения изучаемого показателя. Это дало возможность определить единицу цепи гликогенов печени кроликов в течение 14 дней развития опухолевого процесса в организме, с исследованием в каждый день опыта от 6 до 9-ти препаратов гликогенов, в результате чего всего было проанализировано 90 гликогенов. Параллельно проводился контроль, где определялась единица цепи гликогенов, выделенных из печени здоровых кроликов.

Определив единицу цепи такого большого количества препаратов гликогенов, мы ни в одном случае не встретили таких больших величин единицы цепи, какие имели место у двух ранее описанных препаратов гликогенов. Следовательно, аномалия строения их ни в какой мере не была связана со сроком развития опухолевого процесса в организме.

Полученные нами данные указывают на то, что величина единицы цепи гликогенов, выделенных как из печени здоровых, так и раковых кроликов колеблется в незначительных пределах, что можно видеть из приводимой таблицы № 17, включающей в себя часть полученного нами материала, который в пределах каждого исследуемого срока был достаточно однотипным, что и послужило для нас поводом к тому, чтобы исключить из таблицы повторяющиеся показатели.

Имея незначительные колебания, величина единицы цепи несколько изменяется в зависимости от срока развития злокачественного новообразования, однако изменения эти так малы, что не представляется возможным сразу решить вопрос о влиянии прогрессирующего заболевания на изучаемый нами показатель.

Таблица № 17

Сравнительные данные величин единицы цепи
различных препаратов гликогенов в динамике
развития опухоли

Препараты : Срок развития карциномы Броуна-Пирс в днях				
гликогенов :—				
печени :	3-5 :	6-8 :	9-11 :	12-14
кроликов :				
раковых	17,6	15,9	15,1	15,4
	18,1	17,9	16,7	15,9
	17,6	16,2	15,8	15,5
	18,0	15,5	16,5	15,6
	15,9	15,8	14,2	15,8
	16,1	16,8	16,2	15,1
здоровых (контроль)	18,1	19,7	17,5	18,1
	17,7	17,9	19,1	20,9
	18,9	18,6	18,1	17,8
	17,2	16,9	17,9	17,9
	18,5	17,9	18,0	19,7
	18,4	17,5	18,4	18,6

Однако статистическая обработка всех полученных результатов дает возможность проследить динамику изменения изучаемого нами показателя в зависимости от срока развития карциномы Броуна-Пирс в организме кролика. Данные статистической обработки всех результатов этой серии опытов представлены в таблице № 18.

Приведенные данные указывают на то, что в первые 3-5 дней развития карциномы Броуна-Пирс, несмотря на то, что количество гликогена в печени кролика в этот период заметно падает и средняя величина единицы цепи несколько понижена по сравнению

Таблица № 18

Сравнительные данные статистических индексов средних величин единицы цепи гликогенов печени в динамике развития карциномы Броуна-Пирс

Препараты : Статисти- гликогенов : ческие печени : индексы кроликов :		Срок развития карциномы Броуна-Пирс в днях			
		3-5	6-8	9-11	12-14
раковых	M	17,2	16,3	15,7	15,5
	$\pm \sigma$	0,62	0,88	0,95	0,29
	$\pm m$	0,39	0,36	0,38	0,11
здоровых (контроль)	M	18,1	18,1	18,2	18,8
	$\pm \sigma$	0,96	0,96	0,53	1,23
	$\pm m$	0,25	0,39	0,21	0,50
Показатели достовер- ности раз- личий	t	1,03	3,46	5,95	55,0
	P	> 0,2	< 0,01	< 0,001	< 0,001

с нормой, достоверных различий в величинах единицы цепи обеих изучаемых групп препаратов гликогенов не наблюдается, что свидетельствует об отсутствии структурных особенностей в гликогенах, синтезируемых в печени животных в первые дни развития опухолевого процесса.

Однако в последующие дни заболевания постепенно поражающего организм животного начинают обнаруживаться изменения в структуре гликогенов, на что указывает определенное уменьшение величины единицы цепи, а следовательно увеличение степени ветвления изучаемых полисахаридов по сравнению с гликогенами, выделенными из печени здоровых кроликов. Эти различия начинают появляться с 6-8 дня развития опухолевого процесса, постепенно увеличиваясь по мере прогрессирования болезни, за что убедительно

говорят данные вариационно-статистического анализа, где критерий достоверности различий изучаемых показателей поуклонно растет по мере увеличения срока заболевания. Следовательно, бурное развитие опухолевой болезни, быстро и интенсивно поражающей организм животного, приводит не только к резкому уменьшению количества гликогена в печени, но и к изменению качества синтезируемого в ней гликогена, который становится более ветвистым, более компактным, чем у здоровых животных.

Таким образом, дополнительные исследования, проведенные по изучению единицы цепи гликогенов, выделенных из печени кроликов на разных этапах развития опухолевой болезни, подтверждают ранее высказанное положение о том, что при развитии в организме злокачественного новообразования в печени больного животного как правило синтезируются гликогены с меньшей единицей цепи, а следовательно с большей степенью ветвления, чем в норме. Установлено также, что указанные изменения в структуре изучаемых полисахаридов обнаруживаются не сразу после перевивки опухолевого штамма, а лишь тогда, когда в организме появляются вполне сформированные опухолевые разрастания, приводящие, по-видимому, к таким нарушениям обмена веществ, которые обеспечивают синтез более разветвленных, более компактных молекул гликогена в печени, чем в норме.

Образование в некоторых случаях аномальных гликогенов, характеризующихся резко выраженными особенностями структуры, также свидетельствуют о нарушении процессов, обеспечивающих синтез гликогенов в печени животных, пораженных злокачественным новообразованием.

4. ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ ВЕЛИЧИН, ХАРАКТЕРИЗУЮЩИХ ДЛИНУ НАРУЖНЫХ И ВНУТРЕННИХ ВЕТВЕЙ МОЛЕКУЛ ГЛИКОГЕНА ПЕЧЕНИ КРОЛИКОВ, ПОРАЖЕННЫХ КАРЦИНОМОЙ БРОУНА-ПИРС

Большой интерес, проявляемый к исследованию молекулярной структуры полисахаридов, привел к разработке способов определения длины наружных и внутренних цепей этих соединений, при которых, сочетая данные энзиматических исследований с результатами, полученными при метилировании или периодатном окислении полисахаридов, оказалось возможным рассчитать среднее количество глюкозных остатков, содержащихся в периферических и в центральных цепях сильно разветвленных молекул гликогена.

При этом под наружными ветвями полисахаридов понимали цепи глюкозных остатков, лежащие к периферии от последних наружных точек ветвления, а под внутренними ветвями — цепи глюкозных остатков, расположенные между точками ветвления в молекуле полисахарида.

Определяя среднюю длину как наружных, так и внутренних ветвей гликогенов, исходя из данных о единице цепи и о степени расщепляемости их бета-амилазой, большинство исследователей показало в своих экспериментах, что в многократно разветвленной молекуле этих полисахаридов наружные ветви, как правило, длиннее внутренних (*W. Haworth, E. Hirst, F. Usherwood, 1937; D. Bell, D. Manners, 1951, 1952; B. Yellingworth, J. Larner, J. Cozi, 1952; Б.Н. Степаненко, Е.М. Афанасьева, 1953; Б.Н. Степаненко, А.С. Кайнова, А.Н. Петрова, 1954; Е.Е. Гончарова, 1957 и др.*), и только в двух препаратах гликогенов, полученных синтетическим путем, внутренние ветви оказались более длинными по сравнению с наружными (*А.С. Кайнова, 1953*). Эти данные позволили еще более детально характеризовать структуру гликогенов,

которая, как показали эти исследования, не является строго постоянной. Вместе с тем в литературе не представлены данные о длине наружных и внутренних ветвей гликогенов, синтезируемых в органах животных, пораженных злокачественными новообразованиями, что несомненно представляет интерес в свете тех данных, которые были получены нами в предыдущих исследованиях. Поэтому применив схему расчетов, использованную в работе Б.Н.Степаненко и Е.М.Афанасьевой (1953), мы рассчитали среднюю длину наружных и внутренних ветвей гликогенов печени, выделенных из печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс и соответствующих контрольных препаратов гликогенов, для которых ранее нами была определена величина единицы цепи и процент расщепляемости их бета-амилазой.

Как указывалось выше, бета-амилаза способна отщеплять молекулы мальтозы только от наружных ветвей полисахарида, осуществляя свое ферментативное действие лишь до α -1,6-связей, представляющих собой точки ветвления в молекуле полисахарида. Поскольку этот фермент не обладает способностью расщеплять связи ветвления, величина, характеризующая расщепляемость того или иного полисахарида бета-амилазой, будет показывать какая часть всех глюкозных остатков, образующих молекулу полисахарида, находится во внешних ветвях его молекулы. Вместе с тем величина единицы цепи показывает сколько глюкозных остатков приходится на каждый концевой глюкозный остаток в разветвленной молекуле полисахарида. Следовательно, если при полном расщеплении исследуемого гликогена бета-амилазой было найдено, что отщепилось 43,6% общего количества глюкозных остатков, то на 100 глюкозных остатков, имеющих в молекуле данного полисахарида, 43,6 глюкозных остатков падает на наружные ветви его. Если при этом

единица цепи гликогена соответствовала 17,9, то из общего количества глюкозных остатков, приходящихся на каждый концевой нерециркулирующий глюкозный остаток, 7,8 глюкозных остатков будет падать на наружную часть цепи, располагающуюся до точки ветвления

$$\left(\frac{17,9 \cdot 43,6}{100} = 7,8 \right).$$

Если при этом еще учесть, что при действии на полисахарид бета-амилазы у точек ветвления остается один или два неотщепленных глюкозных остатка, принадлежащих внешнему участку цепи (что в среднем дает 1,5), то вся наружная цепь исследуемого полисахарида будет состоять из 9,3 глюкозных остатков

$$(7,8 + 1,5).$$

Средняя длина внутренних ветвей вычисляется путем вычитания из значения единицы цепи величины, характеризующей длину наружной цепи, после прибавления к ней 1, т.е. одного глюкозного остатка, представляющего точку ветвления. Следовательно, средняя длина внутренней цепи полисахарида, показанного в нашем примере, будет соответствовать $17,9 - 10,3 = 7,6$ глюкозных остатков.

Вышеописанным способом мы рассчитали среднюю длину наружных и внутренних ветвей гликогенов печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс и соответствующих препаратов гликогенов, выделенных из печени здоровых животных.

Полученные данные приводятся в таблице № 19.

Как и в предыдущих главах работы, мы не включили в таблицу однозначные данные, характеризующие длину наружных и внутренних ветвей молекул гликогенов печени здоровых и раковых кроликов, исключение которых в том и другом случае не меняет имеющейся закономерности, тем более, что статистической обработке в дальнейшем подвергались результаты всех проведенных исследований.

Таблица № 19

Сравнительные данные, характеризующие расщепляемость бета-амилазой, величину единицы цепи, среднюю длину наружных и внутренних ветвей гликогенов печени здоровых кроликов и с карциномой Броуна-Пирс

Препараты гликогенов печени кроликов							
здоровых				раковых			
% расщепл. бета-амилазой	Единица цепи	Средняя длина ветвей		% расщепл. бета-амилазой	Единица цепи	Средняя длина ветвей	
		наруж.	внутр.			наруж.	внутр.
45,9	17,9	9,7	7,2	43,1	17,6	9,1	7,5
41,0	17,5	8,9	7,6	41,0	17,6	8,7	7,9
44,0	17,8	9,3	7,5	34,8	16,1	7,1	8,0
44,0	18,4	9,6	7,8	38,6	17,6	8,3	8,3
42,8	17,9	9,2	7,7	38,2	15,9	7,6	7,3
41,0	19,1	9,3	8,8	38,7	17,9	8,4	8,5
40,1	16,5	8,1	7,4	28,5	16,2	6,1	9,1
41,6	17,9	9,0	7,9	36,4	16,5	7,5	8,0
47,1	16,9	9,4	6,5	30,2	17,2	6,7	9,5
45,1	18,6	9,0	8,6	42,5	15,9	8,2	6,7
43,6	17,2	9,3	7,6	37,2	16,7	7,7	8,0
42,8	16,8	8,7	7,1	35,0	16,5	7,3	8,2
46,5	18,5	10,1	7,4	33,4	13,2	5,9	6,3
41,9	17,2	8,7	7,5	36,5	14,2	6,7	6,5
43,0	17,7	9,1	7,6	32,0	15,8	6,5	8,3

Рассматривая полученные данные, можно видеть, что гликогены, выделенные из печени здоровых кроликов, имеют более длинные наружные ветви по сравнению с внутренними, причем это закономерно повторяется во всех случаях исследованных нами препаратов. При изучении гликогенов, извлеченных из печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс, нельзя отметить такой закономерности, поскольку здесь имеет место различное соотношение между длиной

наружных и внутренних ветвей: в одних исследованных препаратах наружные ветви длиннее внутренних, в других — они имеют одинаковую длину, в третьих — внутренние ветви характеризуются большей длиной, чем наружные.

Если при анализе гликогенов печени здоровых кроликов обнаруживаются определенные различия в длине наружных и внутренних ветвей, подтверждаемые статистически, то при аналогичной обработке данных, характеризующих длину наружных и внутренних ветвей в гликогенах печени раковых животных, достоверных различий не обнаруживается.

Сказанное вытекает из данных вариационно-статистического анализа, приведенных в таблице № 20.

Таблица № 20

Сравнительные данные статистических индексов, характеризующих длину наружных и внутренних ветвей гликогенов печени здоровых кроликов и с карциномой Броуна-Нирс

Препараты гликогенов печени кроликов	Длина ветвей	Статистические индексы				
		M	$\pm \sigma$	$\pm m$	t	P
здоровых	Наружных	9,1	0,73	0,14	7,000	<0,001
	внутренних	7,7	0,76	0,14		
раковых	наружных	7,5	1,11	0,21	0,111	>0,5
	внутренних	7,8	0,95	0,17		

Эти данные во всей очевидности показывают, что изучаемые нами группы полисахаридов в значительной степени отличаются друг от друга по соотношению в их молекулах длин наружных и внутренних ветвей. Следовательно, при развитии в организме

злокачественного новообразования происходит нарушение ферментативных процессов, осуществляющих синтез гликогенов в печени, что приводит к изменению структуры этих полисахаридов.

Обнаружив определенные структурные отличия в пределах каждой группы интересующих нас гликогенов, мы решили провести более глубокий сравнительный анализ изучаемых нами показателей для гликогенов, выделенных из печени здоровых и раковых животных.

Доказав ранее статистически достоверные отличия в длине наружных и внутренних ветвей в молекулах гликогенов печени здоровых кроликов и не обнаружив таковых для молекул гликогенов печени раковых кроликов, мы проверили далее имеются ли различия в длине наружных и внутренних ветвей при сравнении гликогенов печени здоровых кроликов и пораженных карциномой Броуна-Пирс.

Данные вариационно-статистического анализа, проведенного в таком аспекте приводятся в таблице № 21.

Таблица № 21

Сравнительные данные статистических индексов, характеризующих гликогены печени здоровых кроликов и с карциномой Броуна-Пирс по длине наружных и внутренних ветвей

Средняя длина ветвей	:Препараты : :гликогенов: :печени :кроликов	Статистические индексы				
		\bar{m}	$\pm \sigma$	$\pm m$	t	P
наружных	здоровых	9,1	0,73	0,14	6,400	<0,001
	раковых	7,5	1,11	0,21		
внутренних	здоровых	7,7	0,76	0,14	0,455	>0,5
	раковых	7,8	0,95	0,17		

Из приведенных данных следует, что гликогены, выделенные из печени здоровых и раковых животных, отличаются друг от друга по длине наружных ветвей, в то время, как в длине внутренних ветвей при сравнении этих двух групп полисахаридов существенных отличий не обнаруживается. Сопоставляя эти данные с результатами вариационно-статистического анализа, проведенного при сравнении длин наружных и внутренних ветвей в пределах каждой отдельной группы исследуемых полисахаридов, можно прийти к выводу, что наружные ветви гликогенов печени раковых кроликов короче, чем в норме. Их длина, по-видимому, приближается к длине внутренних ветвей молекул, в результате чего не обнаруживается существенных отличий в этих показателях как при сравнении величин, характеризующих длину наружных и внутренних ветвей гликогенов раковых животных, так и при сравнении длин внутренних ветвей гликогенов, выделенных из печени здоровых и раковых животных.

Для проверки высказанного предположения мы обработали полученный материал другим методом вариационно-статистического анализа, примененным нами в предыдущих главах работы, с помощью которого наглядно иллюстрируется распределение изучаемых показателей в виде кумулянт. Здесь, также как ранее, нами были определены вариации и накопленные частоты для предварительно найденных классов, после чего были построены кумулянты для этих величин, характеризующих длину наружных и внутренних ветвей препаратов гликогенов, выделенных из печени здоровых кроликов и пораженных карциномой Броуна-Пирс.

Полученные данные приводятся в таблице № 22, а вычерченные кумулянты представлены на рисунках 18 и 19.

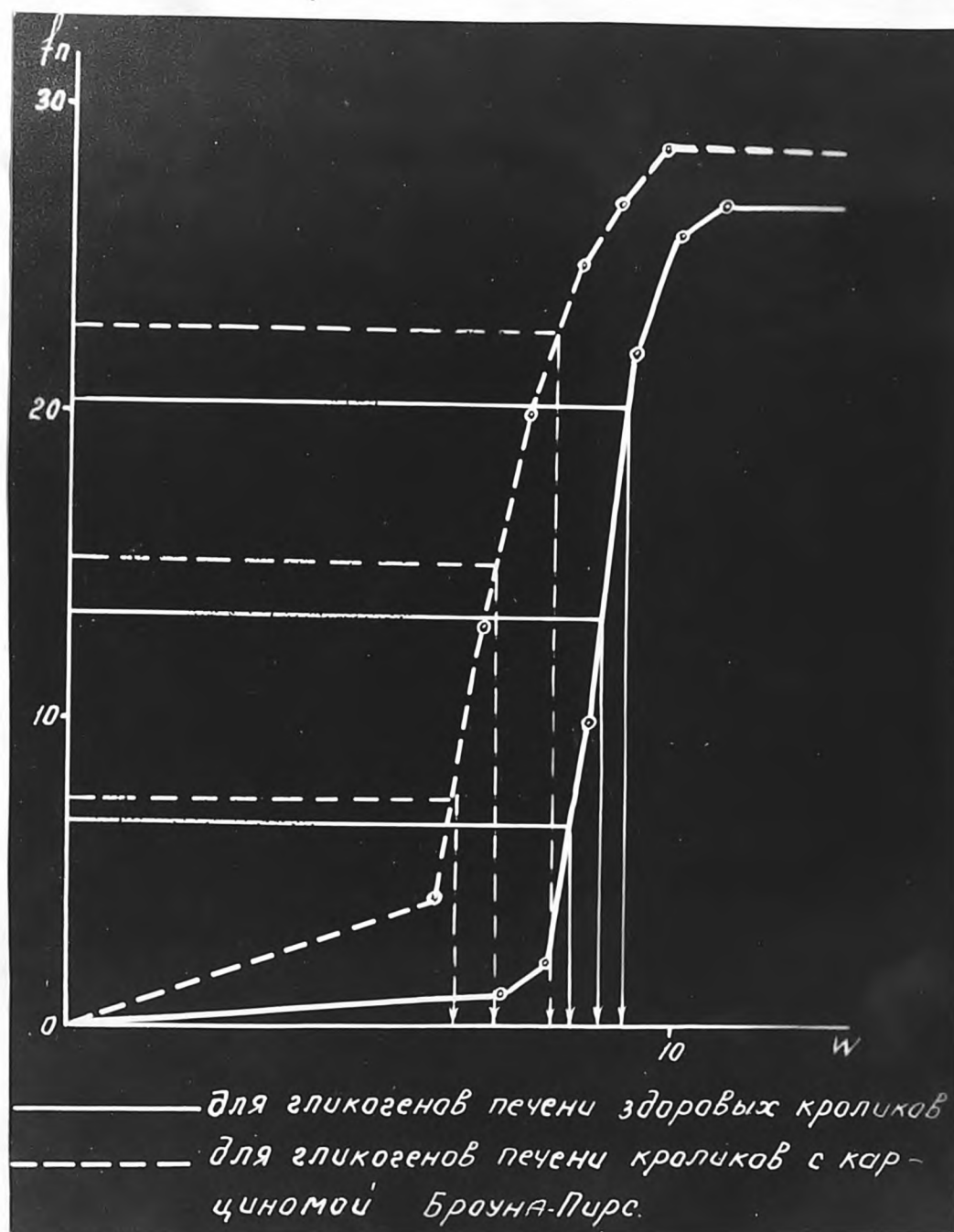


Рис. 18. Кумуляты величин средней длины наружных ветвей молекул гликогенов печени здоровых кроликов и с карциномой Броуна-Пирса.

Результаты вариационно-статистического анализа данных, характеризующих длину наружных и внутренних ветвей гликогенов печени здоровых кроликов и с карциномой Броуна-Пирс

Средняя длина ветвей	:Препараты :гликогенов: :печени :кроликов	:Вариация : :накоплен- :ная час- :тота	К л а с с ы					
			: 1	: 2	: 3	: 4	: 5	: 6
наружных	здоровых	<i>w</i>	7,2	7,9	8,6	9,3	10,0	10,7
		<i>f_n</i>	1	2	10	22	26	27
	раковых	<i>w</i>	6,1	6,8	7,6	8,4	9,1	9,8
		<i>f_n</i>	4	13	20	25	27	29
внутрен- них	здоровых	<i>w</i>	6,3	6,8	7,3	7,8	8,3	8,8
		<i>f_n</i>	3	4	10	19	22	27
	раковых	<i>w</i>	6,6	7,3	8,0	8,7	9,4	10,1
		<i>f_n</i>	7	13	22	25	28	29

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что мы правы в своем предположении об относительном укорочении наружных ветвей в молекулах печеночных гликогенов раковых животных. За это со всей очевидностью говорит взаимное расположение кумулят, построенных по данным обработки результатов длины наружных ветвей гликогенов, выделенных из печени здоровых кроликов и пораженных карциномой Броуна-Пирс. Кумулята, отражающая изучаемый показатель для гликогенов печени раковых животных, располагается ближе к оси ординат, чем соответствующая кривая для гликогенов печени здоровых кроликов. Следовательно, длина наружных ветвей гликогенов печени раковых кроликов, характеризуется меньшими

цифрами, чем эта величина, определяемая в норме. За это же говорит и анализ полученных кривых, произведенный с помощью квартилей.

Полученные при этом данные приводятся в таблице № 23.

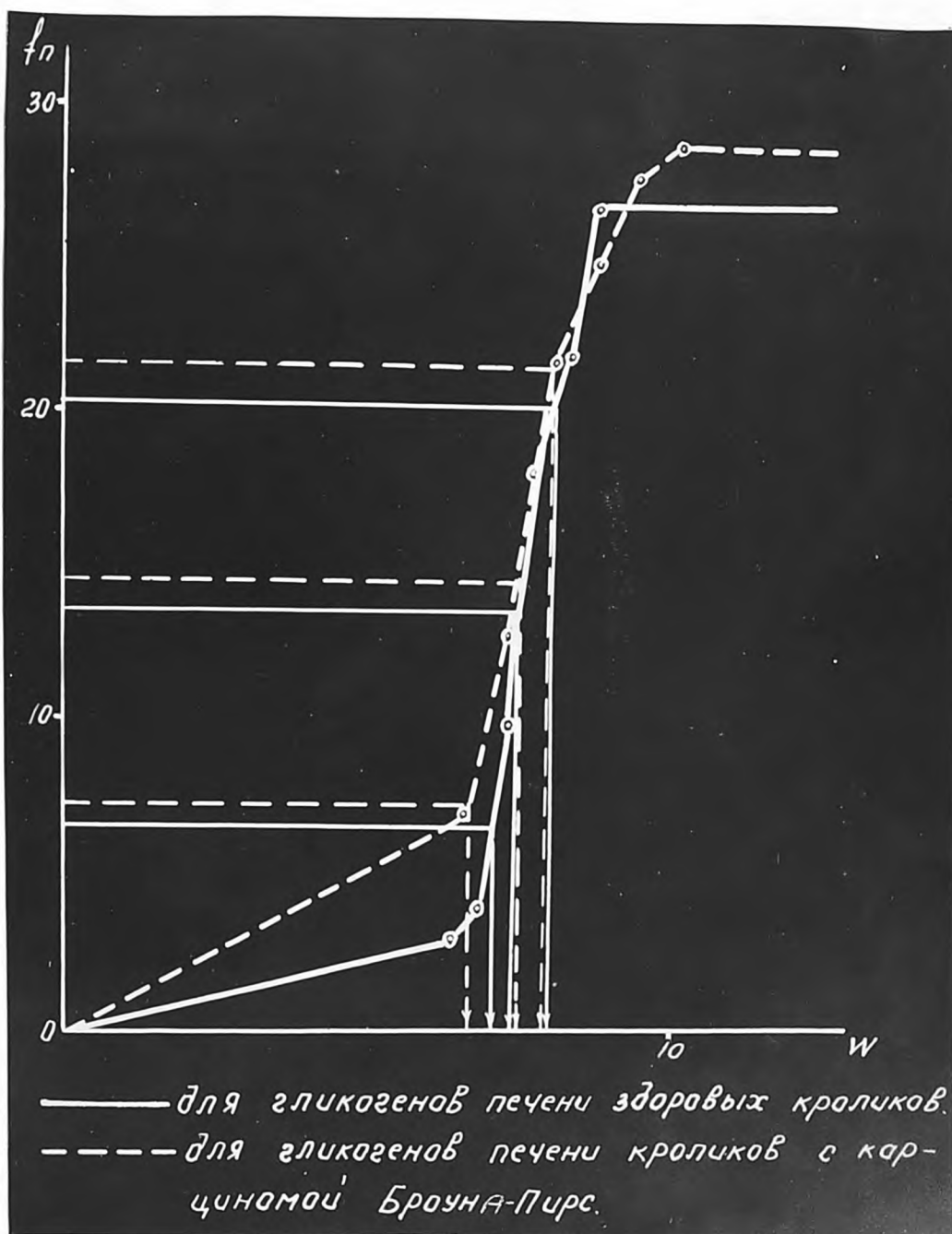
Таблица № 23

Данные, характеризующие квартили, соответствующие величинам длин наружных ветвей гликогенов печени здоровых кроликов и с карциномой Броуна-Пирс

Препараты гликогенов печени кроликов	К в а р т и л и		
	Первый	Второй (медиана)	Третий
здоровых	8,4	8,8	9,2
раковых	6,4	7,1	8,4

Представленные данные еще раз подтверждают справедливость нашего заключения о том, что наружные ветви молекул гликогенов печени раковых кроликов короче, чем наружные ветви гликогенов печени здоровых животных того же вида.

Наряду с этим, как видно из графика, представленного на рис.19, кумуляты, отражающие результаты полученных данных для внутренних ветвей обоих изучаемых нами групп полисахаридов, практически сливаются одна с другой, что указывает на отсутствие существенных различий в исследуемом нами показателе. Об этом же свидетельствует количественный анализ этих кривых, проведенный с помощью квартилей, где данные вариаций, соответствующие каждому квартилю той и другой кривой практически совпадают, что видно из приводимой ниже таблицы № 24.



Ри. 19. Кумуляты величин средней длины внутренних ветвей молекул гликогенов печени здоровых кроликов и с карциномой Броуна-Пирса.

Таблица № 24

Данные, характеризующие квартили, соответствующие величинам длин внутренних ветвей гликогенов печени здоровых кроликов и с карциномой Броуна-Пирс

Препараты гликогенов печени кроликов	К в а р т и л и		
	Первый	Второй (медиана)	Третий
здоровых	7,0	7,5	8,0
раковых	6,8	7,4	8,0

Следовательно, обработка материала совершенно иным методом вариационно-статистического анализа вновь приводит нас к ранее высказанному положению о том, что при развитии в организме злокачественного новообразования в печени больного животного синтезируются гликогены с более короткими наружными ветвями, чем в норме.

К такому же заключению мы пришли, анализируя результаты ранее проведенных экспериментов, посвященных изучению абсорбционных кривых соединений гликогенов с йодом и динамики процесса бета-амилолиза исследуемых нами групп полисахаридов. Следовательно, факт укорочения наружных ветвей гликогенов, синтезируемых в печени животных, пораженных карциномой Броуна-Пирс, можно считать доказанным. Что касается длины внутренних ветвей этих полисахаридов, то ни одним из использованных методов нам не удалось найти каких-либо существенных отличий при сравнении их с длиной внутренних ветвей гликогенов печени здоровых животных. Надо полагать, что при развитии в организме злокачественного новообразования, когда значительно увеличивается потребность в углеводах, в первую очередь идет использование наружных ветвей полисахаридов, что и ведет, по-видимому, к их укорочению.

Относительным уменьшением длины наружных ветвей в молекулах полисахаридов объясняется и найденное нами равенство длины наружных и внутренних ветвей, а также относительно большая длина внутренних ветвей по сравнению с наружными в ряде препаратов гликогенов, выделенных из печени раковых кроликов, чего не наблюдалось ни в одном случае исследования гликогенов печени здоровых животных.

Все вышеизложенное указывает на то, что развитие в организме кролика карциномы Броуна-Пирс приводит к изменению процессов синтеза и распада гликогена в печени, следствием чего является появление некоторых структурных особенностей в молекулах образующегося полисахарида. Не исключена возможность, что при этом изменяется и характер связей между глюкозными остатками, входящими в полисахарид, что мы попытались выяснить в наших дальнейших исследованиях.

5. ИЗУЧЕНИЕ ТИПА СВЯЗЕЙ МЕЖДУ ГЛЮКОЗНЫМИ ОСТАТКАМИ В МОЛЕКУЛАХ ГЛИКОГЕНА ПЕЧЕНИ КРОЛИКОВ С КАРЦИНОМой БРОУНА-ПЕРС

Основным типом связи между глюкозными остатками, образующими полисахарид, является α -1,4-глюкозидная связь, наряду с которой в местах ветвления полисахаридной молекулы имеются также α -1,6-глюкозидные связи, что было доказано с помощью химического, ферментатического и хроматографического методов исследования (W. Haworth, E. Hirst, 1936; W. Haworth, E. Hirst, F. Ysherwood, 1937; M. Swanson, C. Cori, 1948; M. Wolfson, A. O'Neil, 1949; В.Л. Розенфельд, 1958 и др.). Наряду с α -1,4 и α -1,6-связями в полисахаридах в небольших количествах обнаружены также α -1,2 и α -1,3-связи (D. Bell, 1948; V. Barry, F. Haesall, E. Hirst, J. Jones, 1949; J. Gibbons, R. Boissonais, 1950; M. Wolfson, A. Thompson, 1957 и др.). Это свидетельствует о том, что структура гликогена, возможно, значительно сложнее, чем она представляется нам в настоящее время.

Тип связей между глюкозными остатками в полисахаридах проще всего определить, пользуясь методом периодатного окисления, если учитывать число молей поглощенного периодата натрия и число молей выделившейся муравьиной кислоты на моль глюкозных остатков.

Определение типа связей в полисахаридах периодатным методом основано на наблюдении, установившем, что при периодатном окислении глюкозных остатков, соединенных α -1,6-связью, поглощается два моля периодата и выделяется один моль муравьиной кислоты на моль глюкозных остатков, поскольку количество α -1,6-связей в полисахаридах практически соответствует количеству редуцируемых концевых глюкозных остатков в его молекуле.

При окислении же моля глюкозных остатков, соединенных α -1,4-связью, поглощается один моль периодата, но муравьиная кислота при этом не выделяется, так как при этом разрывается лишь связь между третьим и четвертым углеродными атомами в глюкозе с образованием альдегидных групп. Глюкозные остатки, соединенные α -1,3-связью вообще не окисляются периодатом. Следовательно, определяя количество периодата, идущее на окисление полисахарида, и учитывая количество образовавшейся при этом муравьиной кислоты, можно рассчитать содержание α -1,4, α -1,6 и прочих связей в исследуемом полисахариде. (*J. Rankin, A. Jeanes, 1954; Е. Л. Розенфельд, 1958*).

Нас интересовал вопрос имеются ли какие-либо различия в типе связей между глюкозными остатками в гликогенах, выделенных из печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс, по сравнению с гликогенами печени здоровых животных того же вида.

Для выяснения этого вопроса мы проанализировали, определяя тип связей периодатным методом, 37 препаратов гликогенов печени животных, пораженных злокачественным новообразованием, и 40 препаратов гликогенов, выделенных из печени здоровых контрольных животных.

Для этого навески гликогенов, порядка 20 мг, сделанные из препаратов, выделенных из печени обеих исследуемых групп животных, помещались в большие биксы с хорошо притертыми крышками, где растворялись в 10 мл предварительно прокипяченной дистиллированной воды. После полного растворения исследуемых гликогенов, 0,1 мл каждого полученного раствора с помощью микропипетки переносилась в узкие пробирки, закрывающиеся стеклянными пробками, в 3,5 мл предварительно налитой дистиллированной воды.

Затем в пробирки добавлялось по 1,5 мл 2-нормальной серной кислоты и они помещались на кипящую водяную баню на три часа. После охлаждения и нейтрализации растворов, в последних по методу Хагедорна-Ненсена определялось количество образовавшейся при гидролизе гликогена глюкозы, концентрация которой рассчитывалась в миллиграммах на миллилитр раствора.

К оставшимся в бюксах растворам исследуемых гликогенов добавлялось по 10 мл 0,0374-молярного раствора периодата натрия, параллельно ставился контроль без гликогена, и все смеси помещались в термостат, где инкубировались в темноте в течение 72-х часов при температуре 25°C.

Определение количества образовавшейся при окислении гликогенов муравьиной кислоты производилось нами по методу Халсал, Хирст и Джонса (*J. Halsall, E. Hirst, J. Jones*, 1947) в модификации Ранкина и Джинса (*J. Rankin, A. Jeanes*, 1954) путем титрования этой кислоты раствором гидрата окиси бария, после разрушения избытка периодата натрия этиленгликолем.

Определение количества поглощенного при окислении гликогенов периодата натрия мы производили, пользуясь методом Флери и Ланге (*P. Fleury, J. Lange*, 1933), который позволяет определить содержание периодата натрия с помощью восстановления его мышьяковистокислым натрием и определения избытка мышьяковистокислого натрия путем титрования раствором йода.

Для определения муравьиной кислоты вышеуказанным методом 10 мл каждой инкубационной смеси, в том числе и контрольной, переносилось в колбочки с хорошо закрывающимися пробками, предварительно заполненные азотом. Затем в каждую колбочку вносилось по 0,3 мл этиленгликоля для разрушения избытка периодата натрия.

В момент внесения в колбочки растворов в каждую из них направлялась струя азота, после чего пробки плотно закрывались, и колбочки оставлялись стоять в темноте в течение часа. Затем в атмосфере азота производилось определение количества муравьиной кислоты в каждой пробе путем титрования 0,01-нормальным раствором гидрата окиси бария в присутствии индикатора фенолфталеина.

По данным титрования опытной и контрольной пробы, зная количество глюкозы, образовавшейся при гидролизе гликогена, содержащегося в 1 мл исследуемого раствора, рассчитывалось число молей муравьиной кислоты, выделившееся при окислении гликогена, на каждый моль глюкозных остатков. Если, например, на титрование опытной пробы было израсходовано 0,82 мл 0,01-нормального раствора гидрата окиси бария, а на титрование контрольной пробы пошло 0,30 мл 0,01-нормального раствора гидрата окиси бария, и при этом в 1 мл инкубационной смеси было найдено 1,092 мг глюкозы, входившей в гликоген, то при этих условиях число молей муравьиной кислоты, приходящееся на каждый моль глюкозных остатков гликогена может быть рассчитано следующим образом:

$$\frac{(0,82 - 0,30) \cdot 0,01 \cdot 180}{1000 \cdot 10 \cdot 0,001092} = 0,08$$

Для определения периода натрия, поглощенного при окислении исследуемых гликогенов, опытные и контрольные инкубационные смеси отмеривались по 5 мл каждая и переносились в колбочки для титрования, куда добавлялось по 10 мл насыщенного раствора бикарбоната натрия, после чего немедленно вносилось по 5 мл 0,1-нормального раствора мышьяковистокислого натрия. Затем колбочки помещались в темноту, где стояли в течение 15 минут.

После этого в каждую колбочку прибавлялось по 1 мл 20% раствора йодистого калия и производилось титрование 0,1-нормальным раствором йода в присутствии крахмала. По данным титрования опытной и контрольной пробы определялся избыток мышьяковистокислого натрия, не использованного на восстановление периодата натрия в этих пробах. Затем по разности результатов титрования опытной и контрольной инкубационных смесей, указывающей количество израсходованного при реакции мышьяковистокислого натрия, рассчитывалась концентрация периодата натрия, поглощенного при периодатном окислении гликогена; при этом учитывалось, что 1 мл 0,1-нормального раствора мышьяковистокислого натрия соответствует 0,010696 г периодата натрия.

Если, например, на титрование опытной пробы было израсходовано 4,02 мл 0,1-нормального раствора йода, а на титрование контрольной пробы пошло 3,38 мл 0,1-нормального раствора йода, при этом в 1 мл инкубационной смеси содержалось 1,092 мг глюкозы, входившей в гликоген, то при этих условиях, число молей периодата натрия, поглощенных при периодатном окислении гликогена, на каждый моль глюкозных остатков рассчитывается следующим образом:

$$\frac{0,010696 (4,02 - 3,38) : 180}{5 : 0,001092 \cdot 214} = 1,05$$

Зная количество молей периодата натрия, поглощенного при окислении гликогена, и число молей, выделившейся при этом муравьиной кислоты, в расчете на каждый моль глюкозных остатков, можно вычислить процентное содержание тех или иных связей в молекуле исследуемого полисахарида.

Муравьиная кислота при периодатном окислении полисахаридов выделяется в основном за счет концевых нередуцирующих глюкозных

остатков, количество которых практически соответствует числу связей ветвления в молекуле полисахарида (т.е. числу α -1,6-связей). Поэтому процентное содержание α -1,6-связей в исследуемых гликогенах рассчитывается путем умножения на 100 числа, показывающего сколько молей муравьиной кислоты выделяется при периодатном окислении на каждый моль гликозных остатков.

При окислении периодатом натрия гликозных остатков, образующих цепи полисахарида, имеющие α -1,4-связи, на каждый моль гликозных остатков поглощается один моль периодата натрия, в результате чего разрываются связи между третьим и четвертым углеродными атомами, но муравьиная кислота при этом не выделяется, и только при окислении единственного концевых редуцирующего гликозного остатка происходит выделение двух молекул муравьиной кислоты, которые при реакции будут соответствовать эквивалентное количество периодата натрия. Поэтому при расчете процентного содержания α -1,4-связей в молекуле гликогена из числа молей периодата натрия, поглощенного при окислении, вычитается количество периодата натрия, эквивалентное двум молям муравьиной кислоты, после чего полученная величина умножается на 100.

Процентное содержание прочих связей в исследуемом гликогене определяется путем вычитания из 100 числа, представляющего собой сумму процентного содержания α -1,4 - и α -1,6-связей в данном полисахарида.

Учитывая все сказанное, для полисахарида, приведенного нами выше в качестве примера, количество α -1,6-связей будет соответствовать $0,08 \cdot 100 = 8\%$, количество α -1,4-связей будет равно $(1,05 - 0,16) \cdot 100 = 89\%$, следовательно, на прочие связи, возможно, имеющиеся в данном полисахарида, будет падать $100 - 97 = 3\%$.

Описанным методом мы исследовали выше упомянутые препараты гликогенов, выделенные из печени кроликов, пораженных карциномой Броуна-Пирс, при этом, как всегда, параллельно изучались контрольные препараты гликогенов, извлеченные из печени здоровых животных. Некоторые результаты этих исследований представлены в таблице № 25.

Таблица № 25

Сравнительные данные, характеризующие содержание различных связей в молекулах гликогенов печени здоровых кроликов и с карциномой Броуна-Пирс

Препараты гликогенов печени кроликов					
здоровых	раковых	здоровых	раковых	здоровых	раковых
α - 1,6-связи в %		α - 1,4-связи в %		"Прочие" связи в %	
9	10	87	85	4	5
8	8	85	83	7	9
9	8	84	86	7	6
7	9	93	83	0	8
6	8	93	77	1	15
7	8	92	87	1	5
8	6	88	88	4	6
8	8	92	86	0	6
7	12	90	65	8	23
7	15	92	65	1	20
8	13	84	70	8	17
9	11	85	86	6	3
8	8	85	62	7	30
7	9	90	85	3	6
8	8	92	84	0	8
8	8	91	73	1	19
7	8	90	86	3	6
10	9	88	84	2	7
9	10	83	82	8	8
6	10	89	78	5	12

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что содержание различных связей в молекулах исследованных нами гликогенов отличается в зависимости от группы изученных полисахаридов. Если в гликогенах печени здоровых кроликов количество α -I,6-связей колеблется от 6% до 10%, то при исследовании гликогенов печени кроликов, пораженных раком, обнаруживается более широкий диапазон колебаний в содержании этих связей, количество которых определяется в пределах от 6% до 15%. Еще более существенные различия наблюдаются в содержании α -I,4-связей в препаратах гликогенов печени здоровых и раковых животных. Если в гликогенах печени здоровых кроликов содержание указанных связей колеблется от 83% до 93%, то количество их в гликогенах печени животных с карциномой Броуна-Пирс определяется от 62% до 88%. Особенно велики различия в содержании "прочих" связей в молекулах изучаемых нами групп гликогенов печени. Если при анализе гликогенов печени здоровых кроликов их обнаруживается от 0 до 8%, то в случае исследования соответствующих препаратов печени раковых животных количество этих связей колеблется от 3 до 30%.

Однако, несмотря на указанные различия пределов колебаний в изучаемых показателях, в немалом количестве случаев процентное содержание α -I,6- и α -I,4-связей, а также "прочих" связей в молекулах как гликогенов печени здоровых, так и раковых животных совпадает. Поэтому для решения вопроса о том, не являются ли эти колебания случайными, весь материал был подвергнут статистической обработке. Для обеих групп исследуемых препаратов по всем изучаемым показателям мы нашли среднюю арифметическую (\bar{M}), среднее квадратичное отклонение (σ), ошибку разности (m), вычислили критерий достоверности (t), по которому определяли достоверность различий в каждой группе изучаемых показателей.

Полученные при этом данные приводятся в таблице № 26.

Таблица № 26

Сравнительные данные статистических индексов, характеризующих тип связей между гликозными остатками в молекулах гликогенов печени здоровых кроликов и с карциномой Броуна-Пирс

Препараты гликогенов печени кроликов	Статисти- ческие индексы	Процентное содержание в гликогенах		
		α -I,6-связей	α -I,4-связей	"Прочих" связей
здоровых	M	7,9	88,9	3,3
	$\pm \sigma$	0,94	2,85	2,58
	$\pm m$	0,14	0,45	0,46
раковых	M	9,5	78,4	12,1
	$\pm \sigma$	1,15	8,57	7,95
	$\pm m$	0,18	1,35	1,25
Достовер- ность различий	t	8,7	7,74	6,75
	P	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Результаты вариационно-статистического анализа говорят о достоверности различий в содержании α -I,6-, α -I,4- и "прочих" связей в препаратах гликогенов, полученных из печени здоровых кроликов - с одной стороны и из печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс - с другой.

Убедившись в достоверности этих различий, мы решили выяснить степень и величину их с помощью другого метода вариационной статистики, примененного нами ранее в предыдущих разделах работы. Результаты, полученные для каждого изучаемого показателя

в обеих группах интересующих нас полисахаридов, были разбиты на классы, затем были найдены их вариации, накопленные частоты и построены соответствующие кумулянты.

Данные, полученные при обработке материала этим способом, представлены в таблице № 27, а кумулянты изображены на рисунках 20-22.

Таблица № 27

Результаты вариационно-статистического анализа данных, характеризующих содержание различных связей в молекулах гликогенов печени здоровых кроликов и с карциномой Броуна-Пирс

Тип связей	Препараты гликогенов: печени кроликов	Вариации : Накоплен- ные частоты	К л а с с ы					
			I	2	3	4	5	6
α-1,6- связи	здоровых	W	6,2	7,1	8,3	9,2	-	-
		f _n	3	12	26	40	-	-
	раковых	W	7,6	9,7	12,5	14,6	-	-
		f _n	12	33	37	38	-	-
α-1,4- связи	здоровых	W	83,8	85,5	87,2	88,9	90,6	92,3
		f _n	4	9	14	21	32	40
	раковых	W	54,9	60,9	66,9	72,9	78,9	84,9
		f _n	1	2	3	7	23	38
"прочие" связи	здоровых	W	0,6	2,0	3,4	4,8	6,2	7,6
		f _n	14	17	26	31	34	40
	раковых	W	5,2	9,7	14,2	18,7	23,2	27,7
		f _n	10	22	31	34	36	38

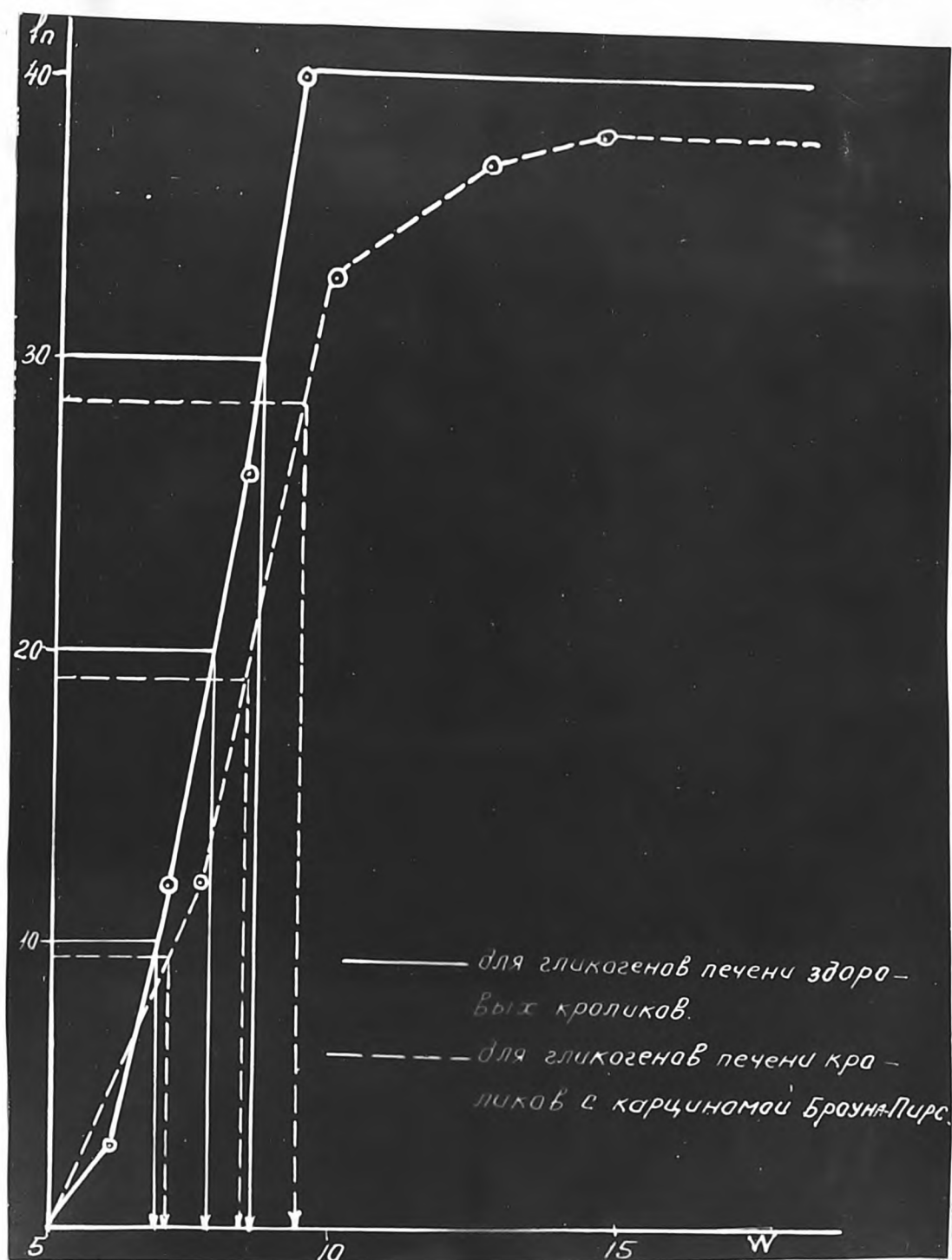


Рис.20. Кумуляты величин, характеризующих процентное содержание α -1,6-связей в молекулах гликогенов печени здоровых кроликов и с карциномой Броуна - Пирс.

Кумуляты, вычерченные по представленным в таблице данным, ни в одном случае не сливаются одна с другой, что вновь подтверждает достоверность различий в содержании α -I,6- , α -I,4- и "прочих" связей в гликогенах печени кроликов, пораженных раком, по сравнению с содержанием их в гликогенах печени здоровых животных. При анализе полученных кумулят видно, что в препаратах гликогенов печени раковых животных имеет место преобладание α -I,6-связей, поскольку кривая, отражающая результаты обработки этой группы препаратов, располагается дальше от оси ординат, чем таковая для гликогенов, выделенных из печени здоровых животных. Что касается α -I,4-связей, то здесь имеет место противоположная картина, свидетельствующая о явном уменьшении количества этих связей в гликогенах печени раковых кроликов по сравнению с соответствующими препаратами, полученными из печени здоровых контрольных животных. Уменьшение количества α -I,4-связей происходит, по-видимому, в результате появления в молекулах патологических гликогенов вместо этих связей каких-то других, следствием чего является значительное увеличение в этих препаратах "прочих" связей. Это хорошо видно на рис. 22, где кумулята, отражающая результаты обработки "прочих" связей, для гликогенов печени раковых животных сильно смещена вправо от оси ординат, а также от соответствующей кривой, вычерченной для гликогенов печени здоровых кроликов.

Количественный анализ приведенных кумулят с помощью квартилей подтверждает высказанные нами положения, о чем свидетельствуют данные, представленные в таблице № 28.

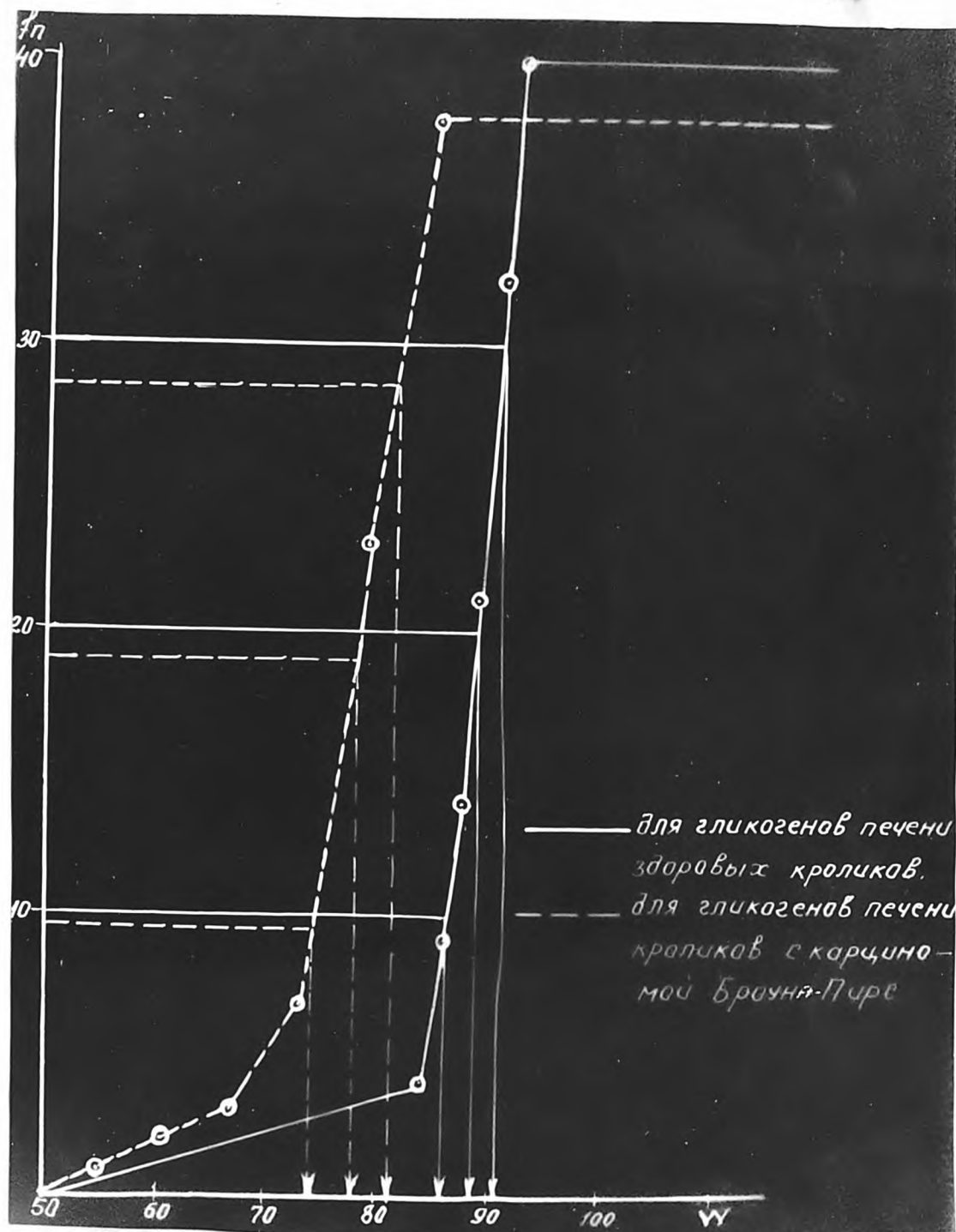


Рис.21. Кумуляты величин, характеризующих процентное содержание α -1,4-связей в молекулах гликогенов печени здоровых кроликов и с карциномой Броуна-Пирса.

Таблица № 28

Данные, характеризующие степень разнообразия признаков и квантили, соответствующие различным типам связей в молекулах гликогенов печени здоровых кроликов и с карциномой Броуна-Пирс

Тип связей	:Препараты : :гликогенов: :печени :кроликов	К в а р т и л и			: Степень : разнообразия
		: Первый	: Второй :(медиана)	: Третий	
α -I,6- связи	здоровых	6,9	7,8	8,6	1,7
	раковых	7,1	8,4	9,8	2,2
α -I,4- связи	здоровых	85,5	88,5	90,5	5,0
	раковых	74,0	77,5	81,0	7,0
"прочие" связи	здоровых	0,5	2,6	4,1	3,6
	раковых	5,0	8,6	13,0	8,0

Распределение изучаемых признаков по квантилям показывает, что процентное содержание α -I,6-связей в препаратах гликогенов печени раковых животных во всех случаях больше, чем в соответствующих препаратах печени здоровых животных. При этом, если в первом квантиле разница в изучаемом показателе для обеих групп невелика, то в последующих квантилях она закономерно возрастает. Не подлежит сомнению и различие в количестве α -I,4-связей в гликогенах печени здоровых и раковых кроликов, оно ярко выражено во всех квантилях с явным преобладанием изучаемого показателя в препаратах гликогенов печени здоровых животных. Совершенно очевидным является также факт значительного увеличения в патологических гликогенах количества "прочих" связей по сравнению с содержанием их в гликогенах печени контрольных животных, что имеет место во всех квантилях.

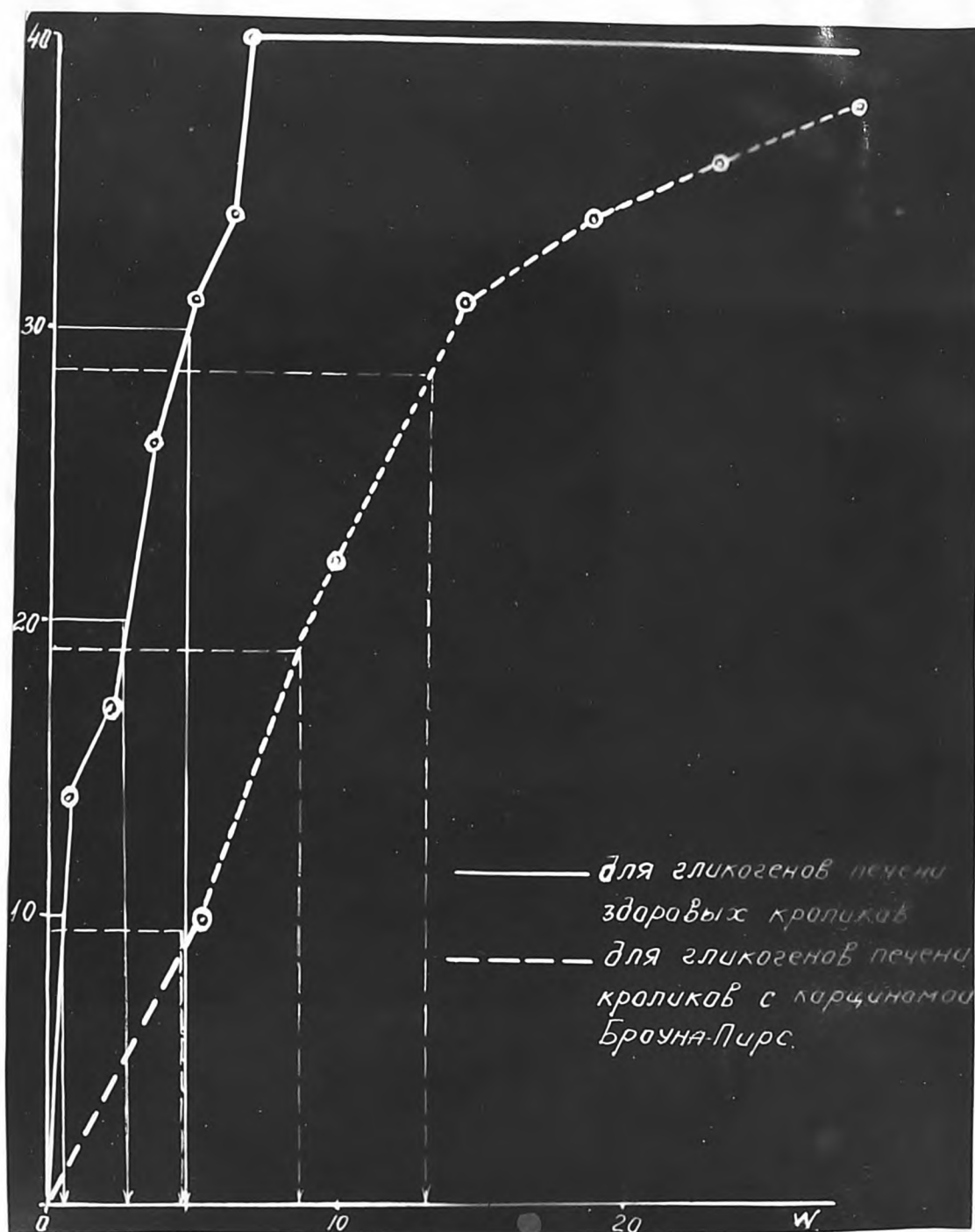


Рис. 22. Кумуляты величин, характеризующих процентное содержание всех других связей, за исключением α -1,4- и α -1,6-связей, в молекулах гликогенов печени здоровых кроликов и с карциномой Броуна-Пирса.

Найденный показатель степени разнообразия изучаемых признаков во всех случаях оказался большим для препаратов гликогенов, выделенных из печени раковых кроликов. Величина его была при определении α -I,6-связей в 1,3 раза, при определении α -I,4-связей — в 1,4 раза, при определении "прочих" связей в 2,2 раза больше, чем при определении этих же показателей в препаратах гликогенов печени здоровых кроликов. Это свидетельствует, по-видимому, о большем разнообразии в структуре гликогенов, синтезируемых в печени раковых животных, по сравнению с гликогенами печени контрольных животных, поскольку изменения в содержании тех или иных связей в молекуле полисахарида несомненно должны отражаться на его структуре.

Таким образом, не остается сомнений в том, что развитие в организме злокачественного новообразования приводит к извращению процессов синтеза гликогена в печени животного, в результате чего наблюдается не только значительное уменьшение в ней количества этого полисахарида, но и изменение его структуры.

В пользу этого говорит также изучение типа связей двух аномальных препаратов гликогенов печени раковых животных, о которых речь шла выше. В отличие от всех других патологических гликогенов, исследованных нами, два указанных препарата характеризовались очень низким содержанием α -I,6-связей, которые у одного из них составляли 0,7%, а у другого 1,0%. Наряду с этим количество α -I,4-связей характеризовалось в этих препаратах очень высокими цифрами, равными соответственно 99,6% и 99,0%.

Наличия каких-либо других связей в молекулах этих гликогенов установить не удалось. Все это вновь говорит в пользу высказанного выше предположения о значительном разнообразии в структуре

гликогенов, синтезируемых в печени раковых животных, что является вероятно, следствием извращенного обмена веществ в организме, в том числе и процессов, обеспечивающих синтез гликогена в печени. Из изложенного ясно, что найденные нами различия в структуре гликогенов печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс в сравнении с гликогенами печени здоровых животных являются очевидными, статистически достоверными. Тем не менее нам казалось полезным провести дополнительные контрольные исследования с помощью метода хроматографического анализа, который мог дать, кроме того, некоторые дополнительные данные для характеристики качественных особенностей изучаемых полисахаридов, что и было сделано нами в следующей серии опытов.

С помощью хроматографии на бумаге мы исследовали растворы гликогенов, выделенных из печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс и здоровых контрольных животных. С этой целью растворы вышеуказанных гликогенов готовились из расчета 40 мг/мл из соответствующих препаратов, предварительно доведенных до постоянного веса. Полученные растворы подвергались частичному гидролизу равным объемом 0,5-нормального раствора соляной кислоты на кипящей водяной бане в течение различного периода времени, в пределах от 5 минут до 3-х часов с промежутками между взятиями проб от 5-ти до 15-ти минут.

Гидролизаты гликогенов наносились на листы хроматографической бумаги размером 20 x 35 см, на которых линия нанесения располагалась в 6 см от края, а точки нанесения на ней были в 3 см друг от друга. В опытах была использована Ленинградская быстрая хроматографическая бумага. Гидролизаты наносились с помощью автоматических микропипеток в количестве 5 μ л, что

соответствовало 100 γ взятого препарата гликогена. В качестве свидетелей использовались растворы глюкозы, мальтозы и декстрана, предварительно гидролизованного на кипящей водяной бане в присутствии 0,5-нормального раствора соляной кислоты, в результате чего в гидролизате образовывалась изомальтоза, которая и являлась свидетелем.

После высушивания пятен, нанесенных на бумагу, листы ее помещались в камеру для нисходящей хроматографии, в кювете которой находился растворитель, состоящий из ацетона, бутанола и воды в соотношениях 7 : 2 : 1. После этого камера, предварительно уже насыщенная этим же растворителем, герметически закрывалась на 48 часов, в течение которых растворитель продвигался по бумаге на 33-35 см. По истечении двух суток хроматограммы извлекались из камеры, высушивались при комнатной температуре и проявлялись нижеописанным способом.

Предварительно готовился раствор азотнокислого серебра в ацетоне, для чего к 200 мл химически чистого ацетона прибавлялся 1 мл насыщенного раствора азотнокислого серебра. При появлении муты к раствору по каплям добавлялась вода до полного растворения осадка. В полученный таким образом прозрачный раствор азотнокислого серебра в ацетоне погружались хроматограммы, подлежащие проявлению. После извлечения из этого раствора и высушивания, они помещались в 10% спиртовой раствор гидрата окиси натрия, в результате воздействия которого на бумаге появлялись коричневые пятна, соответствующие расположению редуцирующих продуктов гидролиза гликогенов. После высушивания хроматограмм при комнатной температуре, они погружались затем в 5% раствор тиосульфата натрия, где находились до максимально возможного просветления фона, на котором находились проявленные пятна. После этого

хроматограммы тщательно промывались проточной водопроводной водой и высушивались.

Анализ полученных хроматограмм показывает, что при частичном гидролизе обеих исследуемых групп препаратов гликогенов образуется целый ряд промежуточных продуктов, что видно на приведенных хроматограммах, представленных на рис. 23 и 24.

При этом количество этих продуктов на том или ином этапе гидролиза не является одинаковым при исследовании гликогенов, выделенных из печени здоровых кроликов и пораженных раком. При количественном анализе полученных хроматограмм, проведенном с помощью денситометра, оказалось, что максимальное количество мальтозы, образующееся при гидролизе различных препаратов гликогенов печени здоровых кроликов обнаруживается через 50-55-60 минут от начала гидролиза в то время, как при гидролизе гликогенов печени раковых кроликов наибольшее количество мальтозы определяется через 30-40-50 минут гидролиза, протекающего в тех же условиях опыта. По достижении максимума в вышеуказанные сроки как в случае исследования гликогенов печени здоровых, так и раковых кроликов, количество мальтозы в гидролизате начинает уменьшаться и через 1,5 - 2,0 часа гидролиза мальтоза в них практически не обнаруживается. Одновременно с уменьшением количества мальтозы в гидролизате начинает нарастать количество изомальтозы, которое, достигнув максимума, при дальнейшем гидролизе также начинает уменьшаться. При этом максимальное количество изомальтозы при исследовании гликогенов печени здоровых кроликов обнаруживается для разных препаратов через 90-120-135 минут после начала гидролиза, а при исследовании гликогенов печени раковых кроликов наибольшее количество изомальтозы для разных препаратов определяется через

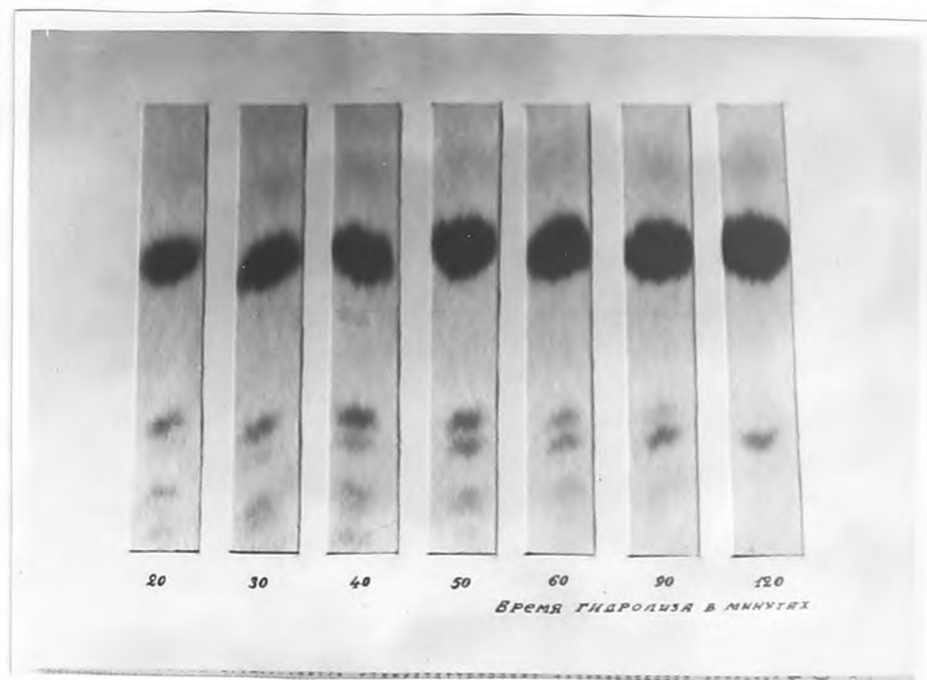


Рис. 23. Хроматограмма продуктов частичного кислотного гидролиза гликогена печени здорового кролика через 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120 минут воздействия на гликоген 0,5- нормального раствора соляной кислоты при температуре $+100^{\circ}\text{C}$.

60-90-105 минут гидролиза. Глюкоза хроматографически обнаруживается на всех этапах гидролиза как гликогенов печени здоровых, так и раковых животных. При изучении количества глюкозы, образующейся в процессе гидролиза обеих исследуемых групп полисахаридов, оказалось, что в случае кислотного гидролиза гликогенов печени раковых животных на начальных этапах процесса наблюдается более быстрое нарастание глюкозы, чем в случае гидролиза гликогенов печени здоровых кроликов. Однако, при гидролизе раковых гликогенов наблюдается более раннее торможение нарастания количества глюкозы, чем при гидролизе соответствующих препаратов гликогенов печени здоровых животных. Несмотря на более медленное нарастание количества глюкозы на начальных этапах гидролиза гликогенов печени здоровых кроликов, общее количество глюкозы, образующееся при гидролизе этих гликогенов, оказывается большим, чем в случае гидролиза раковых гликогенов. Для иллюстрации вышесказанного приводятся данные, представленные в таблице № 29.

Полученные результаты изображены графически на рисунке 25.

Анализ имеющихся материалов свидетельствует о том, что при кислотном гидролизе гликогенов печени раковых животных наблюдается большее нарастание количества глюкозы, мальтозы и изомальтозы по сравнению с таковым для соответствующих препаратов гликогенов печени здоровых животных, что имеет место на начальных этапах образования вышеуказанных продуктов. При этом мальтоза, быстрее достигая максимума, начинает быстрее и разрушаться, чем в случае гидролиза контрольных препаратов гликогенов, где нарастание мальтозы хотя и происходит медленнее, но достигает более высоких цифр. Это говорит о том, что при гидролизе патологических гликогенов имеются лучшие условия для отщепления мальтозы,

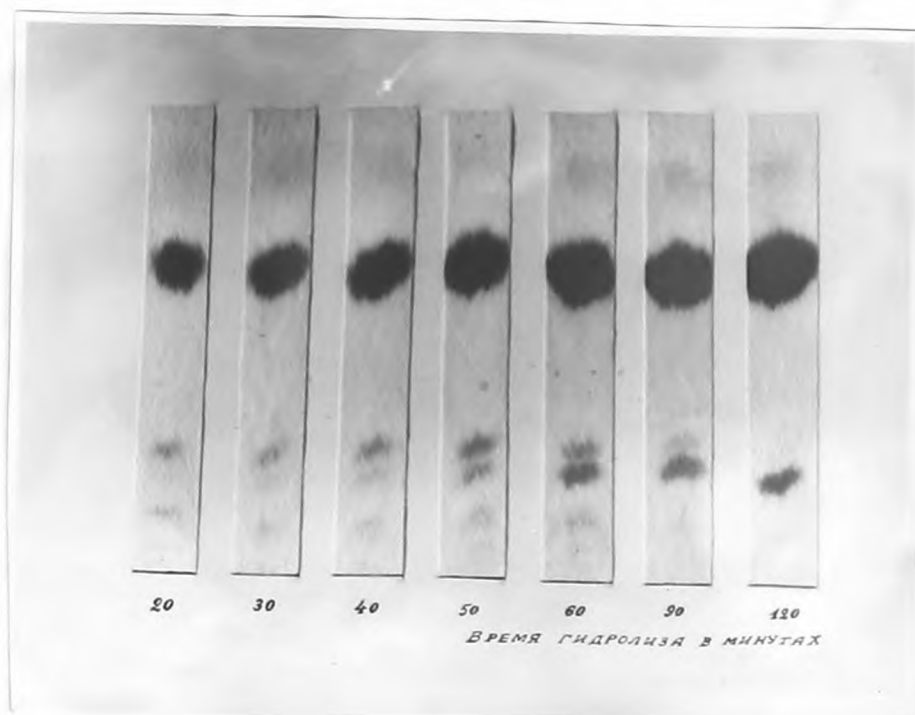


Рис. 24. Хроматограмма продуктов частичного кислотного гидролиза гликогена печени кролика с карциномой Броуна-Пирса через 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120 минут воздействия на гликоген 0,5 - нормального раствора соляной кислоты при температуре $+100^{\circ}\text{C}$.

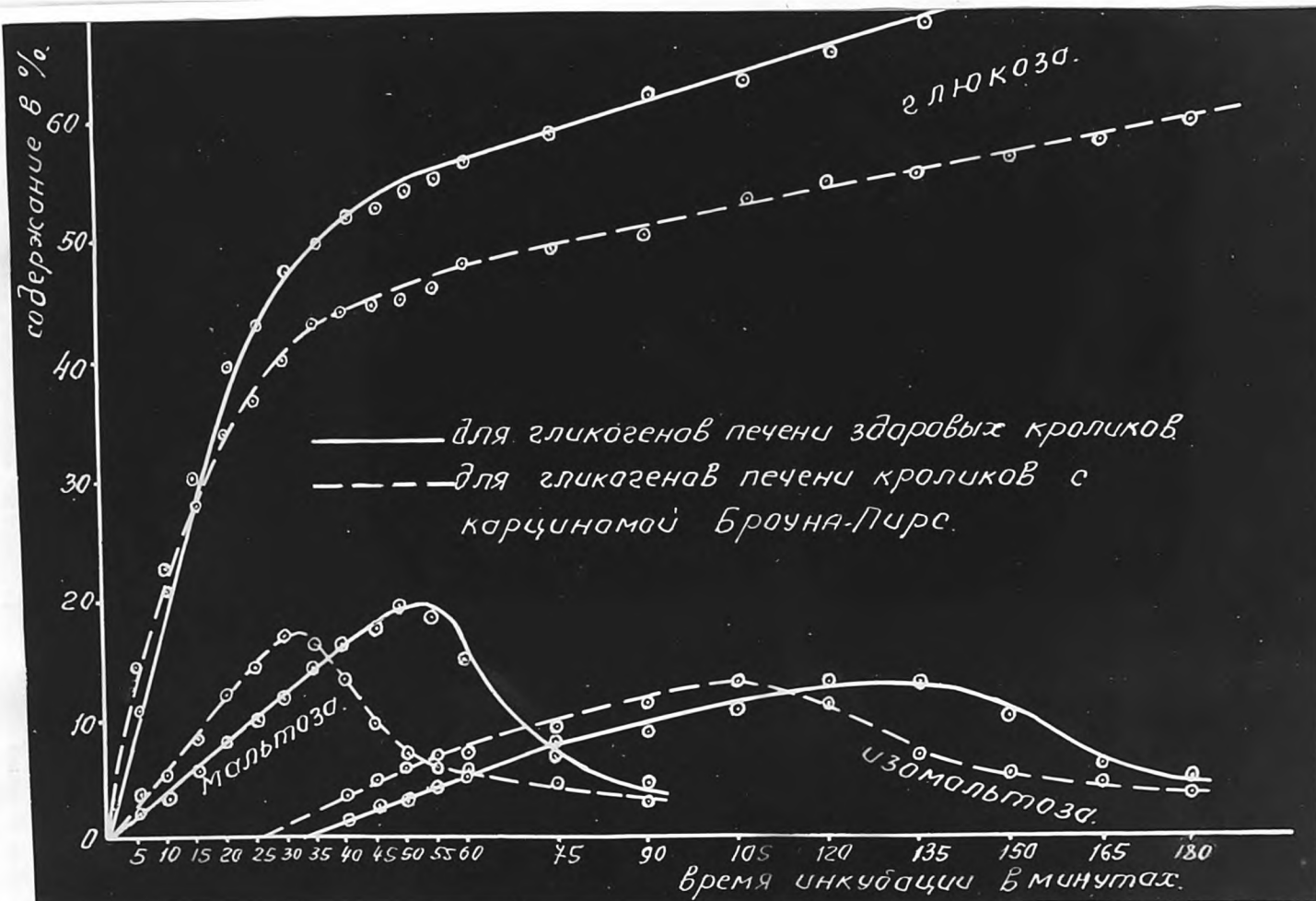


Рис. 25. Динамика содержания мальтозы, изомальтозы и глюкозы при неполном кислотном гидролизе гликогенов печени здоровых кроликов и с карциномой Броуна-Пирса.

для отщепления большого количества мальтозы со стороны концевых глюкозных остатков. Этим же, по-видимому, объясняется и более быстрое нарастание глюкозы на начальных этапах процесса в случае гидролиза раковых гликогенов при сравнении с гидролизом гликогенов печени здоровых кроликов. Но и здесь, также как в случае мальтозы, наибольшее количество глюкозы образуется при гидролизе контрольных препаратов гликогенов, несмотря на то, что процесс нарастания глюкозы идет медленнее, чем при гидролизе препаратов гликогенов, выделенных из печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс. Все это говорит в пользу положения о том, что гликогены, синтезируемые в печени животных, пораженных злокачественным новообразованием имеют более разветвленную структуру молекул и более короткие, компактно расположенные наружные ветви, чем в норме. О большей степени ветвления раковых гликогенов свидетельствуют и данные, полученные при сравнении результатов, характеризующих содержание изомальтозы в гидролизатах препаратов гликогенов печени здоровых и раковых кроликов. При гидролизе печеночных гликогенов раковых кроликов содержание изомальтозы в гидролизате нарастает быстрее, чем в случае гидролиза нормальных препаратов гликогенов; быстрее также достигается максимум содержания изомальтозы, который как правило превышает таковой, находящийся в гидролизатах гликогенов печени здоровых животных. Все это говорит о более высоком содержании α -1,6-связей в молекулах гликогенов, синтезируемых в печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс, по сравнению с гликогенами печени здоровых кроликов, что было показано ранее и химическими методами исследования.

Хроматографический анализ двух аномальных препаратов гликогенов печени раковых кроликов свидетельствует о более медленном образовании мальтозы и глюкозы в процессе их гидролиза.

и о незначительном содержании изомальтозы.

Таким образом в основной своей массе в печени животных, пораженных злокачественным новообразованием, синтезируются гликогены более разветвленные, чем в норме, о чем свидетельствует более высокое содержание в них α -1,6-связей, которые являются связями ветвления в молекуле полисахарида. Об увеличении степени ветвления печеночных гликогенов раковых животных говорит и уменьшение величины единицы цепи их по сравнению с гликогенами печени контрольных животных, что было показано нами выше. Наряду с более высокой степенью ветвления и некоторым укорочением наружных ветвей, доказанным раньше, молекулы гликогенов, синтезируемых в печени раковых животных, обладают еще более существенными особенностями строения, что выражается в изменении соотношения различных связей, соединяющих глюкозные остатки в молекуле полисахарида. И только в двух случаях гликогены, синтезированные в печени животных, пораженных раком, имели малоразветвленные молекулы с длинными наружными и внутренними ветвями, с очень большой единицей цепи, что также говорит о нарушении процессов синтеза гликогена в печени животных, пораженных злокачественным новообразованием.

6. ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГЛИКОГЕНОВ ПЕЧЕНИ ЗДОРОВЫХ КРОЛИКОВ И ПОРАЖЕННЫХ КАРЦИНОМОЙ БРОУНА-ПИРС

Изучая структурные особенности гликогенов, образованных в печени, при развитии в организме злокачественного новообразования, мы решили провести электронно-микроскопическое исследование интересующего нас соединения, поскольку согласно литературным данным молекулы гликогена имеют форму близкую к сферической с диаметром 100 \AA и более, что находится в пределах разрешающей способности имевшегося в нашем распоряжении электронного микроскопа типа ЭМ-7.

Поскольку в литературе мы не встретили работ, посвященных обсуждению результатов электронно-микроскопического исследования гликогенов, выделенных из органов животных в виде препаратов, необходимо было разработать методику их изучения, что было сделано нами на гликогенах печени здоровых половозрелых кроликов-самцов, содержащихся на полноценном пищевом рационе и в одинаковых условиях с кроликами, пораженными карциномой Броуна-Пирс, препараты гликогенов печени которых в дальнейшем исследовались параллельно. Чистота выделенных препаратов контролировалась путем определения содержания в них азота и фосфора, при этом в опыт брались лишь те, которые по этим показателям определялись как химически чистые. Предварительные исследования показали, что наилучшими концентрациями для нанесения на формваровые пленки и последующего просмотра препаратов является концентрация раствора гликогена, колеблющаяся в пределах от 5 мг % до 20 мг %.

Растворы всегда готовились на предварительно прокипяченной бидистиллированной воде и для лучшего растворения

гликогенов помещались в термостат с температурой $+60^{\circ}\text{C}$, что вместе с тем исключало прорастание какой-либо микрофлоры в течение всего срока опыта. Во всех случаях концентрация растворов гликогенов, выделенных из печени здоровых животных, точно соответствовала концентрации растворов гликогенов, полученных из печени кроликов с карциномой Бруна-Пирс. При этом, как и во всех предыдущих исследованиях, всегда обращал на себя внимание тот факт, что растворы, приготовленные из гликогенов печени больных раком животных, являлись более мутными, чем растворы соответствующих концентраций, полученные из гликогенов печени здоровых животных. Это обстоятельство послужило для нас основанием к тому, чтобы перед началом электронно-микроскопического исследования интересующих нас растворов попытаться уточнить этот факт с помощью нефелометрического метода исследования, поскольку мутность растворов зависит от величин частиц и степени дисперсности полисахарида в растворе.

С этой целью готовились растворы гликогенов, выделенных из печени здоровых кроликов и больных раком, из расчета 20 мг/мл. Концентрация растворов в каждом случае исследования уточнялась с помощью кислотного гидролиза по методике, описанной в предыдущих главах работы. После этого полученные растворы исследовались с помощью нефелометра модели "НОМ". При этом мутность определялась как отношение яркости испытуемой рассеивающей среды к яркости "идеального рассеивателя", под которым понимается поверхность, имеющая коэффициент отражения, равный единице, и подчиняющаяся закону Ламберта. Исследования проводились в прямоугольной микрокювете с зеленым светофильтром К-4, имеющим эффективную длину волны светопропускания 500 $\text{m}\mu$.

Отсчет показаний производился по черной шкале левого барабана при неизменном положении правого. Мутность исследуемых растворов определялась по формуле $M = M_э \frac{n_э}{n}$, где $M_э$ — мутность эталонной призмы, равная в нашем приборе величине $3,1 \cdot 10^{-2} \text{ см}^{-1}$; $n_э$ — отсчет по шкале для эталонной призмы; n — отсчет по шкале для исследуемого мутного раствора. Вышеупомянутые отсчеты по шкале ($n_э$ и n) представляют собой соответствующие величины светопропускания, которые показывают отношение площади диафрагмы при данном раскрытии к площади максимального ее раскрытия в процентах.

Наряду с определением мутности растворов устанавливалась их оптическая плотность, которая представляет собой отрицательный логарифм величины светопропускания, взятый при основании 10.

Соответствующие данные, полученные для растворов гликогенов, выделенных из печени здоровых и раковых животных, приводятся в таблице № 30.

Из приведенных данных следует, что оптическая плотность растворов, приготовленных из гликогенов печени здоровых кроликов, имеющих концентрацию 20 мг/мл, колебалась от 0,40 до 0,80, что в среднем соответствует 0,56. Оптическая плотность растворов, приготовленных из гликогенов печени животных, пораженных карциномой Броуна-Пирс, имеющих ту же концентрацию, колебалась от 0,66 до 1,26, что в среднем соответствует 0,95. При сравнении полученных результатов без всякой дополнительной обработки ясно, что оптическая плотность растворов гликогенов печени раковых животных в среднем в 1,7 раза больше, чем оптическая плотность соответствующих растворов гликогенов печени здоровых животных того же вида.

Таблица № 30

Данные, характеризующие оптическую плотность и мутность растворов гликогенов печени здоровых кроликов и с карциномой Броуна-Пирс

Препараты гликогенов печени кроликов			
здоровых		раковых	
Оптическая плотность	Мутность в см ⁻¹	Оптическая плотность	Мутность в см ⁻¹
0,40	2,2 10 ⁻²	0,92	7,4 10 ⁻²
0,52	2,9 10 ⁻²	0,82	5,9 10 ⁻²
0,45	2,5 10 ⁻²	0,89	6,9 10 ⁻²
0,68	4,2 10 ⁻²	0,85	6,4 10 ⁻²
0,57	3,2 10 ⁻²	0,66	4,1 10 ⁻²
0,58	3,3 10 ⁻²	0,90	7,1 10 ⁻²
0,61	3,6 10 ⁻²	0,74	4,9 10 ⁻²
0,45	2,5 10 ⁻²	0,80	5,6 10 ⁻²
0,80	5,6 10 ⁻²	0,82	5,9 10 ⁻²
0,58	3,4 10 ⁻²	0,80	5,6 10 ⁻²
0,77	5,3 10 ⁻²	1,05	9,9 10 ⁻²
0,42	2,3 10 ⁻²	1,26	16,3 10 ⁻²
0,57	3,2 10 ⁻²	0,96	8,1 10 ⁻²
0,62	3,7 10 ⁻²	1,12	11,9 10 ⁻²
0,44	2,4 10 ⁻²	0,92	7,4 10 ⁻²
0,57	3,2 10 ⁻²	1,22	14,9 10 ⁻²
0,45	2,5 10 ⁻²	1,07	10,5 10 ⁻²
0,52	2,9 10 ⁻²	1,05	9,9 10 ⁻²
0,64	3,9 10 ⁻²	1,19	13,8 10 ⁻²
0,58	3,4 10 ⁻²	1,02	9,3 10 ⁻²
Ср. 0,56	3,3 10 ⁻²	0,95	8,6 10 ⁻²

Следовательно, растворы гликогенов печени животных с карциномой Броуна-Пирс обладают и значительно более высокой мутностью по сравнению с растворами, приготовленными из гликогенов печени здоровых кроликов. Если мутность растворов гликогенов печени здоровых животных характеризуется средней величиной $3,3 \cdot 10^{-2} \text{ см}^{-1}$ с индивидуальными колебаниями от $2,2 \cdot 10^{-2} \text{ см}^{-1}$ до $5,6 \cdot 10^{-2} \text{ см}^{-1}$, то мутность растворов гликогенов, выделенных из печени животных с карциномой Броуна-Пирс выражается средней цифрой $8,6 \cdot 10^{-2} \text{ см}^{-1}$ с колебаниями для различных препаратов от $4,1 \cdot 10^{-2} \text{ см}^{-1}$ до $16,3 \cdot 10^{-2} \text{ см}^{-1}$.

Таким образом, мутность растворов гликогенов печени животных, пораженных злокачественным новообразованием, более, чем в 2,5 раза превышает мутность соответствующих растворов гликогенов, выделенных из печени здоровых кроликов. Это обстоятельство, несомненно, указывает на какие-то различия в величине частиц или структуре молекул гликогенов, синтезируемых в печени различных исследуемых нами групп животных — здоровых и пораженных карциномой Броуна-Пирс. Интересно было выяснить каковы же эти отличия, что мы попытались сделать с помощью электронной микроскопии. Для этого полученные растворы гликогенов наносились на формваровые подложки, получаемые путем растекания капли формвара на поверхности воды и последующим снятием получаемой пленки на сетчатые пластинки, изготовленные из тонкой медной фольги.

Для нанесения исследуемого раствора на подложку были опробованы различные способы, начиная от нанесения капли с помощью микропипетки и кончая аэрозольными распылителями.

При этом микропипетки давали слишком большие капли, а применение аэрозольных распылителей могло привести к нарушению агрегатного состояния исследуемого объекта, поэтому после ряда экспериментов наиболее удобным был признан метод нанесения капли раствора гликогена с помощью конца тонкой стерильной проволоочки из платины или никрома. При этом размер нанесенной капли варьировал от 0,1 мл до 2,0 мл в зависимости от целей предстоящего эксперимента.

Исследования, проведенные в процессе разработки метода на гликогенах печени здоровых кроликов, показали, что при растворении этого полисахарида в воде даже при тщательном механическом перемешивании получаемого раствора не происходит полного растворения гликогена, несмотря на кажущуюся однородность полученного опалесцирующего раствора. Об этом свидетельствует тот факт, что при электронной микроскопии таких растворов в течение первых 2-3 часов после начала растворения обнаружилось наличие очень контрастных частиц разных размеров самой неопределенной формы, равномерно распределяющихся по всему полю наблюдения (рис. 26).

После суточной инкубации растворов гликогенов при температуре $+60^{\circ}\text{C}$ наблюдаемая картина резко менялась. В поле зрения микроскопа обнаруживалась равномерная малоконтрастная зернистость, на фоне которой располагались крупные конгломераты, имеющие неправильную, разнообразно изогнутую форму и неоднородную структуру, состоящую из более мелких округлых образований (рис. 27).

Вместе с тем преимущественно по краю капли нанесенного раствора мы наблюдали образования с хорошо выраженными прямыми

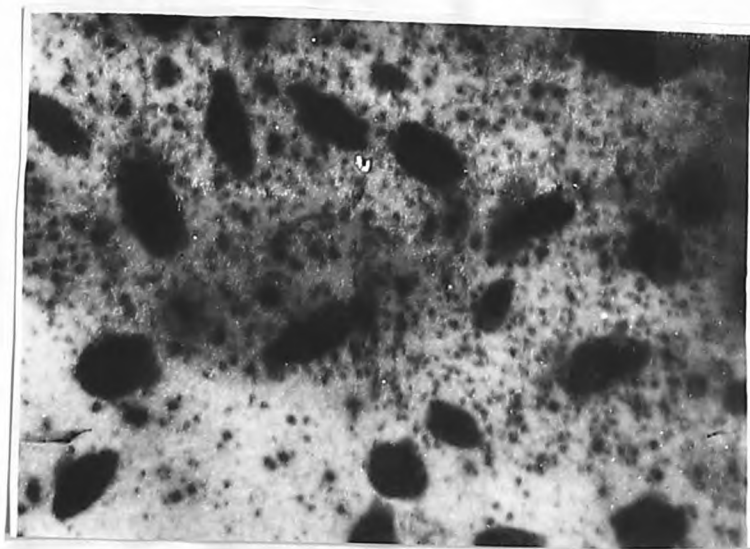


Рис. 26. Электронномикроскопическая фотография раствора гликогена печени здорового кролика через 2 часа после начала растворения. Увеличение $\times 15,000$

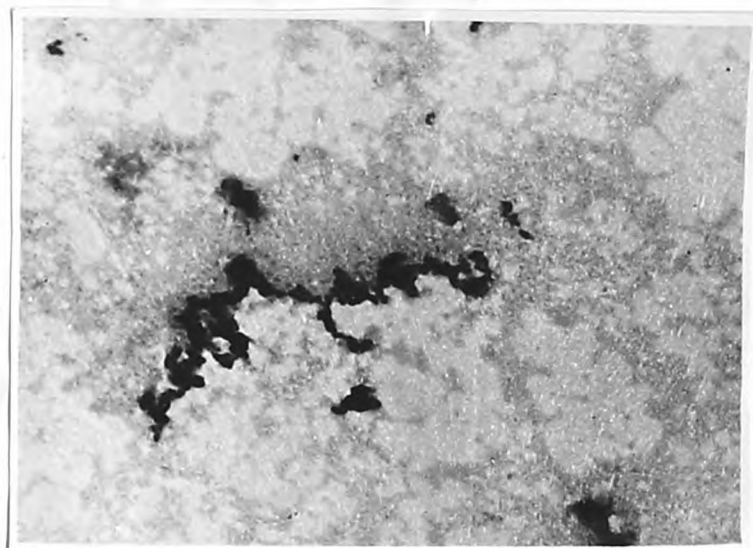


Рис. 27. Электронномикроскопическая фотография раствора гликогена печени здорового кролика после суточной инкубации в термостате при температуре $+60^{\circ}\text{C}$. Увеличение $\times 15,000$.

гранями и острыми углами, что характеризует их как образования, имеющие кристаллическую структуру. Такие иглообразные, кристаллические структуры мы наблюдали при просмотре различных препаратов гликогенов и во всех случаях размеры их сильно варьировали (рис. 28).

Наличие кристаллических форм, обнаруженных при исследовании растворов гликогенов, естественно, привело нас к мысли о возможности самопроизвольного распада гликогена с образованием продуктов гидролиза, способных к кристаллизации, что могло иметь место при хранении гликогена в виде водного раствора при сравнительно высокой температуре. Таким продуктом могла бы быть в частности, глюкоза являющаяся кристаллическим веществом. Для проверки высказанного предположения мы провели серию опытов с кислотным гидролизом гликогена, полагая, что резкое увеличение наблюдаемых кристаллических форм при этих условиях говорило бы в пользу самопроизвольного распада гликогена в ранее проводимых опытах.

С этой целью исследуемые растворы гликогенов подвергались гидролитическому расщеплению с помощью 2-нормального раствора серной кислоты на кипящей водяной бане в течение двух часов, после чего охлажденные гидролизаты рассматривались под электронным микроскопом.

В результате проведенных исследований было выяснено, что после кислотного гидролиза гликогена количество вышеописанных кристаллов в растворе не увеличивалось. Наоборот, ни в одном случае исследования гидролизатов нам не удалось обнаружить ранее описанных кристаллических структур, такие как и типичных образований аморфного характера. При просмотре

препаратов гидролизатов всегда наблюдалась однотипная картина, характеризующаяся наличием очень крупных кристаллов с резко очерченными гранями и выраженными углами, свойственными кристаллам глюкозы (рис. 29).

Поскольку эти кристаллы резко отличались от ранее наблюдаемых структур, обнаруженных в растворах гликогенов, просмотренных до начала кислотного гидролиза, мы имели основание полагать, что описанные выше кристаллические образования не являются продуктами самопроизвольного распада исследуемого полисахарида.

Можно было предположить, что наблюдаемые кристаллические образования представляют собой какие-то кристаллические вещества, загрязнявшие наши препараты, что могло иметь место, хотя и было маловероятным, поскольку мы исследовали только препараты гликогенов, оцененные как химически чистые. Допуская, однако, возможность присутствия в исследуемых препаратах каких-то сопутствующих веществ, не учтенных при анализе по азоту^и фосфору, расщепляющихся при кислотном гидролизе, мы решили провести еще энзиматический контроль, являющийся более специфическим.

При проведении энзиматического контроля к стерильным исследуемым растворам гликогенов прибавлялся раствор пропущенной через фильтры Зейтца слюны, разведенной в 10 раз предварительно прокипяченной бидистиллированной водой. Полученные инкубационные смеси помещались в термостат, где находились в течение 30 минут при температуре $+37^{\circ}\text{C}$. Расщепление гликогена амилазой слюны контролировалось путем взятия из инкубационных смесей проб на йодную реакцию, которая после получасовой инкубации во всех случаях была отрицательной.

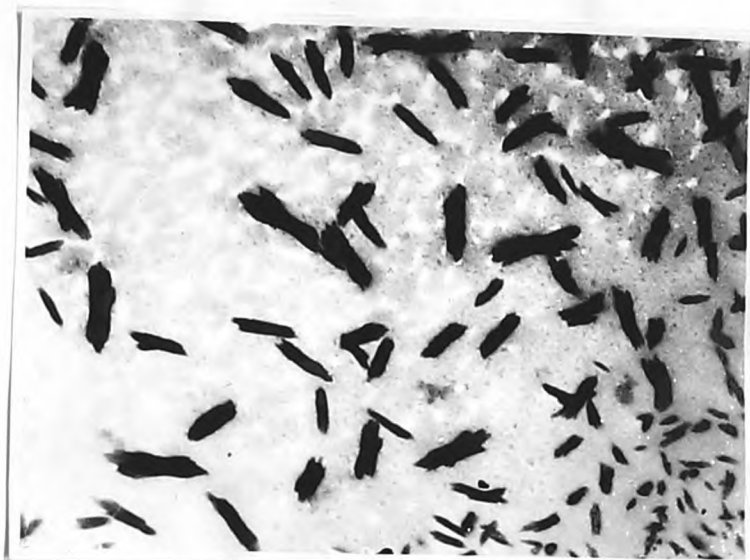


Рис. 28. Электронномикроскопическая фотография кристаллов, наблюдаемых в растворе гликогена, выделенного из печени здорового кролика. Увеличение $\times 15.000$.



Рис. 29. Электронномикроскопическая фотография кристаллов, наблюдаемых после 2-х часового кислотного гидролиза раствора гликогена печени здорового кролика. Увеличение $\times 15.000$.

Убедившись в отсутствии гликогена в смеси с помощью химической реакции, мы изучали эту смесь с помощью электронной микроскопии. Проведенные исследования показали, что после воздействия на растворы гликогенов амилазой слюны в них не удавалось обнаружить структур, характерных для исходных растворов гликогенов, представленных конгломератами неправильной формы или же кристаллическими образованиями. И поскольку амилаза слюны может расщеплять только полисахариды, мы имели основание сделать заключение, что ранее наблюдаемые нами образования как аморфного, так и кристаллического характера представляют собой не что иное как гликоген, находящийся в двух различных формах — аморфной и кристаллической. Следовательно, при некоторых условиях этот полисахарид, наряду с известной ранее аморфной формой, образующей опалесцирующий коллоидный раствор, может находиться в кристаллическом состоянии, возможность существования которого высказывалась и ранее, но не была доказана (*T. Baker, H. Weelan, 1950*). Далее, естественно, возникал вопрос являются ли эти формы различными фракциями исследуемых нами препаратов гликогенов или это есть две формы существования одного и того же вещества. Для выяснения этого вопроса мы решили применить метод фракционирования исходных растворов гликогенов без воздействия на них каких-либо химических веществ, для чего использовали фильтры Зейтца с различным диаметром пор. В результате пропускания растворов гликогенов через такие фильтры были получены растворы, отличающиеся от исходных по степени опалесценции. Электронная микроскопия полученных фильтратов, представляющих собой слабоопалесцирующие растворы, показала, что и здесь все поле наблюдения покрыто характерными для гликогена образованиями неправильной формы, которые,

имели меньшие размеры, чем в исходных исследуемых растворах. Эти образования были расположены на фоне мелкой зернистости также, как это имело место при изучении растворов гликогенов, не подвергнутых фракционированию. Наряду с описанными аморфными образованиями в препаратах, приготовленных из фильтратов, были обнаружены и кристаллические формы, аналогичные тем, которые наблюдались при просмотре препаратов исходных растворов гликогенов. При этом кристаллы располагались преимущественно по периферии нанесенной капли, размеры их варьировали в значительных пределах, от очень мелких, едва различимых при больших увеличениях, до сравнительно крупных, превышающих диаметры пор используемых нами фильтров Зейтца. Это наблюдение свидетельствует о том, что образование кристаллов гликогена происходит в процессе приготовления препарата для просмотра. Описываемые кристаллы образуются, по-видимому, из мельчайших, покрывающих собой все поле наблюдения частиц, поскольку размеры последних и наиболее мелких кристаллов, обнаруженных нами, характеризуются величинами одного порядка. Это обстоятельство говорит в пользу предположения о том, что описываемые нами наиболее мелкие образования, создающие неоднородный фон препарата, являются, вероятно, молекулами изучаемого полисахарида, из которых при определенных условиях могут образоваться кристаллические формы этого вещества. Однако в большей степени и чаще всего из них образуются конгломераты различной сложности, которые мы всегда наблюдали при электронной микроскопии растворов гликогенов, полученных при условии полного растворения исследуемого полисахарида.

Образование конгломератов молекул мы обнаружили также при исследовании растворов гликогенов, выделенных из печени

кроликов с карциномой Броуна-Пирс. При этом электронно-микроскопическому исследованию подвергались препараты гликогенов, выделенные из печени животных, глубоко пораженных опухолевым процессом забитых не ранее 13-го дня после пассивирования опухолевого штамма, когда при положении животных на спине ясно пальпировалась бугристость в эпигастральной области. Это гарантировало наличие пышно развившегося опухолевого процесса в организме подопытного животного. В этот период и во все последующие дни у забитых животных при вскрытии обнаруживались множественные опухолевые разрастания на сальнике, в области диафрагмы, на брыжейке кишечника, на стенках желудка, на селезенке.

Массивные разрастания опухолевой ткани наблюдались также в области малого таза; яички, как правило, были уплотнены и резко увеличены за счет прорастания опухолевой тканью; часто обнаруживались множественные метастазы в почках, легких, на внутренней стенке брюшины. Количество непольностью извлеченной опухолевой ткани в эти сроки колебалось от 60 до 130 граммов.

Определение количества гликогена в печени в эти сроки развития опухолевого процесса свидетельствовало о резком снижении содержания этого полисахарида. Результаты проведенных анализов показали, что количество гликогена в печеночной ткани кроликов, пораженных карциномой Броуна-Пирс, колебалось от 0,16% до 0,96%, что в среднем соответствовало 0,41%. В то время, как количество гликогена в печени здоровых контрольных кроликов, обрабатываемых параллельно, характеризовалось средней цифрой 3,25%, с индивидуальными колебаниями от 1,96% до 6,72%. (См. приложение, таблицы IV, V).

При просмотре препаратов, приготовленных из таких гликогенов, выделенных из печени больных раком животных, на фоне мелкой зернистости наблюдались более крупные округлые образования, соединяющиеся в конгломераты различной формы (рис. 30). На приведенной электронной микрофотографии представлен сложный конгломерат исследуемого вещества, соответствующий полисахаридным конгломератам, наблюдаемым при просмотре растворов гликогенов печени здоровых кроликов. Однако форма этих конгломератов в растворах гликогенов печени раковых животных характеризуется несколько иным строением и большим разнообразием, чем в растворах гликогенов печени здоровых кроликов. При исследовании растворов гликогенов печени кроликов с карциномой Броуна-Пире мы не обнаруживали кристаллических образований, характерных для препаратов, изготовленных из растворов гликогенов печени здоровых кроликов. Однако не подлежит сомнению, что гликогены печени раковых животных тоже могут кристаллизоваться, давая, возможно, несколько иные кристаллические структуры, которые можно было бы получать систематически, подобрав соответствующие условия для процесса кристаллизации. В условиях наших исследований, просматривая препараты растворов гликогенов печени раковых животных, мы лишь в некоторых случаях наблюдали процесс кристаллизации, когда непосредственно из аморфных ассоциатов молекул изучаемого вещества происходило образование структур с резко очерченными гранями и выраженными углами, что характеризовало их как кристаллические образования (рис. 31). На приведенной электронной микрофотографии хорошо виден мелкозернистый фон, образованный отдельными молекулами исследуемого полисахарида, здесь же имеются ассоциаты молекул, соединяющиеся

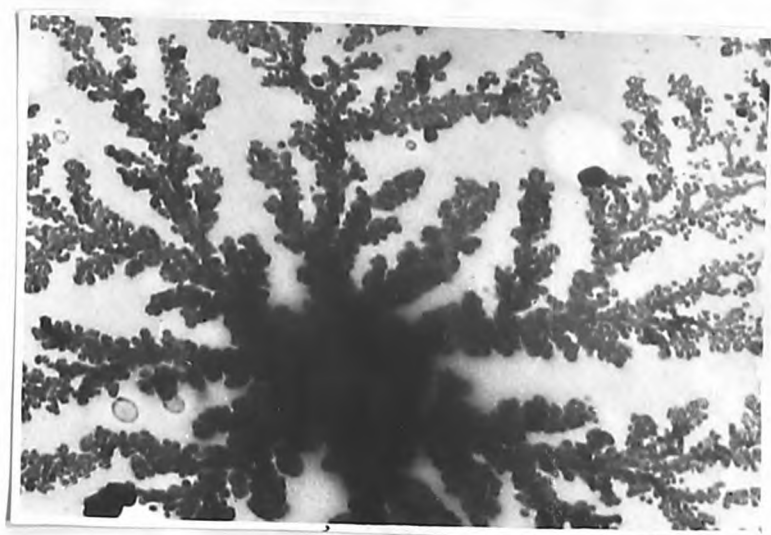


Рис. 30. Электронномикроскопическая фотография раствора гликогена печени кролика с карциномой Броуна-Пирс после суточной инкубации в термостате при температуре $+60^{\circ}\text{C}$. Увеличение $\times 30.000$.

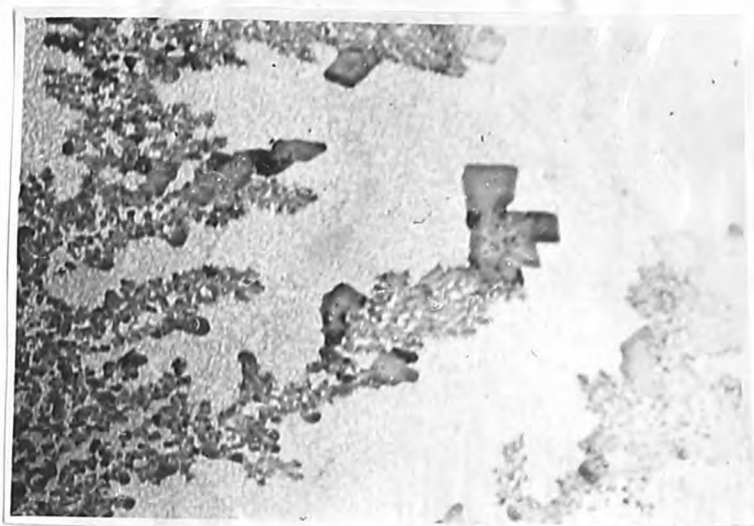


Рис. 31. Электронномикроскопическая фотография, отражающая процесс кристаллизации в растворе гликогена печени кролика с карциномой Броуна-Пирс. Увеличение $\times 30.000$.

в более крупные конгломераты, а также наблюдается процесс кристаллизации, который происходит в различных местах скопления изучаемого гликогена.

Приведенные данные показывают, что электронно-микроскопическая картина, наблюдаемая при исследовании растворов, полученных из гликогенов печени здоровых кроликов и пораженных карциномой Броуна-Пирс, характеризуется целым рядом отличительных признаков, что вновь подтверждает существование различий в структуре молекул исследуемых нами полисахаридов.

Эти различия выявились в еще большей степени после того, как мы изменили методику исследования, заменив сушку препаратов при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ и обычном атмосферном давлении высоковакуумной сушкой в замороженном состоянии, когда температура достигала -35°C , а разрежение вакуума соответствовало 10^{-3} мм ртутного столба. Всушивание нанесенных на подложку растворов гликогенов в этих условиях производилось в течение 4-5 часов, что обеспечивало полное удаление воды из исследуемого препарата. При этом было обнаружено резкое увеличение контрастности изучаемого объекта, которая при этих условиях сушки почти не менялась при увеличении разведения исследуемого раствора. Это позволило, уменьшая концентрацию растворов путем разведения, сравнивать структуры растворенного вещества обеих интересующих нас групп полисахаридов. Электронно-микроскопические исследования, проведенные с применением этого метода, со всей очевидностью подтвердили, что гликоген в растворе находится в виде довольно сложных ассоциатов, образованных из частиц округлой формы, которые обнаруживались при исследовании всех изученных нами препаратов, полученных из гликогенов печени здоровых кроликов и пораженных карциномой Броуна-Пирс. (рис. 32, 33)

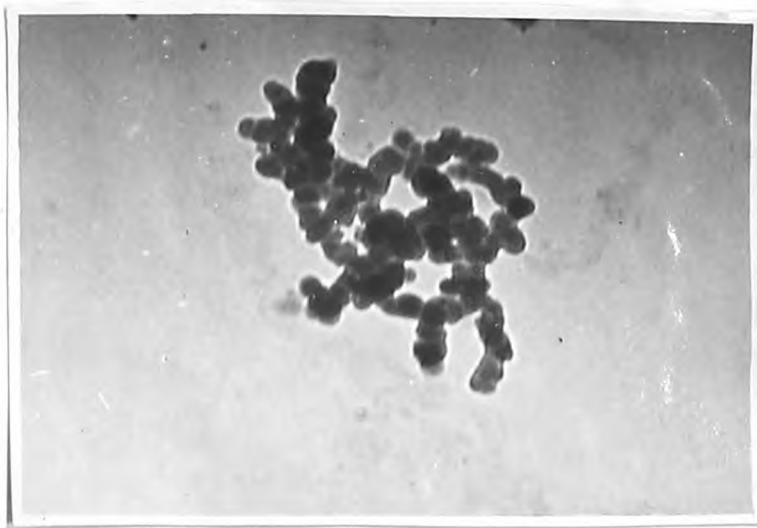


Рис. 32. Электронномикроскопическая фотография ассоциата, наблюдаемого в растворе гликогена печени здорового кролика. Увеличение 46.000.



Рис. 33. Электронномикроскопическая фотография ассоциата, наблюдаемого в растворе гликогена, выделенного из печени кролика с карциномой Броуна-Пирс. Увеличение 46.000.

Из этих данных следует, что наблюдаемые обособленные образования, по-видимому, представляют собой не конгломераты, т.е. не простые скопления вещества, а именно ассоциаты, которые можно представить себе, как гигантские макромолекулы, состоящие из неоднократно повторяющихся элементов-звеньев почти однотипного характера, несомненно, каким-то образом связанных между собой. Если бы это было не так, то при больших разведениях исследуемых растворов мы не получали бы этих сложных образований, которые в момент разбавления легко распадались бы на составляющие их элементы. Поэтому обнаружение в исследуемых нами препаратах совершенно обособленных, изолированных друг от друга образований говорит в пользу наличия в них каких-то ассоциативных связей (вероятнее всего водородных), благодаря которым сохраняется их структура, что имеет место во всех изученных нами растворах, полученных как из гликогенов печени здоровых кроликов, так и пораженных карциномой Броуна-Пирс.

Вместе с тем ассоциаты, наблюдаемые при исследовании растворов гликогенов печени здоровых и раковых кроликов, имеют и определенные черты отличия. При просмотре соответствующих препаратов прежде всего обращает на себя внимание то, что ассоциаты, образованные в растворах гликогенов печени здоровых кроликов, несколько варьируя по размерам и форме, имеют, однако, более упорядоченные структуры, чем ассоциаты, наблюдаемые в растворах, полученных из гликогенов печени кроликов, пораженных злокачественным новообразованием.

Ассоциаты, образующиеся в растворах, приготовленных из гликогенов печени раковых животных, имеют чрезвычайно разнообразие и беспорядочные структуры, размеры которых преобладают

над размерами соответствующих ассоциатов, имеющих в растворах гликогенов, выделенных из печени здоровых животных.

Однако, основным отличительным признаком этих двух групп исследуемых препаратов, является величина частиц, из которых образованы ассоциаты.

При изучении растворов гликогенов печени здоровых животных в поле зрения микроскопа обнаруживаются ассоциаты, образованные из более крупных частиц, чем при просмотре препаратов, полученных из растворов гликогенов печени раковых кроликов.

Эти частицы, имеющие в обоих случаях округлую форму, в случае исследования гликогенов, выделенных из печени здоровых кроликов, имели диаметр порядка 1000 \AA , в то время как ассоциаты, наблюдаемые при изучении препаратов гликогенов печени раковых животных, состояли всегда из более мелких образований, диаметр которых не превышал $600-700 \text{ \AA}$.

Рассмотрение частиц, образующих сложные ассоциаты, показывает, что каждая отдельная частица не является однородной по строению, а состоит в свою очередь из более мелких образований. Это хорошо видно при исследовании препаратов, изготовленных из растворов гликогенов печени здоровых кроликов, рассматриваемых при больших увеличениях (рис. 34).

На представленной электронной микрофотографии хорошо виден крупный, совершенно обособленный ассоциат, состоящий из большого количества частиц округлой формы, в которых в свою очередь видны более мелкие образования, представляющие собой структурные элементы, лежащие в основе частиц, составляющих ассоциат. Возможно, что именно эти образования являются теми молекулярными единицами, которые представляют собой сильно

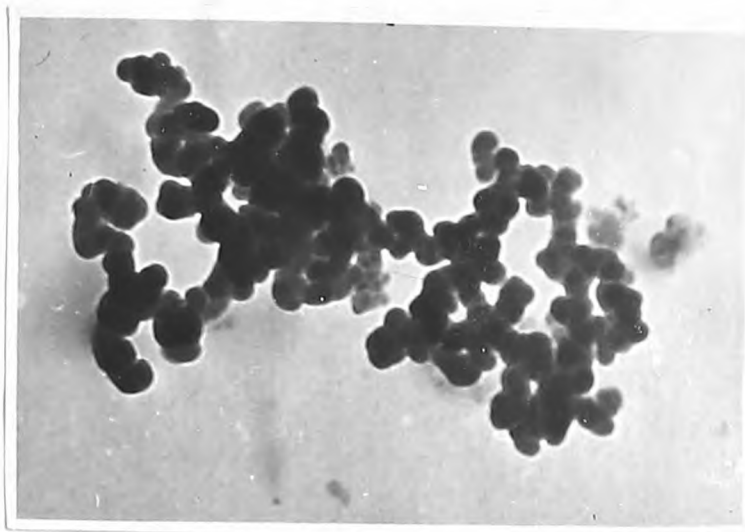


Рис. 34. Электронномикроскопическая фотография ассоциата, наблюдаемого в растворе гликогена печени здорового кролика. Увеличение 60,000.

разветвленные полисахаридные структуры, которые состоят из большого количества глюкозных остатков, соединенных α -1,4- и α -1,6-глюкозидными связями. В пользу такого предположения говорят размеры этих частиц, диаметр которых, по нашим данным, колеблется от 150 до 200 Å, что соответствует литературным данным о том, что сильно разветвленные молекулы гликогена имеют форму близкую к сферической с диаметром 100 Å и более. Если на основании этого наше допущение признать правомочным, то можно считать, что мы исследуем интересующий нас полисахарид на молекулярном уровне. Однако, молекулы его не распределяются в растворе независимо друг от друга, а группируются между собой, соединяясь между собой с помощью каких то непрочных связей, которые, по-видимому, легко разрушаются при изучении гликогенов с помощью химических методов исследования.

Вероятно по этой же причине непрочное соединение частиц в ассоциаты не является препятствием для участия активных групп гликозных остатков этого полисахарида в тех или иных химических реакциях, благодаря чему, являясь довольно сложным полимером, гликоген в растворенном состоянии проявляет все свойства, присущие молекулам того высокомолекулярного вещества, которое лежит в основе его структуры. При этом изменение в строении основной высокомолекулярной структуры приводит к образованию полимеров, имеющих иное строение ассоциатов, получающихся в водном растворе полисахарида. Об этом свидетельствуют результаты наших исследований, посвященных изучению гликогенов, выделенных из печени кроликов, пораженных карциномой Броуна-Пирс, в сравнении с гликогенами печени здоровых кроликов. Полученные при этом данные показывают, что при исследовании патологических гликогенов полисахаридные ассоциаты, образованные из частиц меньших размеров, настолько контрастны при просматривании, что в них не удастся рассмотреть первичные полисахаридные структуры, хотя и здесь они, несомненно, имеются, представляя собой мелкие и компактные образования, которые настолько близко располагаются друг к другу, что при данной разрешающей способности микроскопа не удастся обнаружить границ их соприкосновения. В пользу сказанного говорит то, что в опытах, проводимых по первоначально разработанной методике, при исследовании растворов гликогенов, выделенных из печени раковых животных, на электронных микрофотографиях видны частицы совершенно аналогичные тем, из которых образованы описанные нами позже ассоциаты. При сравнении частиц, образующих ассоциаты, на рис. 33 с частицами, отмеченными стрелками, на

рис. 30 и 31. имеется большое сходство. И надо полагать, что эти крупные контрастные частицы образованы из тех более мелких частиц, которые видны в большом количестве на данных микрофотографиях. Однако границ соприкосновения этих частиц при образовании более крупной структуры здесь также обнаружить не удастся. Это объясняется, вероятно, тем, что гликогены печени раковых животных характеризуются более короткими наружными ветвями и большей степенью ветвления, благодаря чему молекулы этих полисахаридов могут образовывать значительно более компактные и уплотненные субъединицы по сравнению с теми, которые получают из гликогенов печени здоровых кроликов, имеющих менее разветвленную структуру молекул с более длинными наружными ветвями, что способствует возникновению более рыхлых образований, структура которых просматривается при электронной микроскопии.

При этом различия в первичных полисахаридных структурах определяют образование разных по размерам частиц, из которых возникают затем неодинаковые по сложности и размерам ассоциаты, и, вероятно, потому, что в более уплотненных структурах гликогенов печени раковых животных имеется большее количество ассоциативных связей, в таких растворах образуются более сложные ассоциаты, имеющие большие размеры, чем в норме, благодаря чему растворы гликогенов печени раковых животных во всех наших исследованиях были более мутными по сравнению с соответствующими растворами, приготовленными из гликогенов печени здоровых животных.

Таким образом исследования, проведенные методом электроно-микроскопического анализа, подтверждают данные, полученные

нами ранее с помощью других методов и вновь свидетельствуют о том, что гликогены, синтезируемые в печени животных, пораженных злокачественным новообразованием, отличаются по своей структуре от соответствующих полисахаридов, выделенных из печени здоровых животных.

- 0 -

В выполнении электронно-микроскопических исследований принимал участие инженер Е.И.Ефимович, за что приношу ему искреннюю благодарность.

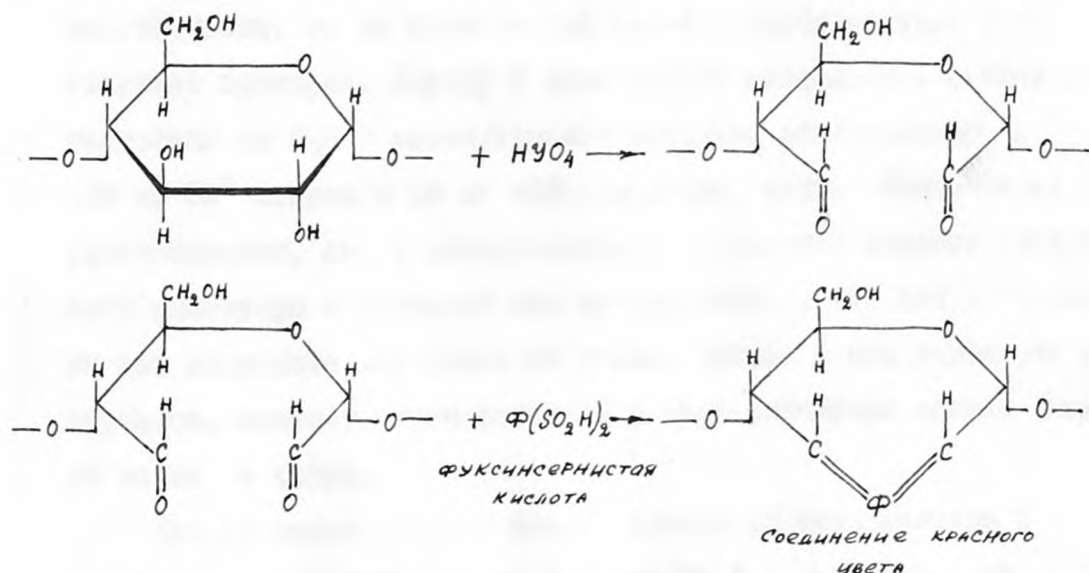
7. ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ГЛИКОГЕНА
В ПЕЧЕНИ КРОЛИКОВ В ПРОЦЕССЕ РАЗВИТИЯ
КАРЦИНОМЫ БРОУНА-ПИРС ПО ДАННЫМ ГИСТО-
ХИМИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕН-
НОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИЗУЧАЕМОГО ПОЛИСАХАРИДА

Для изучения гликогена, синтезируемого в печени кроликов, пораженных карциномой Броуна-Пирс, наряду с ранее описанными методами, мы воспользовались также методом гистохимического выявления гликогена, который позволяет исследовать этот полисахарид непосредственно в ткани печени в том состоянии, в каком он находится в момент наступления смерти подопытного животного. Мы полагали, что применение этого метода даст нам возможность получить дополнительные данные о состоянии гликогена, образованного в печени животного, пораженного злокачественным новообразованием, а также позволит изучить динамику изменения этого полисахарида в процессе развития опухолевой болезни. Не встретив в доступной нам литературе работ, освещающих эти вопросы, и считая, что разрешение их представляет значительный интерес в связи с исследованием гликогена при канцеризации организма, мы изучили динамику изменения гликогена в печени на 46 кроликах-самцах, которым интратестостулярно прививалась карцинома Броуна-Пирс, и на 30 здоровых контрольных животных того же вида, находившихся в аналогичных условиях.

Для гистохимического определения гликогена в печеночной ткани мы воспользовались методикой, разработанной А.Л.Шабадашем (1947). Принцип метода гистохимического выявления гликогена в тканях основан на способности йодной кислоты, являющейся окислителем, разрывать С - С связи в структурах, содержащих две смежные гликолевые группы ($\text{C}(\text{OH})-\text{C}(\text{OH})$), превращая их в диальдегид ($\text{CHO}-\text{CHO}$). При этом йодная кислота не окисляет

получающиеся альдегиды, вследствие чего последние можно выявить с помощью реактива Шиффа, при взаимодействии с которым они дают соединения красного цвета.

В сильно разветвленных молекулах гликогена, состоящих из большого количества остатков глюкозы, содержится большое количество реакционноспособных гликолевых групп, которые имеются во всех глюкозных остатках, образующих молекулы данного полисахарида. Поэтому гликоген дает ярко выраженную окраску с реактивом Шиффа, поскольку интенсивность окраски, развивающейся при этой реакции, зависит от количества гликолевых групп, имеющих-ся в определяемом соединении. Реакцию окисления полисахарида Иодной кислотой и последующую реакцию взаимодействия полученного продукта, содержащего альдегидные группы, с фуксинсернистой кислотой можно схематически представить следующим образом:



Оказалось, что способностью окислять 1,2-гликоли до стадии альдегидов обладает не только Иодная кислота, но и ее соли, в частности, периодат натрия или калия, которыми обычно и пользуются при гистохимическом выявлении гликогена в тканях.

Для этого исследуемая ткань подвергается предварительной обработке, имеющей своей целью приготовление гистологического препарата, на который действует затем периодат натрия или калия и фуксинсернистая кислота, в результате чего в полученном срезе органа гистохимически обнаруживается гликоген.

Исследование начиналось с того, что 0,5 грамма быстро извлеченной печени только что убитого животного помещалось на заранее приготовленный кусочек марли с вдернутой в нее ниткой, после затягивания которой марля с исследуемой тканью помещалась в первый или второй нейтральные фиксаторы А.Л.Шабадаша.

При этом надо учитывать, что первый нейтральный фиксатор, состоящий из 1,8 г азотнокислой меди, 0,9 г азотнокислого кальция, растворенных в 100 мл 96° спирта, и 10 мл 40% формалина, добавленного перед употреблением, быстро, в течение часа, фиксирует ткань, но из него иногда может адсорбироваться медь, портящая препарат. Наряду с этим второй нейтральный фиксатор, состоящий из 2,6 г азотнокислого кальция, растворенного в 100 мл 96° спирта, и 10 мл 40% формалина, добавленного перед употреблением, лишен вышеуказанного недостатка первого нейтрального фиксатора и обладает тем преимуществом, что при пользовании им нет опасности перефиксации ткани. Вместе с тем действует он медленно, поэтому время фиксации в этом фиксаторе должно быть не менее 24 часов.

Тем не менее в своих исследованиях мы пользовались в основном вторым нейтральным фиксатором А.Л.Шабадаша, как имеющим ряд преимуществ.

Фиксированный в нейтральном фиксаторе кусочек исследуемой ткани переносился затем в чистую марлю и помещался в 96° спирт,

где он находился в течение суток, после чего перемещался на один час в абсолютный спирт. Затем кусочек ткани переносился во второй сосуд с абсолютным спиртом, в котором находился в течение еще одного часа. По прошествии этого времени исследуемый материал помещался на 20 минут в сосуд, содержащий бензол, откуда он переносился во второй сосуд с бензолом, в котором выдерживался еще в течение 20 минут. Затем кусочки ткани переносились в бензоло-парафиновую кашицу, представляющую собой смесь парафина, расплавленного в термостате при температуре 56°C , влитого в бензол, в результате чего получалась однородная кашица. Последняя разливалась в два химических стакана, которые помещались в термостат с температурой 37°C , при этом в одном из них кусочек ткани находился 40 минут, а во втором — 30 минут.

Из бензоло-парафиновой кашицы кусочек исследуемой ткани переносился в расплавленный парафин, содержащий 5-10% пчелиного воска, который способствовал лучшему парафинированию. Обязательным условием для хорошего парафинирования ткани являлась гомогенность расплавленного парафина, когда он находился в термостате с температурой 56°C в двух открытых химических стаканах, в которые последовательно в каждый на сутки погружались кусочки исследуемой ткани. По истечении указанного времени производилась заливка материала в парафин. Для этой цели из плотной бумаги делалась специальная форма, в которую наливался парафин, нагретый в термостате до 56°C . В находящийся в форме расплавленный парафин переносился уже парафинированный кусочек исследуемой ткани, после чего бумажная форма осторожно помещалась в холодную воду (с температурой $10-18^{\circ}\text{C}$), налитую в

эксикатор, кристаллизатор или какой-либо другой подобный сосуд. Когда на поверхности парафина появлялась плотная пленка, вся форма погружалась в воду, где она находилась до тех пор, пока парафин не приобретал твердую консистенцию. Затем застывший парафин с заключенным в него кусочком ткани освобождался от бумажной формы, подрезался по размерам деревянного блока и фиксировался на него с помощью капли горячего расплавленного парафина.

Из полученных таким образом парафиновых блоков, закрепленных в микротоме, делались серии срезов исследуемого органа. Лучшие срезы кисточкой переносились на сухие обработанные смесью спирта и эфира предметные стекла, которые предварительно в течение суток находились в хромовой смеси, тщательно отмытой затем проточной водопроводной и дистиллированной водой.

Парафиновые срезы, нанесенные на такие тщательно обработанные стекла, на специальных подставках помещались в термостат с температурой 37°C , где оставлялись на сутки. В течение этого времени срезы исследуемой ткани хорошо укреплялись на предметных стеклах, если последние были химически чистыми.

Далее полученные и фиксированные на предметных стеклах срезы депарафинировались. Для этого вначале они помещались на 5 минут в ксилол, откуда на 2-3 минуты переносились в абсолютный спирт, затем последовательно погружались в 96° и 70° спирты, в каждом из которых выдерживались также по 2-3 минуты, после чего промывались в дух порциях дистиллированной воды в течение 5 минут в каждой.

После депарафинирования срезы окрашивались с целью выявления в исследуемой ткани гликогена. Для этого стекла с депарафинированными срезами вначале помещались на 20 минут в раствор периодата калия или натрия.

Приготовление раствора периодата, используемого для этой цели, производилось непосредственно перед опытом, для чего 230 мг соответствующей соли растворялось в 100 мл горячей дистиллированной воды. В период исследования полученный раствор находился в стакане, защищенном от воздействия света, поскольку периодат калия или натрия на свету быстро разлагается.

По истечении указанного времени стекла из раствора периодата переносились в дистиллированную воду, где промывались 5-7 минут, после чего на две минуты помещались в сернистую промывную воду, которая готовилась непосредственно перед употреблением в банке с притертой пробкой, куда наливалось 10 мл 10% раствора бисульфита натрия, добавлялось 200 мл воды и 10 мл 1-молярного раствора соляной кислоты. При этом бисульфит натрия легко разлагается с образованием метабисульфита натрия ($2\text{NaHSO}_3 - \text{H}_2\text{O} = \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), поэтому при отсутствии бисульфита натрия, 10% раствор его можно приготовить из метабисульфита натрия, отвесив 2,5 грамма последнего и растворив эту навеску в 50 мл дистиллированной воды. Приготовленная таким образом сернистая вода, сохраняемая в банке с притертой пробкой, может действовать до тех пор, пока она дает запах сернистого газа, однако лучше заменять ее свежей раньше и делать это чаще, если количество обрабатываемых препаратов велико.

Препараты, промытые в сернистой воде, переносились далее в реактив Шиффа, который готовился заранее следующим образом: 1 грамм основного фуксина тщательно измельчался в агатовой ступке, после чего переносился в колбу, куда вливалось 200 мл кипящей дистиллированной воды. После встряхивания и полного растворения фуксина полученный раствор охлаждался до 50°C , а

затем фильтровался в колбу с притертой пробкой. К профильтрованному раствору добавлялось 20 мл 1-нормального раствора соляной кислоты (точно приготовленного!), а когда температура раствора снижалась до 25°C , в него вносился 1 грамм метабисульфита натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$). Полученный раствор тщательно перемешивался, колба, в которой он находился, плотно закрывалась пробкой и помещалась в темноту на 24 часа, в течение которых раствор обесцвечивался. Если по прошествии этого времени раствор оказывался слегка желтоватым, к нему добавлялось 2 грамма активированного угля. После тщательного взбалтывания с углем в течение одной минуты и последующего фильтрования раствор полностью обесцвечивался и был готов к употреблению.

В таком растворе, защищенном от воздействия света, погруженные препараты находились в течение 20 минут, по прошествии которых они последовательно переносились в три порции сернистой воды, в каждой из которых находились по 3-4 минуты. После этого препараты промывались в обильном количестве дистиллированной воды, не менее пяти минут в одной порции, затем столько же времени в другой.

Завершающим этапом получения гистохимических препаратов является их обезвоживание. С этой целью окрашенные препараты последовательно помещались в спирты, имеющие возрастающую концентрацию — в 70° , в 96° и в абсолютный спирт, в каждом из которых они находились в течение 3-5 минут. Затем препараты переносились на 3 минуты в карбол-ксилол и на 1-2 минуты в ксилол, в результате чего происходило их полное обезвоживание.

Такие окрашенные и обезвоженные препараты далее закрывались чистыми покровными стеклами и заключались в канадский

бальзам, после чего исследовались с помощью микроскопа. Наблюдаемая микроскопическая картина фиксировалась в виде микрофотографий, которые делались нами с помощью фотоаппарата "Зенит С", имеющего специальную насадку.

Пользуясь описанным методом гистохимического определения гликогена, мы изучили динамику изменения этого полисахарида в печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс на протяжении всего периода заболевания животных, поскольку исследование гликогена в печени подопытных животных производилось нами через 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 суток после перевивки опухолевого штамма. При этом параллельно всегда обрабатывалась печень здоровых контрольных кроликов, находившихся в аналогичных условиях и на однотипном пищевом рационе с животными опытной группы.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что в печени здоровых кроликов на протяжении всего срока исследования обнаруживались значительные количества гликогена, который заполнял собой все печеночные балки, диффузно располагаясь по всей протоплазме клеток ткани печени, оставляя свободными лишь просветы сосудов (рис. 35).

Вместе с тем у кроликов с привитой карциномой Броуна-Пирс уже через сутки после перевивки опухолевого штамма наблюдалось заметное обеднение печени гликогеном. Отложение исследуемого полисахарида в этот период носило очаговый характер, что выражалось в концентрировании гликогена в печеночных клетках, расположенных около сосудов и под капсулой исследуемого органа. Гликоген в этот период развития опухолевого процесса диффузно заполнял вышеупомянутые клетки печени, оставляя свободными клетки периферической части печеночных балок (рис. 36).

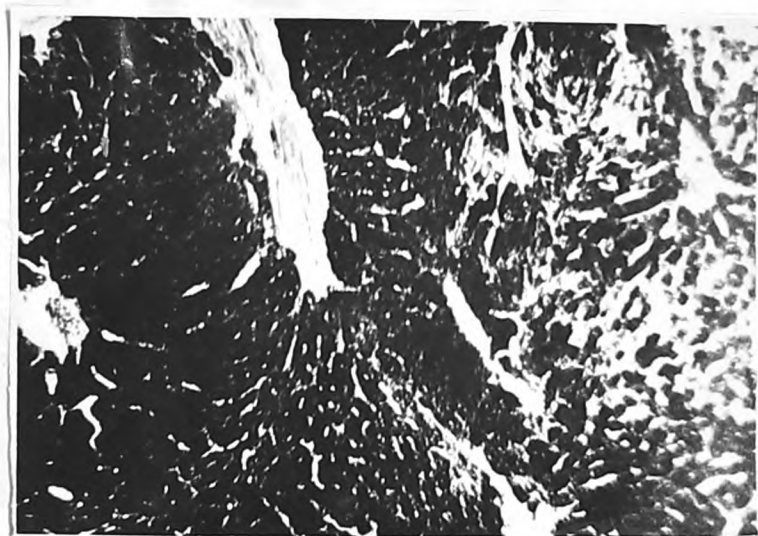


Рис. 35. Микрофотография печени здорового кролика. Окраска по А.Л.Шабадашу. Увеличение $\times 240$.

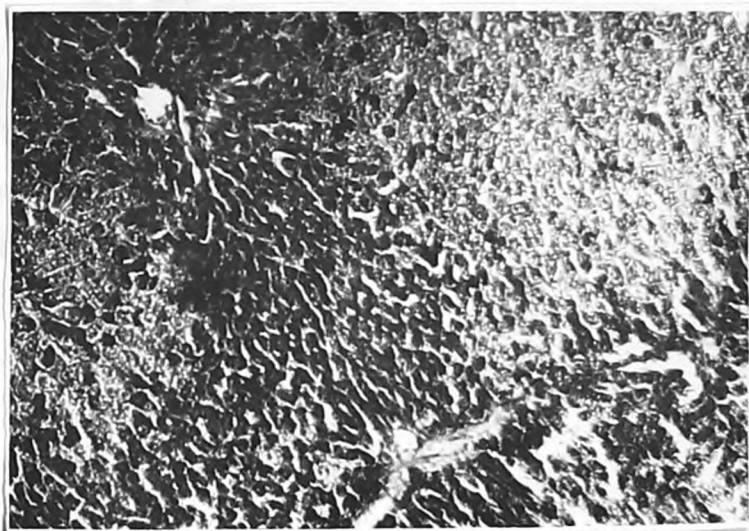


Рис. 36. Микрофотография печени кролика, забитого через сутки после перевивки карциномы Броуна-Пирс. Окраска по А.Л.Шабадашу. Увеличение $\times 240$.

Еще меньшее количество гликогена в печени подопытных животных обнаруживалось по прошествии трех суток после перевивки карциномы Броуна-Пирс. Исследуемый полисахарид на данном этапе развития опухолевого процесса обнаруживался в печени в незначительных количествах, располагаясь, главным образом, в клетках, находящихся вблизи от просветов центральных вен; остальная же часть печеночной ткани не содержала гликогена (рис.37).

По мере поражения организма опухолевой болезнью содержание и локализация гликогена в печени подопытных животных продолжали изменяться. На пятые сутки исследования гистохимическое определение гликогена в печени кроликов, пораженных карциномой Броуна-Пирс, не давало однотипных результатов. У части подопытных животных в печени обнаруживалось еще меньшее количество гликогена, чем в предыдущий срок исследования, достигающее в ряде случаев до полного исчезновения исследуемого полисахарида из печеночной ткани. У других животных, забитых в этот же срок исследования, наблюдалась картина печени, бедной гликогеном, который, однако, обнаруживался во многих клетках изучаемой ткани, располагаясь в виде мелких фиолетовых зернышек по периферии печеночных клеток (рис.38).

При просмотре гистохимических препаратов печени кроликов, забитых на седьмые сутки развития опухолевого процесса, во всех случаях наблюдалась картина, свидетельствующая о явном накоплении гликогена в печени кроликов. Гликоген, определяемый в этот срок исследования, отличался по своей микроскопической картине от гликогена, обнаруживаемого во все предыдущие сроки исследования, а также от гликогена, наблюдаемого в печени здоровых

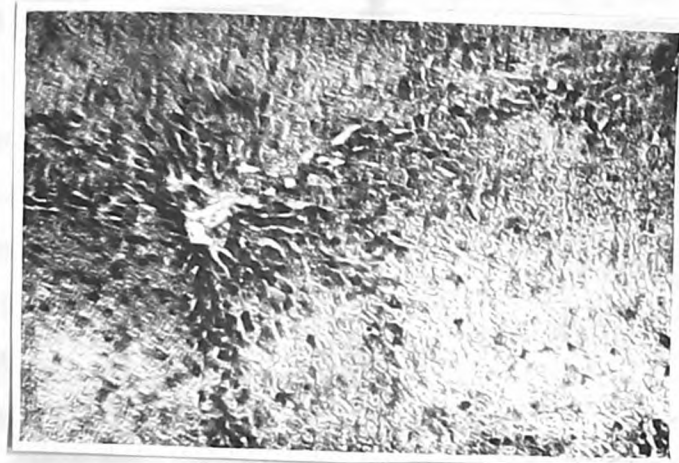


Рис. 37. Микрофотография печени кролика, забитого через 3 суток после перевивки карциномы Броуна-Пирса. Окраска по А.Л. Шабашу. Увеличение $\times 240$.

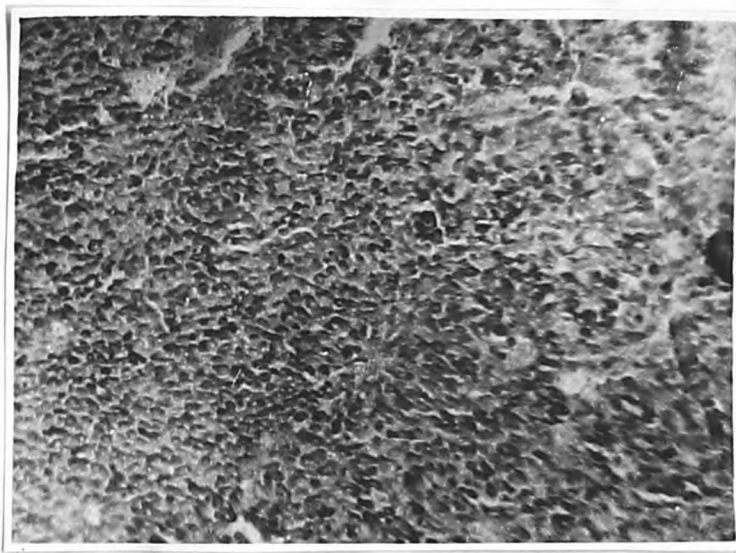


Рис. 38. Микрофотография печени кролика, забитого через 5 суток после перевивки карциномы Броуна-Пирса. Окраска по А.Л.Шабашу. Увеличение $\times 240$.

кроликов, своей компактностью и резкостью границ расположения (рис.39).

Значительные количества гликогена наблюдались также в препаратах, приготовленных из печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс, забитых на девятые сутки после перевивки опухолевого штамма. Здесь имела место картина почти аналогичная той, которая наблюдалась при просмотре препаратов печени кроликов, обработанных в предыдущий срок исследования (рис.40). Гликоген обнаруживался в печени этих животных в виде очень плотных по окраске и крупных по размерам конгломератов, в отличие от диффузно расположенного в виде мелких, рассыпанных по всей протоплазме клетки, глыбок гликогена, обильно заполняющих клетки печени здоровых кроликов.

Однако, уже в следующий срок исследования, соответствующий одиннадцати суткам развития опухолевого процесса, ни у одного подопытного животного не удавалось обнаружить таких больших количеств гликогена в печени, какие наблюдались через семь или девять суток развития карциномы Броуна-Пирс в организме кролика. У кроликов, забитых на одиннадцатый день после перевивки опухолевого штамма, расположение гликогена в печени характеризовалось резко выраженной очаговой локализацией компактных крупных зерен гликогена, которые располагались в ткани печени, прилегающей к центральным венам (рис.41). Следовательно, при дальнейшем развитии опухолевого процесса накопившийся в клетках печени гликоген вновь исчезал из клеток печени. Об этом же свидетельствовали данные исследования гистохимических препаратов печени кроликов, пораженных карциномой Броуна-Пирс, забитых через тринадцать и пятнадцать суток после перевивки

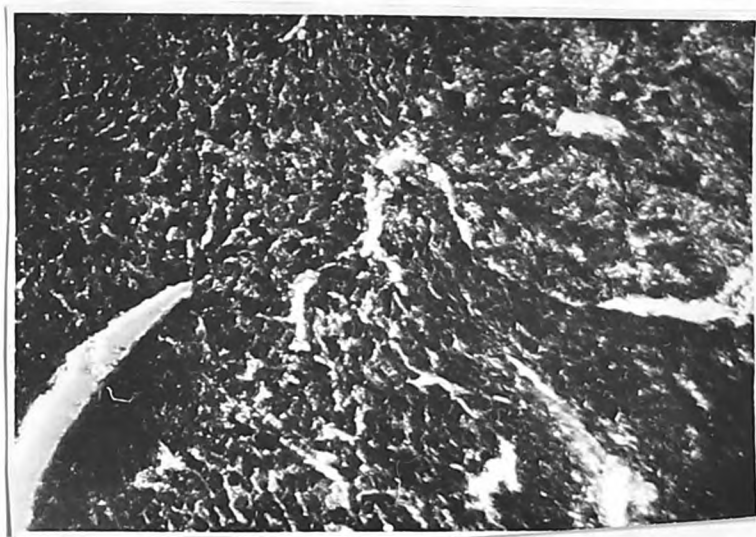


Рис. 39. Микрофотография печени кролика, забитого через 7 суток после пересадки карциномы Броуна-Пирса. Окраска по А.Л.Шабадашу. Увеличение $\times 240$.

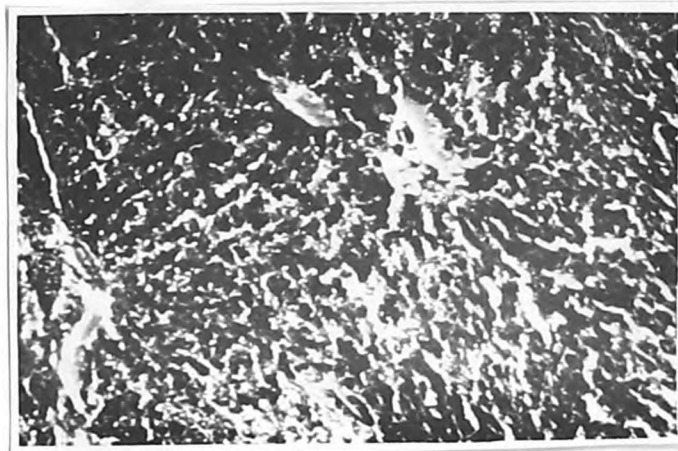


Рис. 40. Микрофотография печени кролика, забитого через 9 суток после пересадки карциномы Броуна-Пирса. Окраска по А.Л.Шабадашу. Увеличение $\times 240$.

опухолевого штамма. В эти сроки развития заболевания в печени подопытных животных обнаруживались еще меньшие количества исследуемого полисахарида, который наблюдался иногда в виде единичных, четко контурируемых крупных зерен, разбросанных по ткани печени в большей или меньшей концентрации (рис. 42 и 43). В некоторых препаратах в эти сроки исследования гликоген в печени отсутствовал.

В последующие сроки развития заболевания, когда опухолевый процесс поражал уже многие внутренние органы животного, из печени, непосредственно не пораженной злокачественным новообразованием, исчезали и те незначительные количества гликогена, которые определялись гистохимически на предшествующих этапах заболевания. Об этом свидетельствует тот факт, что при гистохимическом определении гликогена в печени кроликов, забитых через семнадцать суток после пассирования опухоли, интересующий нас полисахарид вообще не выявлялся. В этот период заболевания печеночная ткань практически была свободна от гликогена (рис. 44)

В более поздние сроки процесса канцеризации организма печень больных животных также не содержала гликогена, который не обнаруживался ни у одного подопытного животного даже в виде следов. У животных, погибавших или только что погибших от карциномы Броуна-Пирс, гликоген в печени всегда отсутствовал.

Параллельное изучение гликогена печени здоровых контрольных животных, проводимое на каждом этапе изучаемого процесса, свидетельствует о том, что наблюдаемые нами изменения содержания гликогена в печени у группы подопытных животных связаны с процессом канцеризации организма кроликов, поскольку количество и локализация гликогена в печени контрольных животных почти не изменялись на протяжении всего исследования.

Отсюда следует, что в процессе развития в организме животного злокачественного новообразования содержание гликогена в печени характеризуется определенной стадийностью, поскольку, как показали наши исследования, фаза низкого содержания гликогена в изучаемом органе на определенном этапе заболевания сменяется фазой с высоким содержанием гликогена в печени, после чего вновь начинается неуклонное падение содержания печеночного гликогена, вплоть до полного исчезновения этого полисахарида из печени больного животного.

Для того, чтобы проверить является ли обнаруженная стадийность в содержании гликогена в печени закономерной для организма, пораженного злокачественным новообразованием, мы провели дополнительные гистохимические исследования на мышках с карциномой Эрлиха, проследив динамику изменения содержания печеночного гликогена на значительно большем количестве животных. Результаты этих исследований даны нами в приложении.

Сопоставляя их с ранее полученными данными гистохимического исследования, характеризующими содержание гликогена в печени раковых кроликов мы обнаружили определенную аналогию в картине, наблюдаемой при изучении динамики содержания гликогена в печени белых мышей, пораженных карциномой Эрлиха, и кроликов с карциномой Броуна-Пирс. Как в том, так и в другом случае на смену значительному снижению количества гликогена в исследуемом органе приходило определенное увеличение содержания печеночного гликогена, что наблюдалось в различные сроки после перевивки опухоли, в зависимости от вида подопытного животного и разновидности пассируемого штамма карциномы. Однако, как у мышей, так и у кроликов, пораженных злокачественным новообразованием,

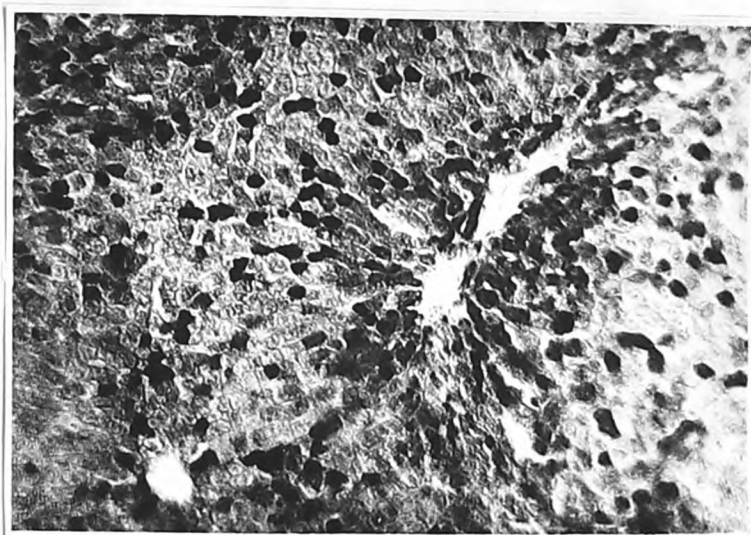


Рис. 41. Микрофотография печени кролика, забитого через II сутки после перевивки карциномы Броуна-Пирс. Окраска по А.Л. Шабадану. Увеличение $\times 240$.



Рис. 42. Микрофотография печени кролика, забитого через 13 суток после перевивки карциномы Броуна-Пирс. Окраска по А.Л. Шабадану. Увеличение $\times 240$.



Рис. 43. Микрофотография печени кролика, забитого через 15 суток после перевивки карциномы Броуна-Пирс. Окраска по Л.А. Шабадашу. Увеличение $\times 240$.

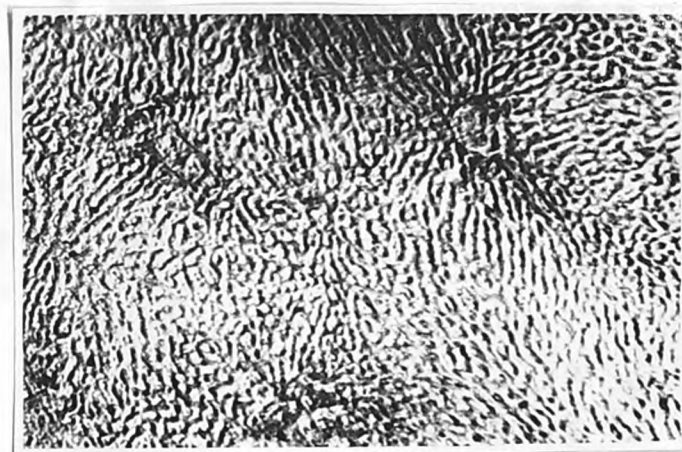


Рис. 44. Микрофотография печени кролика, забитого через 17 суток после перевивки карциномы Броуна-Пирс. Окраска по Л.А. Шабадашу. Увеличение $\times 240$.

накопление гликогена в печени, определяемое после исчезновения этого полисахарида из печени, наблюдалось на высоте развития заболевания, в период соответствующий приблизительно середине срока развития опухолевого процесса, если считать за полный срок протяженности заболевания время с момента пассивирования опухолевого штамма до момента гибели животного. Обнаруживаемый в этот период полисахарид в печени животных, пораженных карциномой, отличался по гистохимической картине от первоначально существующего в печени гликогена, исчезнувшего на первом этапе канцеризации организма. Но и этот вновь образованный в печени полисахарид очень скоро начинал исчезать из печени больных раком животных, и к моменту полного развития опухолевого процесса уже не обнаруживался в печени или же сохранялся в ней лишь в виде следов, чем и объясняется, по-видимому, разнородность данных различных авторов, изучавших содержание гликогена в печени животных, пораженных злокачественными новообразованиями.

В свете выяснения этого предположения мы решили данные, полученные для раковых животных гистохимическим методом исследования, сопоставить с соответствующими результатами количественного определения печеночного гликогена химическим методом. При этом, наблюдая довольно однотипную картину в динамике изменения гликогена в печени двух различных видов животных, пораженных злокачественными новообразованиями, при гистохимическом исследовании, мы решили при изучении динамики содержания печеночного гликогена с помощью химического метода ограничиться исследованием лишь одного вида животных, проведя эксперимент

на кроликах с привитой карциномой Броуна-Пирс, которые являлись основным объектом наших исследований.

С этой целью по методике Пфлюгера в модификации А.М.Генкина (1946) мы определяли количество гликогена в печени кроликов, которым была перевита карцинома Броуна-Пирс, начиная с третьего дня после пассирования штамма. В дальнейшем количество гликогена в печени подопытных животных определялось ежедневно, включая все последующие дни развития опухолевого процесса вплоть до гибели животных. Полученные данные сравнивались с результатами определения количества гликогена в печени здоровых контрольных кроликов.

Результаты проведенных исследований приводятся в таблице № 31. При сравнении полученных данных без всякой дополнительной обработки видно, что развитие карциномы Броуна-Пирс в организме кролика оказывает заметное влияние на количество гликогена в печени исследуемых животных. Здесь также, как при гистохимическом выявлении гликогена в печени больных раком животных наблюдалось вначале заметное уменьшение количества печеночного гликогена по сравнению с содержанием его в печени здоровых контрольных животных, когда количество гликогена в печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс, сильно варьируя в своем содержании, на третьи сутки после пассирования опухолевого штамма соответствовало в среднем 1,46%, на четвертые сутки - 0,92%, на пятые сутки - 1,14%, в то время, как средние величины, характеризующие содержание гликогена в печени здоровых контрольных животных, составляли соответственно 4,48%, 5,13% и 4,37%.

В дальнейшем обнаруживалось ясное повышение содержания этого полисахарида в исследуемом органе, что соответствовало шестым - девятым суткам развития опухолевого процесса. В период накопления гликогена в печени кроликов, пораженных карциномой Броуна-Пирс, содержание исследуемого полисахарида в печени характеризовалось сравнительно высокими цифрами, которые в ряде случаев наблюдались и при определении количества гликогена в печени здоровых кроликов. Однако данные, соответствующие средним величинам содержания гликогена в печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс во все сроки исследования, являлись более низкими, чем соответствующие данные, характеризующие количество гликогена в печени здоровых контрольных животных, обрабатываемых параллельно. Если содержание гликогена в печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс на шестые сутки исследования в среднем соответствовало 3,26%, на седьмые сутки - 3,26%, на восьмые сутки - 2,65%, на девятые сутки - 2,17%, то для здоровых контрольных животных эти цифры соответственно равны 4,49%, 4,15%, 3,25% и 4,25%.

Следовательно, количественный анализ содержания гликогена в печени кроликов, пораженных карциномой Броуна-Пирс, говорит о том, что несмотря на значительную концентрацию гликогена обнаруживаемого гистохимически в печени кроликов, переживавших данный период развития опухолевого процесса, количество интересующего нас полисахарида в исследуемом органе, как правило, не достигало величин, характеризующих содержание печеночного гликогена в норме. Вместе с тем такое содержание гликогена в печени наблюдалось короткий промежуток времени, поскольку в последующие дни развития опухолевого процесса начиналось

Таблица № 31

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ГЛИКОГЕНА В ПЕЧЕНИ КРОЛИКОВ
В ПРОЦЕССЕ РАЗВИТИЯ КАРЦИНОМЫ БРОУНА-ПИРС

Процентное содержание гликогена в печени кроликов	Срок развития карциномы Броуна-Пирс в сутках																				
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
раковых	2,62	0,32	0,50	3,72	6,66	2,38	1,24	1,25	0,88	2,04	0,46	0,96	0,27	0,18	0,22	0,21	0,17	0,18	0,15	0,16	0,18
	1,09	0,79	1,15	3,98	2,70	2,52	2,51	0,86	0,58	0,42	0,38	0,67	0,36	0,22	0,20	0,15	0,19	0,22	0,21	-	-
	1,24	2,00	0,36	2,32	2,94	3,74	2,20	1,94	0,98	0,29	0,42	0,32	0,19	0,20	0,15	0,21	0,20	0,21	-	-	-
	0,36	1,05	0,93	5,04	4,18	2,36	3,16	1,13	0,65	0,65	0,51	0,24	0,14	0,14	0,20	0,16	-	0,16	-	-	-
	2,12	0,43	2,80	1,25	2,85	2,25	1,75	0,63	0,80	0,34	0,23	0,53	0,22	0,21	0,18	-	-	-	-	-	-
средние	1,46	0,92	1,14	3,26	3,26	2,65	2,17	1,16	0,72	0,74	0,40	0,54	0,23	0,19	0,18	0,18	0,18	0,19	0,18	0,16	0,18
здоровых (контроль)	6,08	8,50	6,72	8,38	2,78	4,25	2,84	10,41	3,10	8,18	7,12	5,10	4,92	9,12	3,25	6,84	2,62	8,39	4,32	3,95	2,84
	3,06	2,90	1,13	3,09	3,26	2,16	3,93	2,14	4,25	3,28	4,33	3,12	2,20	6,18	5,30	3,21	3,08	2,76	3,08	-	-
	9,18	10,42	3,08	2,65	6,74	3,21	9,08	4,15	2,25	4,52	3,21	3,76	6,12	1,90	2,84	2,74	6,18	1,85	-	-	-
	1,86	1,62	8,38	6,94	3,86	3,76	1,90	1,78	2,85	2,94	6,96	2,79	3,01	4,12	4,16	3,22	-	3,06	-	-	-
	2,26	2,22	2,62	1,42	4,14	2,78	2,78	2,26	3,95	1,92	1,64	4,16	2,42	2,36	1,86	-	-	-	-	-	-
средние	4,48	5,13	4,37	4,48	4,15	3,25	4,25	4,15	3,28	4,17	4,65	3,78	3,73	4,73	3,48	4,00	3,96	4,01	3,70	3,95	2,84

быстрое и неуклонное падение количества исследуемого полисахарида в печени, достигающее к десятым суткам исследования в среднем 1,16%, к одиннадцатым суткам — 0,72%, к двенадцатым суткам — 0,74%, к тринадцатым суткам — 0,40%, к четырнадцатым суткам — 0,54%, к пятнадцатым суткам — 0,23%, к шестнадцатым суткам — 0,19% и на этих низких цифрах количество гликогена в печени держалось до момента гибели животных, в то время как у здоровых контрольных кроликов, обрабатываемых параллельно, эти цифры были соответственно равны в среднем — 4,15%, 3,28%, 4,17%, 4,65%, 3,78%, 3,73%, 4,73% и далее держались в тех же пределах на протяжении всего периода исследования.

При сравнении вышеприведенных результатов с данными гистохимического выявления гликогена в печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс обнаруживается одна и та же закономерность, характеризующаяся фазовостью изменения в содержании интересующего нас полисахарида в исследуемом органе. Полученные результаты дают основание считать, что при развитии в организме злокачественного новообразования нарушается углеводный обмен организма, вследствие чего изменяются процессы синтеза и распада одного из основных субстратов углеводного обмена — гликогена.

Нарушение процессов гликогенообразования в печени животных, пораженных злокачественным новообразованием, происходит на ранних стадиях канцеризации организма, о чем свидетельствует значительное обеднение печени гликогеном в первые дни после перевивки опухолевого штамма. Изменение скорости ферментативных реакций, ведущих к изменению количества гликогена в печени, что имеет место в этот период, является, очевидно, ответной

реакцией организма на введение опухолевого материала, когда организм мобилизует все возможные ресурсы на борьбу с вредоносным агентом, проникшим в организм. Уменьшение количества гликогена в печени является, по-видимому, следствием усиленного распада этого энергетически ценного полисахарида, который, вступая на путь гликолитического распада, не синтезируется вновь в той мере, в какой это имеет место в печени здорового животного.

Накопление гликогена в печени животных, пораженных раком, на последующих стадиях развития заболевания свидетельствует о количественном преобладании процессов синтеза над процессами распада исследуемого полисахарида. Однако процессы синтеза являются, по-видимому, неполноценными и не протекают так, как в здоровом организме, следствием чего является образование в печени гликогена, отличающегося по гистохимической картине от первоначального, а также от гликогена печени здоровых животных.

По мере поражения организма злокачественным новообразованием происходит дальнейшее извращение углеводного обмена, выражающееся в значительном повышении процессов гликогенолиза, что является в настоящее время установленным фактом. Этим, возможно, и объясняется последующее обеднение печени гликогеном, а также отсутствие его в печеночной ткани на последних этапах жизни погибающего от рака животного.

Таким образом, с помощью гистохимического метода исследования нам удалось выявить определенную закономерность в процессе изменения содержания гликогена в печени животных, пораженных злокачественным новообразованием, а также установить

наличие в их печеночной ткани гликогена, отличающегося по форме отложения от обычно наблюдаемого в печени здоровых животных. И не исключено, что компактные, резко контурируемые глыбки гликогена, обнаруженные нами при гистохимическом исследовании печени больных раком животных, есть результат отложения гликогенов, отличающихся структурой своих молекул от гликогена печени здоровых животных того же вида, а также от гликогена, существующего в печени больных животных, имеющегося в печени на ранних этапах заболевания.

У. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К настоящему времени накопилась обширная литература, освещающая вопросы, связанные с углеводным обменом организма, пораженного злокачественным новообразованием. Однако в публикуемых работах не нашли отражения результаты какого-либо рода исследований, посвященных изучению строения гликогенов, которые синтезируются в малигнизирующемся организме.

Вместе с тем молекулярная структура гликогенов привлекает все большее и большее внимание исследователей, изучающих патологические состояния, связанные с нарушением углеводного обмена, имеющие, в частности, наследственный характер. В связи с этим накапливается все большее количество фактов, повышающих интерес к этим полисахаридам, дающих основание считать, что значение этих веществ для животного организма, по-видимому, значительно шире и многообразнее, чем было известно до настоящего времени, вследствие чего поиски многих ученых направлены сейчас на изучение функций и путей превращения гликогена в здоровом организме и при некоторых патологических состояниях. Поэтому вполне оправданным является стремление исследовать структуру гликогена, образующегося^В больном организме, пораженном раковой болезнью, которая изучается в настоящее время огромным количеством представителей клинической и теоретической медицины всего мира.

Представляя собой важный субстрат углеводного обмена организма, гликоген, синтезируемый в тканях с помощью целого ряда ферментативных механизмов, а также постоянно распадающийся в них, по-видимому, не может оставаться неизменным при том

резком извращении углеводного обмена, которое имеет место при поражении организма злокачественным новообразованием. Отсутствие в литературе каких-либо данных, характеризующих гликогены, образующиеся в тканях опухолевого организма, естественно, выдвигает вопрос — имеются ли различия в структуре гликогенов, синтезированных в печени здорового животного и страдающего опухолевой болезнью, печень которого морфологически определяемым злокачественным новообразованием не поражена, но характеризуется сдвигами со стороны углеводного обмена, типичными для ракового больного. Мы полагали, что ответ на этот вопрос, независимо от того будет он положительным или отрицательным, имеет важное теоретическое значение и представляет собой задачу, достойную разрешения.

Поставленный вопрос о наличии возможных особенностей в структуре раковых гликогенов по сравнению с нормальными потребовал для своего решения постановки эксперимента с применением широкого круга различных методов исследования, результаты которых представлены в предыдущих главах настоящей работы.

Стремясь к выполнению поставленной перед собой задачи, мы использовали в своей работе энзиматический метод, включивший в себя изучение кинетики процесса бета-амилолиза интересующих нас полисахаридов, в сочетании с абсорбционным методом построения йод-гликогеновых кривых, полученных как результат фотометрирования, что позволило нам судить о длине наружных ветвей молекул исследуемых гликогенов на основании данных двух совершенно различных методов исследования. Определение длины наружных и внутренних ветвей молекул изучаемых гликогенов

в сочетании с определением их величины, единицы цепи с помощью химических методов исследования дало нам возможность составить еще более ясное представление о структуре этих полисахаридов, которое было дополнено затем изучением типа связей между глюкозными остатками в их молекулах. Проведенный далее хроматографический и электронно-микроскопический анализ изучаемых нами гликогенов, а также гистохимическое исследование динамики их содержания в печени подошвчатых животных, позволили прийти нам к определенному суждению о структуре гликогенов печени животных, пораженных злокачественным новообразованием. Поскольку работа проводилась в основном на кроликах с карциномой Броуна-Пирс, которые забивались на определенных этапах развития опухолевого процесса, а параллельно всегда обрабатывались здоровые контрольные кролики, содержащиеся в аналогичных условиях, мы имели возможность сравнить структуру гликогенов печени кроликов, пораженных опухолью, со структурой соответствующих полисахаридов, образующихся в печени здоровых животных того же вида. Объективность сравнения показателей, характеризующих структуру гликогенов печени здоровых и раковых кроликов, была обусловлена тем, что во всех случаях исследованию подвергались лишь те гликогены, которые, будучи выделены из печени животных и тщательно очищены, могли быть охарактеризованы как химически чистые вещества, что контролировалось путем анализа полученных препаратов на содержание в них азота и фосфора.

Из этих препаратов, доведенных до постоянного веса, хранящихся в эксикаторах над фосфорным ангидридом, готовились водные растворы гликогенов, концентрация которых определялась

целями предстоящего анализа, но всегда концентрация гликогена, выделенного из печени здоровых животных, точно соответствовала концентрации раствора гликогена, полученного из печени кролика с карциномой Броуна-Пирс, что обеспечивало возможность сравнения полученных данных, характеризующих структуру печеночных гликогенов опытной и контрольной группы животных. Проведенная наряду с этим обработка полученного материала с помощью различных методов вариационно-статистического анализа дала возможность судить о наличии или отсутствии достоверности различий сравниваемых показателей, что позволило правильно оценить полученные результаты и сделать соответствующие выводы.

Анализ полученных данных приводит нас к заключению, что при развитии в организме кролика карциномы Броуна-Пирс происходит изменение процессов синтеза гликогена в печени, непосредственно опухолью не пораженной, следствием чего является образование гликогенов, отличающихся по своей структуре от нормальных. Изменение структуры гликогена, синтезированного в печени больного раком животного проявляется прежде всего в том, что в сильно разветвленной молекуле исследуемого полисахарида образуются более короткие наружные ветви, чем в молекулах гликогена печени здоровых кроликов. Об этом говорит тот факт, что при действии на изучаемые полисахариды бета-амилазы процент расщепляемости гликогенов, полученных из печени больных раком животных, характеризуется, как правило, более низкими цифрами, чем соответствующие величины, найденные при бета-амилолизе контрольных препаратов.

Это различие в величине процента расщепляемости для раковых и контрольных препаратов, менее выраженное на начальных

этапах бета-амилолиза, все заметнее проявляется по мере протекания этого процесса. Если при 0,5-часовой инкубации средняя величина, характеризующая процент расщепляемости гликогенов, выделенных из печени больных животных, соответствует в среднем 21,1, а для соответствующих контрольных препаратов — 24,9, то после 24-часовой инкубации эти цифры соответственно равны 36,1 и 40,8.

Различие в степени бета-амилолиза раковых и контрольных препаратов гликогенов наблюдалось во все исследованные нами сроки инкубации, а проведенный вариационно-статистический анализ полученного материала подтверждает достоверность этих различий.

Меньшая степень бета-амилолиза, обнаруженная нами в случае действия бета-амилазы на гликогены печени раковых животных, указывает на различия в степени дисперсности исследуемых растворов и на наличие более коротких наружных ветвей в молекулах этих гликогенов по сравнению с наружными ветвями молекул гликогенов, полученных из печени здоровых животных, поскольку бета-амилаза может действовать лишь на наружные ветви сложной молекулы полисахарида, отщепляя от них молекулы мальтозы только до мест ветвления. При этом наблюдаемое в некоторых случаях отсутствие различий в расщепляемости гликогенов печени здоровых и раковых животных ни в коей мере не говорит об адекватности в строении их молекул, поскольку можно легко представить себе, что при наличии большого количества концевых ответвлений в молекуле эффект после действия бета-амилазы может оказаться тем же, что и в случае, когда число концевых ветвей молекул меньше, но длина их больше, так как суммарное число молекул

мальтозы, способное отщепиться от молекул гликогенов, в обоих случаях может оказаться одинаковым. Тем более, что детальное изучение кинетики процесса бета-амилолиза вновь убеждает нас в том, что гликогены, выделенные из печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс, имеют более короткие наружные ветви, чем гликогены, полученные из печени здоровых животных того же вида, о чем свидетельствует расположение полученных прямых, графически изображающих результаты математической обработки экспериментальных данных, отражающих степень расщепляемости исследуемых гликогенов бета-амилазы в процессе инкубации.

Изучение интересующих нас полисахаридов с помощью абсорбционного анализа с последующим фотометрированием полученных соединений гликогенов с йодом также приводит нас к заключению о том, что при развитии в организме кролика карциномы Броуна-Пирс в печени синтезируются гликогены с более короткими наружными ветвями, чем в норме, поскольку, максимум поглощения соединений этих гликогенов с йодом в основной своей массе смещается в коротковолновую часть спектра по сравнению с максимумом поглощения, установленным для соединений йода с контрольными препаратами гликогенов. Если при фотометрировании с йодом растворов гликогенов, полученных из печени здоровых кроликов, максимум поглощения света во всех случаях обнаруживался при эффективной длине волны светофильтра, равной 480 мк , то при фотометрировании с йодом в тех же условиях растворов гликогенов, выделенных из печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс, максимум абсорбции в этой части спектра наблюдается лишь в 39,3% случаев, а в 60,7% положение максимума абсорбции обнаруживалось при светофильтре с эффективной длиной волны, равной 450 мк .

При построении Иод-гликогеновых кривых по данным полученных экстинкций и соответствующих величин эффективной длины волн кривые соединений Иода с гликогенами печени раковых кроликов, как правило, располагались ниже, чем аналогичные кривые, полученные при исследовании гликогенов печени здоровых животных. Эта закономерность в расположении кривых, а также наблюдаемый сдвиг в максимуме поглощения, говорит о наличии укороченных наружных ветвей в молекулах гликогенов, синтезированных в печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс, что подтверждает данные, полученные при исследовании процесса бета-амилолиза интересующих нас полисахаридов.

Изучение соотношения между длиной наружных и внутренних ветвей в молекулах гликогенов печени здоровых и раковых кроликов вновь приводит нас к заключению о наличии некоторых структурных особенностей, характерных для гликогенов, образующихся в печени животных, пораженных злокачественным новообразованием. Об этом свидетельствует тот факт, что если гликогены, выделенные из печени здоровых кроликов, всегда имеют более длинные наружные ветви по сравнению с внутренними, то при исследовании гликогенов, извлеченных из печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс, такой закономерности не обнаруживается. Преобладание длины наружных ветвей над длиной внутренних в молекулах гликогенов, выделенных из печени раковых животных, наблюдается очень редко; чаще длина наружных ветвей соответствует длине внутренних или же внутренние ветви оказываются длиннее наружных.

Вариационно-статистический анализ имеющихся данных показал, что если для гликогенов печени здоровых кроликов обнаруживаются достоверные различия в длине наружных и внутренних

ветвей, то при аналогичной обработке данных, характеризующих длину наружных и внутренних ветвей в гликогенах печени раковых животных, достоверные различия отсутствуют. Полученные результаты, подтвержденные двумя способами обработки материала, в сочетании с полученными ранее данными об укорочении наружных ветвей в молекулах гликогенов печени раковых животных, склонили нас к мысли о том, что гликогены, выделенные из печени здоровых и раковых животных, отличаются друг от друга по длине наружных ветвей, в то время, как в длине внутренних ветвей при сравнении этих двух групп полисахаридов существенных отличий не обнаруживается. Укороченная длина наружных ветвей молекул гликогенов печени раковых кроликов, по-видимому, приближается к длине внутренних ветвей разветвленной структуры, что вытекает из результатов вариационно-статистического анализа, при котором мы не обнаружили существенных отличий, как при сравнении величин, характеризующих длину наружных и внутренних ветвей гликогенов печени раковых животных, так и при сравнении длин внутренних ветвей гликогенов, выделенных из печени здоровых и раковых животных.

Это указывает на то, что изучаемые нами группы полисахаридов в значительной степени отличаются друг от друга по структуре своих молекул, что говорит о нарушении процессов, участвующих в обмене печеночного гликогена при развитии в организме злокачественного новообразования. Об этом же свидетельствуют результаты наших исследований, полученные при определении средней величины единицы цепи интересующих нас полисахаридов. Из данных этой серии опытов следует, что величина единицы цепи гликогенов, синтезируемых в печени кроликов с привитой карци-

номой Броуна-Пирс, характеризуется меньшими цифрами, чем единица цепи гликогенов печени здоровых кроликов, что подтверждается методами вариационно-статистического анализа. А поскольку средняя единица цепи полисахаридов представляет собой величину, показывающую число глюкозных остатков, приходящееся на каждый концевой неальдегидный конец, и число этих концов в сильно разветвленных полисахаридах практически равняется количеству точек ветвления, эта величина может дать представление о степени ветвления полисахарида, так как единица цепи и степень ветвления являются величинами обратными друг другу. Поэтому, обнаружив статистически достоверное уменьшение величины единицы цепи для гликогенов печени раковых животных, мы пришли к заключению, что они характеризуются большей степенью ветвления, чем гликогены, образованные в печени здоровых животных.

Следовательно, в процессе малигнизации организма в печени больного животного синтезируются более разветвленные молекулы гликогена, чем в норме, имеющие вместе с тем укороченные наружные ветви, что свидетельствует о наличии структурных особенностей в их молекулах. Дополнительным доказательством увеличения степени ветвления молекул гликогенов, образующихся в печени ракового животного, является увеличение процентного содержания α -1,6-связей между глюкозными остатками в этих полисахаридах по сравнению с содержанием этих связей в гликогенах, полученных из печени здоровых животных. Поскольку α -1,6-связи образуют точки ветвления в полисахаридах, естественно, что увеличение их количества говорит о наличии более разветвленной структуры молекулы исследуемого вещества.

О большей степени ветвления гликогенов, выделенных из печени животных, пораженных злокачественным новообразованием, свидетельствуют и результаты сравнения данных хроматографического анализа, характеризующих содержание изомальтозы в гидролизатах препаратов гликогенов печени здоровых и раковых кроликов. Согласно этим данным при кислотном гидролизе печеночных гликогенов раковых кроликов содержание изомальтозы в гидролизате нарастает быстрее, чем в случае гидролиза нормальных препаратов гликогенов. Быстрее также достигается максимум содержания изомальтозы, который, как правило, превышает таковой, находящийся в гидролизатах гликогенов печени здоровых животных, что указывает на более высокое содержание α -1,6-связей в молекулах гликогенов, синтезируемых в печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс, по сравнению с гликогенами печени здоровых животных.

Вместе с тем на начальных этапах гидролиза гликогенов печени раковых животных наблюдается более интенсивное нарастание количества мальтозы и глюкозы, чем это имеет место в случае гидролиза контрольных препаратов гликогенов. При этом мальтоза, быстрее достигая максимального содержания, начинает быстрее и разрушаться, чем это наблюдается в контрольных гидролизатах, где нарастание количества мальтозы, хотя и происходит медленнее, но достигает более высоких цифр. Вероятно, это объясняется тем, что при гидролизе патологических гликогенов имеются лучшие условия для отщепления мальтозы, однако эти возможности ограничены в количественном отношении, так как максимальное содержание мальтозы в раковых гидролизатах никогда не достигает цифр, характеризующих количество мальтозы, образующейся при гидролизе нормальных гликогенов.

Эти данные с нашей точки зрения вновь подтверждают наличие более разветвленной структуры молекул гликогена, образующегося в печени больных раком животных, поскольку большая степень ветвления полисахарида создает лучшие условия для отщепления большего количества мальтозы со стороны концевых глюкозных остатков молекулы. Этим же можно объяснить и более быстрое нарастание глюкозы на начальных этапах процесса гидролиза раковых гликогенов по сравнению с увеличением количества этого моносахарида в контрольных гидролизатах, в которых тем не менее максимум содержания глюкозы всегда был выше, несмотря на то, что процесс нарастания глюкозы здесь происходил медленнее, чем при гидролизе препаратов гликогенов, выделенных из печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс. Следовательно, приведенные данные хроматографического анализа исследуемых гликогенов вновь подтверждают положение о том, что гликогены, синтезируемые в печени животных, пораженных злокачественным новообразованием, имеют более разветвленную структуру молекул, чем гликогены, образующиеся в печени здоровых кроликов. Об этом свидетельствуют как косвенные данные, касающиеся содержания мальтозы и глюкозы в исследуемых гидролизатах, так и повышенное содержание изомальтозы в гидролизатах раковых гликогенов, что является прямым доказательством увеличения содержания α -1,6-связей в молекулах этих полисахаридов по сравнению с нормой.

Статистически достоверное увеличение количества α -1,6-связей в гликогенах печени раковых животных обнаруживалось нами и с помощью химического метода исследования этих связей, которые представляют собой связи ветвления, дающие возможность судить о разветвленности того или иного полисахарида.

При этом оказалось, что вместе с увеличением количества связей ветвления в молекулах гликогенов печени раковых животных обнаруживается снижение процентного содержания α -1,4-связей по сравнению с соответствующими показателями, найденными при анализе гликогенов печени здоровых кроликов. Это уменьшение количества α -1,4-связей между глюкозными остатками в изучаемых полисахаридах, является, вероятно, следствием укорочения длины наружных ветвей их молекул, что имеет место в гликогенах печени опухолевых животных.

В ряде случаев уменьшение количества α -1,4-связей в полисахаридных молекулах таких препаратов, вероятно, связано с замещением их какими то другими связями, которые образуются между глюкозными остатками при извращенном синтезе гликогенов в печени животных, пораженных злокачественным новообразованием. О том, что это, по-видимому, так говорит наличие в целом ряде препаратов раковых гликогенов значительного количества каких-то связей, не являющихся ни α -1,6- ни α -1,4-связями, чего никогда не удавалось наблюдать при изучении типа связей между глюкозными остатками в молекулах гликогенов печени здоровых кроликов, у которых, если и обнаруживались такие связи, то количество их характеризовалось очень низкими цифрами. Эти факты свидетельствуют о значительном разнообразии в структуре гликогенов, образующихся в печени раковых животных, что является следствием нарушения процессов, обеспечивающих их синтез.

В результате этого в печени раковых животных образуются молекулы гликогенов, которые, наряду с более высокой степенью ветвления и некоторым укорочением наружных ветвей, обладают еще более существенными особенностями строения, что выражается в

изменении соотношения между различными связями, соединяющими глюкозные остатки в полисахаридной молекуле, и в появлении каких-то других связей, содержание которых характеризуется иногда довольно высокими цифрами.

Все это говорит о значительном разнообразии структуры молекул гликогенов печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс по сравнению с соответствующими контрольными препаратами гликогенов, что подтверждается также результатами, полученными при вариационно-статистической обработке материала. Количественные данные, характеризующие величину показателя степени разнообразия изучаемых признаков, во всех случаях были большими при анализе материала, полученного при изучении гликогенов печени раковых животных, чем при соответствующей обработке результатов исследования контрольной серии препаратов. Найденные величины показателя степени разнообразия оказались для раковых гликогенов в 1,3-2,2 раза большими, чем для гликогенов печени здоровых кроликов, в случае исследования типа связей между глюкозными остатками в молекулах этих полисахаридов. Такая же закономерность наблюдалась при изучении процесса бета-амилолиза, где в качестве субстрата действия фермента использовались гликогены печени здоровых и раковых животных. В различные сроки исследования величина показателя степени разнообразия для бета-амилолиза, протекающего с гликогенами печени животных, пораженных злокачественным новообразованием, была в 1,2-1,6 раза выше, чем в контрольных сериях опытов.

Все это подтверждает наличие большего разнообразия в строении полисахаридной молекулы, образующейся в результате нарушения синтетических процессов в печени больного раком

животного по сравнению с соответствующими структурами, образующимися в этом органе в норме.

Ярким доказательством этого положения являются также данные, полученные нами с помощью электронно-микроскопического метода исследования. Изучая растворы интересующих нас полисахаридов с помощью электронного микроскопа, мы убедились в том, что исследуемое вещество находится в виде довольно сложных ассоциатов, имеющих самую разнообразную конфигурацию, которая в случае исследования гликогенов, выделенных из печени кроликов, пораженных карциномой Броуна-Пирс, характеризуется большими размерами и значительно более выраженным многообразием форм по сравнению с контрольными препаратами. Вместе с тем ассоциаты, образованные из гликогенов печени здоровых животных, характеризуются как правило большей упорядоченностью формы и меньшими размерами, чем соответствующие структуры, наблюдаемые в растворах, полученных из гликогенов печени раковых животных. Однако основным отличительным признаком этих двух групп исследуемых препаратов является величина частиц, из которых образованы ассоциаты. Эти частицы, имеющие в обоих случаях округлую форму, при исследовании гликогенов, выделенных из печени здоровых кроликов, имели диаметр порядка 1000 \AA , в то время как при просмотре препаратов гликогенов печени раковых животных, мы всегда наблюдали крупные беспорядочные ассоциаты, состоящие из более мелких образований.

Как показали эти исследования, частицы, составляющие вышеописанные ассоциаты, не являются однородными по строению, а состоят в свою очередь из более мелких образований, представляющих собой структурные элементы, лежащие в основе всех этих сложных ассоциатов.

Надо полагать, что именно эти структуры и являются теми молекулярными единицами, которые представляют собой многократно ветвящиеся полисахаридные цепи, образованные из глюкозных остатков, соединенных между собой α -1,4-, α -1,6- и некоторыми другими гликозидными связями. Как показали наши исследования, величина этих структур для гликогенов печени здоровых кроликов колеблется от 150 до 200 Å, что согласуется с литературными данными о том, что сильно разветвленные молекулы гликогена имеют форму, близкую к сферической с диаметром 100 Å и более.

Изучение гликогенов, выделенных из печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс, показывает, что в этом случае полисахаридные ассоциаты, образованные из частиц меньших размеров, настолько контрастны при просматривании, что в них не удастся рассмотреть первичные полисахаридные структуры, хотя и здесь они, вероятно, имеются, представляя собой настолько мелкие и компактные образования, что при данной разрешающей способности микроскопа не представляется возможным обнаружить границ их соприкосновения друг с другом.

Обоснование такого предположения базируется на приводимых выше данных о наличии укороченных наружных ветвей и большей степени ветвления раковых гликогенов, благодаря чему молекулы этих полисахаридов могут образовывать значительно более компактные и уплотненные субединицы по сравнению с теми, которые получают из гликогенов печени здоровых кроликов, имеющих менее разветвленную структуру молекул, характеризующуюся более длинными наружными ветвями, что создает условия для образования более рыхлых субединиц.

Это обстоятельство, вероятно, и является причиной того, что при просмотре препаратов гликогенов печени раковых животных не удается обнаружить тех первичных полисахаридных структур, которые ясно видны при исследовании препаратов гликогенов печени здоровых животных. Наблюдаемая электронно-микроскопическая картина является новым доказательством того, что гликогены, синтезируемые в печени животных, пораженных злокачественным новообразованием, отличаются по своей структуре от соответствующих полисахаридов, выделенных из печени здоровых животных. При этом следствием изменения строения основных высокомолекулярных субединиц исследуемого вещества является построение иных вторичных структур в растворах раковых гликогенов, что выразилось в наших исследованиях в усилении контрастности частиц, образующих полисахаридные ассоциаты, а также в изменении формы и размеров последних. При этом образованием крупных, беспорядочно нагроможденных ассоциатов, несомненно, обусловлено получение значительно более мутных растворов при растворении гликогенов печени раковых животных, по сравнению с растворами гликогенов печени здоровых кроликов, имеющих более мелкие и упорядоченные ассоциаты, состоящие из более крупных, но менее плотных частиц.

В пользу существования различий в структуре гликогенов печени здоровых и раковых животных говорят также различные условия кристаллизации этих полисахаридов, а возможно и наличие различных кристаллических форм, способных образовываться в случае исследования гликогенов, выделенных из печени здоровых животных и пораженных карциномой Броуна-Пирс.

Надо полагать, что и в органе, где образуется этот полисахарид, изменение первичной структуры, возникающее в результате нарушения энзиматических процессов, участвующих в синтезе гликогенов, может приводить к возникновению различных вторичных структур, образующих ассоциаты, конфигурация которых будет зависеть от первичной молекулярной структуры вещества, входящего в них. Строение и конфигурация этих ассоциатов, находящихся в клетке, возможно, и определяет картину тех отложений, в виде которых гликоген обнаруживается в тканях животного организма, заполняя его клетки в большей или меньшей степени.

В пользу высказанного предположения достаточно убедительно говорят результаты гистохимического исследования гликогена печени кроликов в процессе развития карциномы Броуна-Пирс, сравниваемые с соответствующими данными, полученными при изучении печени здоровых животных того же вида. При анализе данных этих исследований выяснилось, что содержание гликогенов в клетках печени животных, пораженных вышеуказанным злокачественным новообразованием, сильно меняется в различные периоды заболевания, характеризуясь тем, что фаза низкого содержания гликогена в этом органе на определенном этапе заболевания сменяется фазой повышения количества исследуемого полисахарида в нем, после чего вновь происходит неуклонное падение содержания печеночного гликогена вплоть до полного исчезновения его из печени больного животного. При этом в период накопления исследуемого полисахарида в клетках печени, что наблюдается в самом разгаре заболевания,

обнаруживается гликоген, заметно отличающийся по гистохимической картине от того, который имелся в печени на более ранних этапах заболевания, а также от гликогена печени здоровых контрольных животных. Если в норме или в первые дни после перевивки кроликам опухолевого штамма гликоген диффузно заполняет все печеночные клетки, равномерно располагаясь в них в виде мелких, близко лежащих друг к другу образований, то в период, характеризующейся новым накоплением гликогена в печени больных раком животных, исследуемый полисахарид обнаруживается в виде очень плотных по окраске и крупных по размерам конгломератов.

Компактность полисахаридной структуры, наблюдаемая с этого периода, продолжает обнаруживаться гистохимическим методом и на последующих этапах заболевания, несмотря на то, что содержание гликогена в печени по мере канцеризации организма постепенно уменьшается. И даже тогда, когда он остается лишь только в клетках, непосредственно прилегающих к центральным венам печени, он обнаруживается там в виде компактных, четко контурируемых зерен.

Такая компактность отложения гликогена в клетках печени опухолевого организма, вероятно, связана с тем, что сильно разветвленные молекулы этого полисахарида, имеющие укороченные наружные ветви, тесно соприкосаясь друг с другом создают достаточно плотные ассоциаты молекул, которые затем соединяются вместе, образуя соответственно плотные отложения, наблюдаемые при гистохимическом исследовании препаратов. Гликогены же печени здоровых животных, имеющие более рыхлую структуру молекул за счет меньшей степени ветвления и более длинных наружных

ветвей, не образуют настолько плотных ассоциатов, вследствие чего из них не могут получаться компактные образования, а поэтому при гистохимическом исследовании этих препаратов мы видим менее контрастные глыбки гликогена, которые, не образуя плотных зерен, диффузно заполняют клетки печени.

Следовательно данные гистохимического исследования гликогенов вновь подтверждают положение о том, что в процессе развития в животном организме злокачественного новообразования нарушаются процессы, обеспечивающие синтез этого полисахарида в печени, что приводит к образованию гликогенов, обладающих иными свойствами, чем в норме. Надо полагать, что нарушение процессов, ведущих к изменению структуры синтезируемых в печени гликогенов, происходит не сразу после перевивки животному опухолевого штамма. В начале процесса канцеризации организма наблюдается лишь изменение скорости ферментативных реакций, ведущих к изменению количества гликогена в печени, что приводит к значительному обеднению печени гликогеном в первые дни после перевивки опухолевого штамма, что является, вероятно, ответной реакцией организма на введение опухолевого материала, когда организм мобилизует все возможные ресурсы на борьбу с вредоносным агентом, проникшим в него. И только позже, в период появления в организме видимых опухолевых разрастаний, в печени животного вновь накапливается гликоген, который по своей структуре отличается от исчезнувшего на предыдущих этапах развития заболевания. Об этом свидетельствует описанное выше изменение гистохимической картины, отражающей локализацию гликогена и насыщенность им клеток печени больного раком животного во все

последующие стадии развития опухолевого процесса, а также изучение динамики изменения некоторых показателей, характеризующих структуру гликогенов печени животных, пораженных злокачественным новообразованием.

В частности, изучение величины единицы цепи гликогенов, выделенных из печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс на различных этапах канцеризации организма, показывает, что в первые дни после перевивки опухолевого штамма не обнаруживается различий в величине этого показателя, найденного для препаратов гликогенов, выделенных из печени животных опытной^{II} контрольной группы. Однако по мере прогрессирования болезни наблюдаемая картина существенно изменяется, и сравнение изучаемых показателей, характеризующих величину единицы цепи, начинает указывать на наличие статистически достоверных различий в сравниваемых показателях, найденных для гликогенов печени здоровых и раковых животных, что соответствует 6-8 дню заболевания, когда при вскрытии животных обнаруживаются уже морфологически определяемые опухолевые разрастания.

Дальнейшее развитие опухолевого процесса характеризуется увеличением критерия достоверности различий величин единицы цепи, определяемых для гликогенов печени здоровых и раковых кроликов, что указывает на различие в структуре исследуемых полисахаридов, проявляющиеся все в большей степени по мере канцеризации организма.

Все это говорит о том, что развитие в организме злокачественного новообразования оказывает существенное влияние на процессы, осуществляющие синтез и распад гликогена в печени непосредственно опухоли не пораженной.

— Наблюдаемое уменьшение количества гликогена в этом органе на первых этапах развития опухолевого процесса является, по-видимому, следствием усиленного распада этого энергетически ценного полисахарида, который вступает на путь гликолитического распада, значительно более выраженного, чем в норме, поскольку высокая интенсивность этого процесса является характерной чертой для ткани печени опухолевого животного, что является в настоящее время установленным фактом.

Последующее накопление гликогена в печени животных, пораженных раком, свидетельствует о количественном преобладании процессов синтеза над процессами распада исследуемого полисахарида, несмотря на то, что интенсивность процесса гликогенолиза продолжает оставаться высокой. Такое состояние можно представить себе при условии, если высокая активность гликолитических ферментов печени будет сочетаться с повышением активности ферментов, участвующих в синтезе гликогена, главным образом, уридиндифосфатглюкозы: α -1,4-глюкан- α -4-глюкозилтрансферазы (гликогенсинтетазы) и α -1,4-глюкан- α -1,4-глюкан-6-глюкозилтрансферазы (ветвящего фермента), а также α -1,4-глюкан: ортофосфатглюкозилтрансфераз (фосфорилаз) и трансгликозилаз нефосфоролитического типа.

Не исключено, что при высоком уровне гликогенолиза, активно действующие фосфорилазы, осуществляющие начало этого процесса, способствуют образованию высоких концентраций глюкозо-1-фосфата, избыточные количества которого, взаимодействуя с уридинтрифосфатом, дают уридиндифосфатглюкозу, являющуюся субстратом действия гликогенсинтетазы при наличии в среде затравочного гликогена.

В печени раковых животных на ранних этапах заболевания содержание гликогена в печени, хотя и снижается, но никогда он не исчезает полностью, а поэтому можно допустить, что при увеличении концентрации уридиндифосфатглюкозы начинается усиленный синтез гликогена под влиянием гликогенсинтетазы, переносящей глюкозильные остатки с уридиндифосфатглюкозы на затратный гликоген, имеющийся в печени, в результате чего обеспечивается образование α -1,4-связей в молекуле строящегося полисахарида. При этом в силу нарушения количественных соотношений субстратов могут измениться условия действия α -1,4-глюкан: α -1,4-глюкан-6-глюкозилтрансферазы, осуществляющей образование α -1,6-связей в молекулах гликогена. Возможно, что эти условия будут таковы, что активность ветвящего фермента повысится, в результате чего при синтезе молекулы гликогена будет образовываться большее количество α -1,6-связей, чем это имеет место в печеночной клетке здорового животного. Вследствие этого во вновь образующемся полисахариде будет повышенное содержание α -1,6-связей, представляющих собой точки ветвления в молекуле, которая при этих условиях, естественно, будет характеризоваться более высокой степенью ветвления, что мы и наблюдаем при исследовании гликогенов, выделенных из печени кроликов с карциномой Броуна-Пирса.

Не исключено также, что в организме, пораженном злокачественным новообразованием, в силу изменившихся условий среды происходит изменение активности трансгликозилаз нефосфоролитического типа, которые могут превращать α -1,4-связи в α -1,6-связи внутри молекулы полисахарида, а при межмолекулярном переносе глюкозильных остатков, разрывая α -1,4-связи, могут замыкать их в α -1,6-положении.

Естественно, что повышение активности такого рода ферментов в печеночных клетках больного раком животного также могут привести к увеличению количества точек ветвления в синтезируемом гликогене, который будет характеризоваться более высокой степенью ветвления, а также изменением степени полимеризации. А поскольку трансгликозилазы нефосфоролитического типа обладают способностью переносить гликозильные остатки ни одного вещества, а целого ряда веществ, диапазон их действия расширяется, что в ряде случаев, возможно, приводит к возникновению не только α -1,4- и α -1,6-связей в образующемся полисахариде, но и к тому, что первый углеродный атом глюкозы, участвующей в его синтезе, будет соединяться не с четвертым и не с шестым, а с каким-то другим углеродным атомом глюкозы затравочного гликогена, следствием чего может явиться образование или α -1,1-, или α -1,2-, или α -1,3-связей в молекуле синтезированного полисахарида, чем может быть и объясняется увеличение количества "прочих" связей, обнаруженное нами при изучении типа связей между глюкозными остатками в гликогенах печени животных, пораженных злокачественным новообразованием.

Изменение условий среды в печеночных клетках ракового животного может способствовать также повышению активности α -1,4-глюканглюкогидролаз (гамма-амилаз), которые обладают способностью отщеплять глюкозу от наружных ветвей полисахарида. Следствием высокой активности гамма-амилаз может явиться такое положение, при котором количество отщепляемых гликозильных остатков будет настолько большим, что процессы, осуществляющие синтез полиса-

харида, не смогут компенсировать их потерь, и если допустить, что такое соотношение в активности синтезирующих и отщепляющих глюкозу ферментов устанавливается в клетке как довольно стабильное, то при этих условиях можно представить себе образование молекул гликогена с укороченными наружными ветвями. Не исключено, что в печени животных, пораженных злокачественным новообразованием, создаются именно такие условия, благодаря чему при исследовании гликогенов, выделенных из печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс, мы обнаруживали более короткие наружные ветви, чем при изучении гликогенов печени здоровых контрольных животных.

Если это так, то в результате действия высокоактивных гамма-амилаз в клетках печени ракового животного будет накапливаться избыточное количество глюкозы, которая является субстратом гексокиназной реакции. Как известно, гексокиназа в опухолевом организме обладает высокой активностью, а следовательно при наличии аденозинтрифосфорной кислоты и высокой концентрации глюкозы в клетке усиливается гексокиназная реакция, приводящая к образованию глюкозо-6-фосфата, из которого под влиянием фосфо глюкомутазы образуется глюкозо-1-фосфат, являющийся субстратом для уридинтрифосфатного пути синтеза гликогена. Поэтому образовавшаяся в результате действия гамма-амилазы глюкоза может вновь быть использована для синтеза гликогена. Не исключено также, что она используется как субстрат для интенсивно протекающего гликолиза, характерного для тканей организма, пораженного злокачественным новообразованием. Вместе с тем нельзя исключить окисление образовавшейся глюкозы и в пентозофосфатном цикле, поскольку имеются указания на то,

что в опухолевом организме наблюдается преимущественное окисление первого углеродного атома глюкозы, сопровождающееся накоплением седогептулозы, а также обнаружены высокоактивные ферменты, участвующие в пентозофосфатном пути превращения глюкозы .

Надо полагать, что использование глюкозы тканями животного, пораженного злокачественным новообразованием, на разных стадиях заболевания происходит с преобладанием того или другого пути ее превращения. В период накопления гликогена в печени в большей степени, вероятно, выражены процессы, обеспечивающие синтез этого полисахарида, который хотя и извращен, но тем не менее приводит к увеличению количества измененного гликогена в печени.

По мере дальнейшего развития заболевания, по-видимому, начинают преобладать другие процессы превращения глюкозы, в частности гликолитический распад ее или же окисление в пентозофосфатном цикле. Вместе с тем в этот период, вероятно, снижается интенсивность всех процессов, осуществляющих синтез печеночного гликогена, что может быть связано с дальнейшим изменением условий для действия ферментов, участвующих в этих процессах. И не исключено, что сочетание такого положения с резко выраженным гликогенолизом, интенсивность которого повышается по мере канцеризации организма, приводит к постепенному уменьшению количества печеночного гликогена, который на определенном этапе развития заболевания вообще исчезает из печени и больше уже не образуется в ней на протяжении всей последующей жизни больного животного, погибающего в конце

концов от злокачественного новообразования.

Таким образом, проведенные нами исследования дают основание считать, что при развитии в организме кролика карциномы Броуна-Пирс происходят существенные сдвиги в углеводном обмене организма, о чем свидетельствует изменение структуры гликогенов, синтезируемых в печени больных животных, а также вполне определенные изменения в содержании этого полисахарида в исследуемом органе на протяжении всего периода заболевания, начиная с момента перевивки опухолевого штамма и кончая гибелью животного. Полученные нами данные о структурных особенностях гликогенов печени животных, пораженных злокачественным новообразованием, и динамике изменения их в процессе развития опухолевой болезни дополняют имеющиеся в литературе сведения о тех изменениях в углеводном обмене, которые имеют место при этом виде патологии, а следовательно в какой-то мере помогают приблизиться к познанию сущности этого коварного заболевания, что несомненно имеет определенное теоретическое значение, поскольку для того, чтобы понять сущность опухолевого роста, научиться предотвращать и прекращать его, необходимо изучить детали измененного обмена веществ больного организма, совокупность которых позволит в конце концов подойти к расшифровке процессов, лежащих в основе злокачественного перерождения.

Поэтому, установив в настоящей работе существование структурных особенностей в молекулах гликогенов, синтезируемых в печени животных, пораженных злокачественным новообразованием, мы поставили перед собой задачу в своих дальнейших исследова-

ниях выяснить причины, приводящие к их появлению, для чего изучить механизм синтеза интересующих нас полисахаридов путем исследования ферментов, участвующих в их образовании, об изменении активности которых сейчас мы можем говорить лишь в порядке предположения.

И не исключено, что при изучении этого вопроса будет установлено не только изменение активности тех или иных ферментов, участвующих в образовании гликогена, но окажется также доказанным факт изменения структуры некоторых из них, что вполне вероятно допустить, поскольку ферменты являются веществами белковой природы, а синтез белков при развитии в организме злокачественного новообразования извращается.

В свете высказанного предположения изучение этих вопросов представляет значительный интерес, так как в процессе их рассмотрения, несомненно должна выявиться взаимосвязь между углеводным и белковым обменом организма, страдающего опухолевой болезнью, что в совокупности с данными других исследователей будет приближать нас к раскрытию механизма канцерогенеза. А это является основной задачей, стоящей перед представителями всех специальностей, работающих в области онкологии.

УІ. В Ы В О Д Ы

1. Сопоставление данных, полученных в результате проведения ряда химических, физико-химических, физических, гистохимических и энзиматических исследований, с применением различных способов математической обработки полученного экспериментального материала позволило установить, что развитие в организме кролика карциномы Броуна-Пирс приводит к появлению некоторых структурных особенностей в молекулах гликогенов, синтезируемых в печени больных животных, по сравнению с соответствующими полисахаридами, образованными в печени здоровых животных того же вида.

2. Молекулы гликогенов печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс, имея разветвленный тип строения, подобный гликогенам печени здоровых животных, вместе с тем представляют собой более разветвленные структуры по сравнению с гликогенами печени здоровых кроликов, о чем свидетельствует уменьшение величины единицы цепи, а следовательно увеличение степени ветвления гликогенов, полученных из печени животных, пораженных злокачественным новообразованием.

3. Уменьшение величины единицы цепи гликогенов, выделенных из печени раковых животных, начинает обнаруживаться с шестого-восьмого дня развития карциномы Броуна-Пирс, что свидетельствует о появлении в этот период заболевания структурных особенностей в молекулах гликогенов, образующихся в печени этих животных.

4. По мере поражения организма злокачественным новообразованием структурные особенности гликогенов, синтезируемых в печени больных животных, выражающиеся в изменении величины единицы цепи, выявляются с все большей достоверностью, о чем говорят данные вариационно-статистического анализа, где критерий достоверности различий величин единицы цепи гликогенов печени здоровых и раковых животных неуклонно растет по мере увеличения срока заболевания.

5. В печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс образуются гликогены, имеющие большее содержание α -1,6-связей в молекулах, чем в норме, что подтверждает наличие более разветвленной структуры молекул гликогенов, синтезируемых в печени организма, больного раком, поскольку α -1,6-связи являются связями ветвления в этих полисахаридах.

6. В гликогенах печени раковых кроликов обнаружено пониженное содержание α -1,4-связей и нарастание количества "прочих" связей, что свидетельствует о появлении в молекулах этих полисахаридов каких-то структурных особенностей, возникающих в связи с развитием в организме кролика карциномы Броуна-Пирс.

7. Гликогены, выделенные из печени кроликов, пораженных карциномой Броуна-Пирс, характеризуются более короткими наружными ветвями в сильно разветвленной молекуле этого полисахарида по сравнению с наружными ветвями молекул гликогенов печени здоровых кроликов.

8. Гликогены печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс, отличаясь от соответствующих гликогенов печени здоровых животных по длине наружных ветвей молекул, не обнаруживают существенных отличий в длине внутренних ветвей разветвленных структур сравниваемых групп полисахаридов.

9. Укорочение наружных ветвей молекул гликогенов печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс приводит к тому, что в молекулах этих гликогенов в ряде случаев имеет место относительно большая длина внутренних ветвей по сравнению с наружными или же равенство их длин, чего никогда не наблюдается при исследовании гликогенов печени здоровых животных.

Поэтому в гликогенах печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс обнаруживается различное соотношение между длиной наружных и внутренних ветвей в молекулах, а при статистической обработке достоверных различий между длиной наружных и внутренних ветвей этих молекул не установлено, в то время как статистически достоверно, что молекулы гликогенов печени здоровых кроликов характеризуются более длинными наружными ветвями по сравнению с внутренними.

10. От соотношения длин наружных и внутренних цепей в молекулах полисахаридов зависит скорость реакции бета-амилолиза, поскольку константа скорости этой реакции для различных полисахаридов неодинакова, вследствие чего гликогены печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс характеризуются меньшей скоростью бета-амилолиза, чем гликогены печени здоровых животных.

II. Изучение кинетики процесса бета-амилолиза показало, что константа диссоциации полисахарид-бета-амилазного комплекса больше величины константы диссоциации мальтозно-бета-амилазного комплекса, что имеет место как при действии бета-амилазы на гликогены печени здоровых кроликов, так и пораженных карциномой Броуна-Пирс, в результате в том и другом случае процесс бета-амилолиза тормозится накоплением мальтозно-бета-амилазных комплексов, образование которых доказано кинетическим методом и подтверждено методом капиллярной хроматографии.

12. Для характеристики количественных изменений при бета-амилолизе гликогенов печени здоровых кроликов и с карциномой Броуна-Пирс пригодно уравнение: $\ln \frac{x_0}{x_0 - x} = a' + b' \frac{t}{x'}$, которое представляет собой уравнение прямой. Использование его свидетельствует о том, что прямые, полученные по результатам исследования гликогенов печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс, исходя из одной и той же точки, всегда располагаются ниже, чем соответствующие прямые, вычерченные для гликогенов печени здоровых кроликов, что свидетельствует о различиях в структуре исследуемых полисахаридов.

13. Различия в структуре гликогенов печени здоровых кроликов и пораженных карциномой Броуна-Пирс подтверждаются электронно-микроскопическими исследованиями, из которых следует, что ассоциаты, образующиеся в растворах гликогенов, полученных из печени животных, пораженных злокачественным новообразованием, являются более крупными и менее упорядочен-

ными, чем соответствующие ассоциаты, образующиеся в растворах гликогенов печени здоровых кроликов. При этом ассоциаты, наблюдаемые в растворах гликогенов печени здоровых животных характеризуются более крупными размерами составляющих их частиц, чем ассоциаты, получающиеся в растворах гликогенов, выделенных из печени больных раком животных.

14. С помощью электронной микроскопии установлено, что частицы, образующие ассоциаты в растворах, приготовленных из гликогенов печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс, настолько контрастны при исследовании, что в них не удастся различить первичные полисахаридные структуры, которые можно видеть в частицах, образующих ассоциаты растворов гликогенов печени здоровых кроликов. Это подтверждает положение о том, что в печени больных раком животных происходит синтез более разветвленных, более компактных молекул гликогена, чем в норме, что и создает условия, при которых просмотр препаратов гликогенов печени раковых животных не дает возможности обнаружить тех первичных полисахаридных структур, которые видны при исследовании препаратов гликогенов печени здоровых животных, имеющих более рыхлую структуру молекул, характеризующуюся меньшей степенью ветвления и более длинными наружными ветвями.

15. При электронно-микроскопическом исследовании гликогенов установлено, что процесс растворения этих полисахаридов в воде при температуре $+60^{\circ}\text{C}$ требует длительного времени, поскольку через 2-3 часа, несмотря на кажущуюся одно-

родность опалесцирующего раствора, в последнем еще не обнаруживаются ассоциаты, наблюдаемые через сутки после начала растворения гликогена, что необходимо учитывать при работе с растворами этого полисахарида.

16. Изучение растворов гликогенов под электронным микроскопом показало, что при определенных условиях возможна кристаллизация этих полисахаридов. Получающиеся при этом кристаллы представляют собой одну из форм существования гликогена, в которой может находиться этот полисахарид наряду с известной ранее аморфной формой, образующей опалесцирующий коллоидный раствор.

17. При гистохимическом определении гликогена в печени кроликов с привитой карциномой Броуна-Пирс обнаружены существенные изменения в содержании исследуемого полисахарида в связи с развитием в организме животного злокачественного новообразования. При этом изменения, найденные с помощью гистохимического метода исследования хорошо сочетаются с данными количественного определения гликогена в печени подопытных животных, указывая на то, что содержание гликогена в печени здоровых и раковых кроликов характеризуется значительными отличиями.

18. По данным количественного определения, а также гистохимического выявления гликогена в печени кроликов с карциномой Броуна-Пирс через сутки после перевивки опухолевого штамма и на протяжении последующих пяти суток обнаруживается значительно меньшее количество гликогена, чем в печени здоровых кроликов, исследуемых параллельно.

19. Дальнейшее развитие опухолевого процесса в организме приводит к увеличению содержания гликогена в печени животного, что обнаруживается через 7-9 суток после пассивирования штамма. Гликоген в этот период характеризуется компактностью и резкостью границ расположения, о чем свидетельствует гистохимическая картина, отличающаяся от наблюдаемой на начальных этапах развития заболевания, а также от картины, отражающей расположение гликогена в печени здоровых животных.

20. В более поздние сроки развития карциномы Броуна-Пирс вновь происходит уменьшение содержания гликогена в печени подопытных животных, что приводит к все более выраженному обеднению печени гликогеном, о чем убедительно говорят результаты, полученные как при гистохимическом изучении исследуемого органа, так и при количественном определении гликогена в нем.

21. Глубокое развитие опухолевого процесса, приводящее к тяжелому состоянию и гибели животных, сопровождается исчезновением печеночного гликогена, который не обнаруживается ни одним из примененных нами методов.

22. Проведенные исследования свидетельствуют о том, что при развитии в организме животного злокачественного новообразования нарушаются процессы гликогенообразования в печени, доказательством чего служит также образование редко встречающихся аномальных гликогенов, резко отличающихся по молекулярной структуре от других гликогенов печени раковых животных, а также от соответствующих полисахаридов, выделенных из печени здоровых животных.

УП. ЛИТЕРАТУРНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

1. Агол В.И.,
Медведкина О.А. - Фактор, усиливающий эффект Пастера и угнетающий эффект Кребтри в опухолевой клетке.
Биохимия, 1964, 29, 2, 338.
2. Аксамитная И.А. - О содержании гликогена, молочной кислоты и воды в ушах кроликов после смазывания каменноугольной смолой.
В сб. "X лет деятельности Ленингр. онкол. ин-та под ред. Петрова И.Н. и Холдина С.А.: 1938.
3. Аксамитная И.А. - Влияние голодания и введения глюкозы на содержание гликогена в опухоли.
Кандидатская диссертация, 1946.
4. Альперн Д.Е.,
Повелюжная З.Н. - Динамика гиперергического воспаления.
Архив патологии, анат. и патологич. физиол., 1935, 1, 4, 72.
5. Альперн Д.Е.,
Транквилимати Н.Н. - Гликоген плазмы и форменных элементов крови при гиперергической реакции.
Арх. пат. анат. пат. физиологии, 1936, 2, 6, 118.
6. Альперн Д.Е.,
Транквилимати Н.Н. - О значении гликогена в организме.
В кн. "Труды по вопросам патологии". Харьков, 1958, 13.
7. Андросов Я.С. - К вопросу о содержании гликогена в легочной ткани при нормальных и некоторых патологических условиях.
Кандидатская диссертация, 1935.
8. Андросов Я.С. - К вопросу о содержании гликогена в легких при нормальных и некоторых патологических условиях.
1936, Курск.
9. Архипов Н.И. - Гистохимические исследования нуклеиновых кислот, гликогена и липидов в легких при чуме свиней.
В сб. "Материалы Всес. конференции по вопросам вет. вирусологии", 1964, 184.
10. Афанасьева Е.И. - Исследования в области гликогенов и крахмалов.
Кандидатская диссертация, 1954.
11. Афанасьева Е.И.,
Степаненко Б.Н. - О видовых отличиях химического строения гликогенов.
Биохимия, 1956, 21, 5, 603.

12. Ачкасова Т.А. - Реакция отдаленных гликогеновых депо на охлаждение конечности у белых крыс. В кн. "Вопросы криопатологии", 1953, Москва, 113.
13. Баксова Р.А. - О химической природе эремурана полисахарида из корней эремуруса Регеля. Тезисы докл. отчетн. научн. конф. Московского фармакологического института, 1958, 25.
14. Белова А.П. - Влияние алиментарной белковой недостаточности на накопление гликогена в печени крыс. Кандидатская диссертация, 1949.
15. Белоусова А.К. - Изменение внутриклеточного распределения нуклеиновых кислот и белка в процессе малигнизации печени. Доклады АН СССР, 1954, 97, 1, 157.
16. Белоусова А.К., Атабекова Т.И. - Связь процессов синтеза нуклеиновых кислот в различных опухолях с особенностями их окислительного метаболизма. Биохимия, 1960, 25, 5, 901
17. Бердонгарова О.И. - Гистохимическое исследование гликогена сердечной мускулатуры в онтогенезе. Изв. АН КазССР, серия биол. н., 1964, 1, 82.
18. Бернар К. - Жизненные явления общие животным и растениям, 1878.
19. Бернштейн А.Д., Фетисова Г.В. - Может ли гликоген крови служить источником питания для тканей и клеток организма. Сборник научных трудов Ивановского мединститута за 1942-1944 гг., изд. 1945, 60.
20. Бернштейн А.Д. - Материалы к биохимии обмена углеводов в центральной нервной системе. Сообщение I. О содержании гликогена, молочной кислоты и сахара в крови сосудов мозга в нормальных условиях. Бюл. эксп. биол. и мед., 1948, 25, 1, 69.
21. Бернштейн А.Д. - Об участии легких в междоустьевом обмене углеводов. Бюл. эксп. биол. и мед., 1948, 26, 4, 315.
22. Бернштейн А.Д., Захаров С.В. - Происхождение и роль гликогена крови. Научные труды Ивановского мединститута за 1945 год, изд. 1949, 48.

23. Бернштейн А.Д., Халезова В.И. - Гликоген и сахар в спинномозговой жидкости при менингитах. Научные труды Ивановского гос.мед. института, 1949, 46.
24. Беслекоев Т.И. - Содержание гликогена в печени в состоянии агонии и смерти. Ученые записки 2-го Московского медицинского института, 1951, I, 146.
25. Богомолец А.А. - Руководство по патологической физиологии, 1941, 2, I.
26. Болотина Т.Т., Розенфельд Е.Л. - Электрофоретическое изучение гликогено-белковых комплексов. Доклады АН СССР, Новая серия, 1952, 87, 4, 634
27. Брайловский С.А., Генкин А.М. - Гликоген, сахар и молочная кислота в крови детей. Сообщение I. Содержание гликогена сахара и молочной кислоты у здоровых детей. Сов.педиатрия, 1936, II, 3.
28. Брайловский С.А., Генкин А.М. - Гликоген, сахар и молочная кислота в крови детей. Сообщение II. Содержание гликогена, сахара и молочной кислоты при катарральной желтухе (остром эпителиальном гепатите). Советская педиатрия, 1936, I2, 14.
29. Брайловский С.А., Генкин А.М. - Гликоген, сахар и молочная кислота в крови у детей. Сообщение III. Опыты с нагрузкой углеводами здоровых детей. Педиатрия, 1937, 7, 8.
30. Брайловский С.А., Генкин А.М. - Гликоген, сахар и молочная кислота в крови детей. Сообщение IV. Нагрузка сахарозой детей, больных острым эпителиальным гепатитом. Педиатрия, 1938, 2, 3.
31. Брейтбург А.М., Либерман А.Б. - Нейро-гуморальная регуляция процессов обмена веществ. Влияние пищевых режимов с ограничением и повышенным содержанием углеводов на соотношение между свободным и связанным гликогеном печени. Вопросы питания, 1940, 4, 23.
32. Брейтбург А.М., Либерман А.Б. - Влияние пищевых режимов с ограниченным и повышенным содержанием углеводов на соотношение между свободным и связанным гликогеном печени. Вопросы питания, 1940, 9,5, 23.

33. Брейтбург А.М. - Зависимость процессов гликогенолиза от наличия свободного гликогена в печени.
Физиологический журнал, 1941, 30, 5.
34. Брейтбург А.М. - Материалы к изучению механизма действия алиментарной белковой недостаточности.
Труды 7-го Всесоюзного съезда физиологов, биохимиков и фармакологов, 1949, 2, 771.
35. Бродская Н.И.,
Прохорова М.И.,
Тупикова З.Н. - Интенсивность обмена фракций гликогена в головном мозгу и печени при различных функциональных состояниях.
В кн. "Углеводы и углеводный обмен", 1962, 151.
36. Бывшук Н.С. - Сравнительное изучение изменений содержания гликогена в печени и скелетных мышцах под влиянием адреналина и норадреналина.
Вопросы мед. химии, 1963, 9, 4, 411.
37. Варбург О. - Обмен веществ раковой клетки.
Докл. 6 ноября 1924 г. в Рокфеллеровском ин-те в Нью-Йорке.
В кн. "О.Мейергофа "Химическая динамика жизненных явлений", 1926, 95.
38. Василевская Н.Л. - Распределение гликогена в слизистой оболочке матки беременной крольчихи.
В кн. "Рефлекторные реакции во взаимоотношениях материнского организма и плода", 1954.
39. Василевская Н.Л. - Содержание гликогена в мышце матки при различных ее функциональных состояниях.
Бюл. эксл. биол. и мед., 1954, 38, 10, 36.
40. Василевская Н.Л. - Содержание гликогена в мышце матки при нарушении ее сократительной функции.
Акушерство и гинекология, 1956, 1, 5.
41. Василевский - О влиянии различных температур воды, принимаемой в виде питья, охлаждения и согревания тел на образование гликогена.
Современный лечебник, 1874.
42. Васильева Н.Н. - Содержание гликогена в коже при нормальных и некоторых патологических состояниях.
Архив патологии, 1955, 17, 2, 50.
43. Вайнштейн С.С.,
Паталова А.А. - Гликогенная кривая и ее интерпретация.
Терапевтический архив, 1934, 12, 4, 33.

44. Вайнштейн С.С., - Гликогенная кривая и клиника желтух.
Паталова А.А. Терапевтический архив, 1934, 12, 4, 42
45. Вещезеров Н.И. - Влияние облучения ультракороткими радио-
волнами на содержание гликогена в печени
и мышцах.
Труды Всероссийской конференции патологов
1935.
46. Вилковский А.Л. - К проблеме участия легких в углеводном
обмене.
М., 1941.
47. Виноградова Н.И. - Изучение обмена гликогена мышц и печени
лягушек с помощью деаэтерия.
Докл.АН СССР, 1949, 69, 4, 565.
48. Виноградова Н.И., - Подная реакция гликогена при различных
Кобзева А.А. функциональных состояниях животного.
Доклады АН СССР, 1950, 73, 5, 983.
49. Владимиров А.Д., - Содержание уридиндифосфатглюкозы в лейко-
Сейц И.Ф. цитах здоровых и больных лейкозами людей.
Бюл.эксп.биол.и мед., 1964, 58, 10, 56.
50. Волянский З.М. - Влияние аскорбиновой кислоты на содержа-
ние гликогена печени при экспериментальных
ее поражениях.
Труды Военно-морской мед.Академии,
Ленинград, 1947, 8, 97.
51. Воскресенский К. - Гликоген лейкоцитов и его клиническое
значение.
Докторская диссертация, 1907.
52. Войнар О.И. - Влияние меди на содержание гликогена и
Галахова В.Я. липидов в печени.
Укр.биохим.ж., 1962, 34, 4, 504.
53. Габуния У.А. - Материалы по гистохимии гликогена в
опухолях молочной железы человека.
Архив патологии, 1961, 23, 6, 23.
54. Гаджиев И.А. - Значение гликогена крови для функций
Караев А.И., организма.
Мустафаев М., Доклады 7-го Всесоюзного съезда физио-
Эфендиева В. логов, биохимиков, фармакологов,
1947, 563.
55. Галахова В.Н. - Влияние тироксина на процессы гликогено-
образования.
Науч.зап.Станиславск.мед.ин-та, 1959,
3, 115.

56. Гасанов А. - Влияние гликогена и других полисахаридов на протеолиз
Азербайджанский мед. журнал, 1936, I, 43, 167.
57. Гельдштейн Э.М., Ачаркан А.С. - Динамика изменений гликогена печени и крови при экспериментальной аллергии.
Арх. пат. анат. пат. физиологии, 1937, 3, 4, 61
58. Генес С.Г. Макаревич-Гальперин Л.М., Ушенко С.Н. - Содержание гликогена в печени и мышцах у крыс в зависимости от времени после введения хлор-пропамида и длительности голодания.
Бюл. эксп. биол. и мед., 1961, 52, 7, 65.
59. Генес С.Г., Макаревич-Гальперин Л.М. - Зависимость содержания гликогена в печени и мышцах от длительности действия хлор-пропамида и от продолжительности пребывания животных без пищи.
Труды Украинского института экспериментальной эндокринологии, 1964, 19, 3.
60. Генкин А.М. - Содержание гликогена в форменных элементах и плазме крови. Влияние глюкозы, инсулина и адреналина.
Биохимия, 1938, 3, 4, 546.
61. Генкин А.М. - Гликоген крови при физиологических и патологических состояниях у детей.
1939.
62. Генкин А.М. - Содержание гликогена в цельной крови, форменных элементах и плазме детей и взрослых.
Бюл. эксп. биол. и мед., 1939, 7, 2-3, 213.
63. Генкин А.М. - Динамика гликогена крови у детей при крупозной пневмонии.
Бюл. эксп. биол. и мед., 1939, 7, 2-3, 216.
64. Генкин А.М. - Динамика гликогена в крови и его распределение между форменными элементами и плазмой при некоторых физиологических и патологических состояниях организмов.
Труды Свердловского гос. мед. института, 1939, 12, 27.
65. Генкин А.М. - Влияние инсулино-глюкозотерапии на распределение гликогена между форменными элементами и плазмой крови при остром гепатите у детей.
Педиатрия, 1939, 9-10, 3.

66. Генкин А.М. - Содержание гликогена в крови при физиологической беременности.
Труды Свердловского института охраны материнства и младенчества. 1940, 4, 89.
67. Генкин А.М. - К вопросу о фосфоролизе гликогена в печени.
Биохимия, 1946, II, 3, 211.
68. Генкин А.М. - О содержании свободного и связанного гликогена в органах животного организма.
Биохимия, 1946, 2, 2.
69. Генкин А.М. - Влияние пола, возраста, беременности и лактации на содержание свободного и связанного гликогена в печени и мышцах белых крыс.
Рефераты научно-исслед. работ по акушерству, гинекологии и педиатрии, 1949, Свердловск.
70. Генкин А.М. - О состоянии гликогена в печени.
Биохимия, 1953, 18, I, 7.
71. Генкин А.М. - Гликогено-белковые комплексы в печени и их биологическое значение.
Тезисы докладов I-й Уральской конференции физиологов, биохимиков, фармакологов, 1956, 18, Свердловск.
72. Генкин А.М. - Состояние гликогена в печени и его способность образовывать комплексы с белками.
Докторская диссертация, 1956.
73. Генкин А.М., Богомолов С.Г. - К вопросу о механизме взаимодействия между белками и гликогеном.
Тезисы докладов на годичной научной сессии Свердловского мединститута, 1956.
74. Головацкий И.Д. - О взаимосвязи пентозного цикла и гликолиза у животных, пораженных карциномой Броуна-Пирса.
Труды 8-го Международного противоракового конгресса, 1963, 2, 133.
75. Гончарова Е.Е. - О структуре гликогена мозга.
Докл. АН СССР, 1957, 112, 5, 899.
76. Гончарова Е.Е. - Некоторые данные о структуре гликогена мозга и полисахаридов, синтезированных *in vivo* ферментами мозга.
В сб. "3-я Всесоюзная конференция по биохимии нервной системы", 1963, 455.

77. Гончарова В.И. - Влияние бактериальных эндотоксинов на содержание гликогена в печени и защитная роль АКТГ и кортизона.
В сб. "Вопр. инфекц. патол. и эксперим. терапии инфекций". М., 1963, 64.
78. Горожанская Э.Г., Шапот В.С. - Особенности потребления глюкозы асцитными раковыми клетками
Докл. АН СССР, 1964, 155, 4, 947.
79. Гошева А.Е. - К вопросу о содержании гликогена в опухолях нейроэктодермальной природы.
Вопросы нейрохирургии, 1951, 15, 5, 12.
80. Гошева А.Е. - К вопросу об отложениях гликогена и липидов в нейроэктодермальных опухолях.
Кандидатская диссертация, 1953.
81. Гринштейн Д. - Биохимия рака, 1951.
82. Груздева К.Н. - Влияние некоторых аминокислот на содержание гликогена в печени при перививных раке и саркоме у мышей.
Кандидатская диссертация, 1953.
83. Груздева К.Н. - Динамика содержания гликогена в печени кроликов в процессе развития карциномы Броуна-Пирс.
Тр. Омского мед. ин-та, 1964, 54, 189.
84. Губин Г.Д., Оркина А.К. - Гистохимическое определение рибонуклеиновой кислоты и гликогена в тканях животных, находящихся в различных физиологических состояниях.
Доклады АН СССР, 1959, 125, 1, 185.
85. Гулий М.Ф., Коломийченко М.А. - К вопросу о характере взаимодействия между ферментом и полисахаридом в фосфо-рильной реакции.
Укр. биох. журнал. Киев, 1947, 19, 2, 147.
86. Даниахий М.А. - Гликоген в вагинальной слизи и его значение в биологии влагалища.
Журнал акуш. и жен. бол., 1930, 41, 1, 18.
87. Деток Е.С. - Гистохимия гликогена зародыша ранних стадий развития.
Вопросы морфологии Львовского гос. мед. ин-та, 1959, 209.
88. Дерновская М.Л. - О содержании гликогена в легочной ткани при фторидзависимой глюкозурии.
Физиологический журнал СССР, 1937, 20, 5, 725.
89. Дядоша Г.Ф. - Тканевой обмен в процессе канцеризации.
Мед. журнал АН УССР, 1937, 7, 1, 131.

90. Елин В. - О содержании гликогена в органах и в крови нормальных, сенсibilизированных и погибших от анафилактического шока морских свинок.
Физиологический журнал СССР, 1938, 24, 25, 921.
91. Ельцина Н.В. - Исследование тканевого дыхания печени при возникновении в ней опухолей, вызванных ортоаминоазотолуолом.
Бюл. эксп. биол. и мед., 1944, 17, 6.
92. Ельцина Н.В. - Энергетический обмен раковых клеток.
Биохимия, 1960, 25, 1, 135.
93. Ельцина Н.В.,
Вересотская Н.А. - О механизме действия дезоксирибозы на опухолевые клетки.
Биохимия, 1962, 27, 3, 452.
94. Мелудкова З.П. - Фракции гликогена в печени, мышцах и желточном мешке куриного зародыша.
Биохимия, 1963, 28, 1, 31.
95. Захаров С.В. - О содержании и распределении гликогена в крови при экспериментальной гипер- и гипогликемии.
Биохимия, 1941, 6, 3, 284.
96. Збарский И.Б. - Биохимические аспекты изучения проблемы рака.
В кн. "Вопросы клинической и эксперим. онкологии", 1957, 2, 96.
97. Збарский И.Б. - О некоторых итогах и путях дальнейшего изучения биохимии рака.
Вопросы онкологии, 1957, 3, 6, 753.
98. Збарский И.Б. - Белки опухолей и их обмен.
В кн. "Актуальные вопросы соврем. биохимии", 1959, 1, 233.
99. Збарский И.Б. - Значение биохимических особенностей ядерного аппарата опухолевой клетки в патогенезе рака.
Вестник Акад. мед. наук СССР, 1965, 4, 3.
100. Зильбер Л.А. - О вирусной этиологии раковой болезни.
Тр. 8-го Международного противоракового конгресса, 1963, 3, 17.
101. Зильбер Л.А.
Абелев Г.И. - Вирусология и иммунология рака.
1962

102. Зыков В.М.
Неняков Д.В. - К вопросу о биологической реакции живых тканей вообще и злокачественных новообразований в частности.
Новое в медицине, 1911, 5, 7.
103. Зыков В.М.
Неняков Д.В. - Некоторые данные о природе злокачественных новообразований.
Новое в медицине, 1912, 8, 449.
104. Зыков В.М.
Конилов А.П. - О биологической реакции живых тканей вообще и злокачественных новообразований в частности в связи с вопросом об окислительных процессах, происходящих в них.
Новое в медицине, 1913, 5, 18.
105. Иванов И.И.,
Пехтерева С.И.,
Затейщикова Н.О. - О механизме инактивирования гликолиза белковыми экстрактами из злокачественных опухолей.
Биохимия, 1949, 14, 6.
106. Иванов И.И.,
Пехтерева С.И.,
Цимблер М.Л. - О механизме инактивирования кофермента гликолиза белковыми экстрактами из злокачественных опухолей человека.
Докл. Акад. наук СССР, 1949, 67, 6.
107. Кавецкий Р.Е. - До питания про тканину обмен при питанию.
Журн. мед. науки ВУАН, 1931, 1, 72.
108. Кавецкий Р.Е. - К вопросу о феномене канцеролиза и его значениях.
Врачебное дело, 1938, 8, 577.
109. Кавецкий Р.Е. - Обмен опухолевой клетки и опухолевого организма.
Руководство по патологич. физиологии, 1940, 1, 1.
110. Кавецкий Р.Е. - Опухоль и организм.
Киев, 1962.
111. Кавецкий Р.Е. - Современные вопросы патогенеза опухолей.
В кн. "Современные проблемы онкологии", 1965, 15.
112. Калатозидзе М. - Распределение рибонуклеиновой кислоты и гликогена в зонах корковой части надпочечника у общественной полевки.
Сообщ. АН Груз. ССР, 1964, 33, 2, 445.
113. Капланский С.Я.
Свердлова Ф.,
Капанская С. - Влияние малобелковой диеты на обмен аминокислот, кетокислот и на содержание гликогена в печени и мышцах белых крыс.
Биохимия, 1945, 10, 3, 225.

114. Карницкий Ф. - О влиянии ртутной мази и сублимата на количество гликогена в печени.
Докторская диссертация, 1870.
115. Касабьян С.С. - Материалы по гистохимии гликогена в опухолях нервной системы.
Докторская диссертация, 1950.
116. Касабьян С.С. - Содержание гликогена в цельной крови и лейкоцитах при раковых новообразованиях.
Архив патологии, 1953, 15, 5.
117. Касабьян С.С. - Гистохимия гликогена нормальных мозговых оболочек, шванновских клеток и сосудистого сплетения.
Архив патологии, 1954, 16, 3, 65.
118. Касабьян С.С. - О содержании гликогена в опухолях и исходных тканях.
Сб. рефератов и науч. работ Дагестанского мед. ин-та, Махачкала, 1955.
119. Касабьян С.С. - О содержании гликогена в тканях при заживлении кожной раны у белых мышей.
Бюл. эксп. биол. и мед., 1956, 41, 2, 64.
120. Касабьян С.С. - Материалы по гистохимии гликогена в миокарде при некоторых заболеваниях.
Архив патологии, 1960, 22, 1, 14.
121. Касабьян С.С. - Некоторые гистохимические закономерности бластоматозного роста.
В сб. "XII научн. конференция Дагестанского мед. ин-та", Махачкала, 1963, 29.
122. Кайнова А.С. - Ферментативный синтез гликогенов *in vitro* и изучение синтетических гликогенов.
Кандидатская диссертация, 1953.
123. Кайнова А.С.
Степаненко Б.Н.,
Петрова А.И. - Получение синтетических гликогенов.
Доклады АН СССР, 1954, 95, 5, 1029.
124. Кейлина Р.Я. - Влияние электрических раздражений коры головного мозга кроликов на углеводный обмен в печени.
Вопросы медицинской химии, 1950, 2.
125. Кейлина Р.Я. - Влияние общего рентгеновского облучения на содержание гликогена в печени крыс.
Биохимия, 1959, 24, 6, 966.
126. Ковальский В.В. - Хроматографический анализ гликогенов.
Доклады АН СССР, 1947, 58, 6, 1083.

127. Ковальский В.В. - Исследование гликогенов методом хроматографической адсорбции.
Биохимия, 1948, 13, 2, 131.
128. Кожевникова Е.П. - Изменения гликолиза и дыхания тканей при экспериментальной канцеризации и зависимость этих изменений от функционального состояния центральной нервной системы.
Мед. журнал АН УРСР, 1954, 24, 3, 20
129. Колдаев Б.М.,
Гельман Р.М. - Гликогенолиз в мышцах при пониженном содержании гликогена.
Врачебное дело, 1959, 10-11, 677.
130. Коньков Н. - О влиянии некоторых условий на количество печеночного гликогена.
Докторская диссертация, 1876.
131. Косяков П.Н. - Полисахариды - носители групповых свойств крови человека.
Журнал микроб., эпидем. и иммунологии, 1942, 5-6, 128.
132. Коткова К.И. - О переносе фосфатных групп на гликоген.
Український біохімічний журнал, 1947, 1, 96.
133. Котляров И.И. - Влияние кортина на активность гликогеназы печени.
Бюл. эксп. биол. и мед., 1942, 13, 5.
134. Котляров И.И. - Взаимоотношение между гормонами надпочечника и щитовидной железы при воздействии на активность гликогеназы печени.
Бюл. эксп. биол. и мед., 1942, 14, 3.
135. Котляров И.И. - Новые и модифицированные микрометоды определения белков.
Красноярск, 1960.
136. Коштыяц Х.С. - Исследования в области энзиматической природы нервного возбуждения.
Юбилейный сборник АН СССР, посвященный 30-летию Великой Октябрьской соц. революции, 1947, 2, 437.
137. Коштыяц Х.С.,
Янсон З.А. - Роль нервной системы в поддержании структуры мышечного гликогена.
Доклады АН СССР, 1950, 75, 6, 881.
138. Кречетова Г.Д. - К вопросу об апотомическом и дихотомическом расщеплении углеводов в некоторых нормальных и опухолевых тканях.
В кн. "Углеводы и углеводный обмен в животном и растительном организмах", 1959, 189.

139. Кретович В.Л. - Основы биохимии растений, 1952.
140. Кузин А.М., Макаева З.А. - О содержании гликогена в крови в свете работ о специфических полисахаридах. Биохимия, 1941, 6, 3.
141. Кузин А.М., Макаева З.А. - О полисахаридах крови человека. К вопросу о содержании гликогена в крови. Сб. докладов I-й сессии Московского общества физиологов, биохимиков, фармакологов, 1941, 126.
142. Кузин А.М., Буяновская И.С., Рыкалева А.М., Кузина Н.И. - Полисахаридные комплексы макроорганизма. Биохимия, 1947, 12, 4, 340.
143. Кузин А.М., Гарзунова Г.А., Мамуль Я.В. - Об участии комплексных полисахаридов в углеводном обмене. Доклады АН СССР, 1953, 92, 3, 637.
144. Кузин А.М. - Биологически активные полисахариды. В кн. "Успехи биологической химии", 1954, 2, 256.
145. Лазарис Я.А. - О влиянии активной субстанции из задней доли гипофиза на гликоген печени. Бюллетень Днепропетровского мединститута 1940, 3.
146. Лебедев - О влиянии висмута на образование гликогена в печени. Докторская диссертация, 1869.
147. Левберг Д. - Различие между некоторыми видами крахмала под влиянием слюны. Петербург, 1874, 3.
148. Леонтьев И., Знаменская М. - Полисахариды как сенсibilизаторы. Журнал микроб., эпидем. и иммунологии, 1934, 13, 3, 380.
149. Лерман И.А. - К вопросу о влиянии на углеводный обмен ядов, действующих на центральную и вегетативную нервную систему. Докторская диссертация, 1939.
150. Лерман И.А. - О различном влиянии кортикальных и таламических спотворных на содержание гликогена в печени. Бюл. эксп. биол. и мед., 1943, 15, 6, 51.
151. Лейтес С.М., Якушева Т.С. - Действие инсулина на липиды и гликоген печени. Бюл. эксп. биол. и мед., 1948, 26, 5, 392.

152. Лондон Е.С. - Ангиостомия и метаболизм органов.
Москва, 1935.
153. Лондон Е.С. - Обмен углеводов и газов в органах.
Юбилейный сборник работ, посвященный
50-летию Ленинградского института
усовершенствования врачей, 1935, 739.
154. Лондон Е.С. - Ангио-органостомия и органный метаболизм.
Архив патол.анат.и патол.физиол.
1936, 2, 3, 3.
155. Лондон Е.С.,
Ловцкий Я.Л. - Обмен веществ в организме животных и
человека, 1938.
156. Луганова И.С.,
Сейц И.Ф. - Гликоген в лейкоцитах человека и его
превращения.
Докл.АН СССР, 1962, 142, 1, 215.
157. Луганова И.С.,
Сейц И.Ф. - Синтез гликогена в тромбоцитах человека
при участии уридиндифосфатглюкозы.
Вопросы мед.химии, 1963, 9, 4, 398.
158. Луганова И.С.,
Розанова Л.М.,
Сейц И.Ф. - Дыхание, гликолиз и синтез гликогена в
костном мозгу человека.
Биохимия, 1964, 29, 1, 22.
159. Медведева Н.Б. - Влияние денервации печени на регуляцию
гликемии и гликогенообразование.
Бюл.эксп.биол.и мед., 1936, 1, 3, 242.
160. Медведева Н.Б. - Физико-химическая и химическая опухолевая
анаплазия.
В кн. "Злокачественные новообразования",
1937, 95.
161. Медведева Н.Б. - Обмен веществ при злокачественных опухо-
лях.
Общая и частная онкология, 1940, 1.
162. Миронова Т.М. - Фракции гликогена головного мозга, мышцы
и гликоген печени.
В сб. "Биохимия малых доз ионизирующей
радиации". Минск, 1964, 86.
163. Михеева Е.В. - Фосфатазы опухолей мозга у детей.
Вопросы нейрохирургии, 1951, 15, 5, 17.
164. Михеева Е.В. - К вопросу об энзиматической активности
нейроэктодермальных опухолей.
Тезисы докл.6-й ежегодн.нейрохирургичес-
кой конференции, посвященной памяти
акад.Н.И.Бурденко, 1952, Москва

165. Михнев А.Л. - Артерио-венозная разница в уровне сахара, гликогена и молочной кислоты при острых гепатитах.
Врачебное дело, 1950, 2, 115.
166. Муха Г.В. - О биосинтезе гликогена в переживающей *in vivo* диафрагме крысы и о действии инсулина на этот процесс.
Ежегодник института экспериментальной медицины Академии мед. наук СССР, Ленинград, 1956, 213.
167. Недзвецкий С. - О взаимодействии йода с крахмалом.
Известия АН СССР, 1934, 7, 1561.
168. Нейман И.М. - Влияние инсулина на гликогенообразование в органах нормальных и раковых животных.
Труды I Всесоюз. съезда онкологов в Харькове, 1931, 176.
169. Нейман И.М.,
Синай А.Я. - Дыхание и гликолиз тканей ракового организма при введении глюкозы и инсулина.
Сов. хирургия, 1934, 7, 5, 754.
170. Нейман И.М. - Тканевой обмен ракового организма.
Вопросы онкологии, 1935, 8, 82.
171. Нейман И.М.,
Синай А.Я. - О влиянии инъекций глюкозы и инсулина на тканевой обмен при различных патологических состояниях.
Арх. пат. анат. и пат. физиол., 1936, 2, 6, 134.
172. Нейман И.М. - Изменения тканевого обмена при спонтанном раке у мышей.
Бол. эксп. биол. и мед., 1936, 2, 4, 263.
173. Нейман И.М. - Изменения тканевого обмена под влиянием 1:2 - бензопирена.
Арх. биол. наук, 1938, 51, 3, 69.
Труды I Всесоюз. съезда онкологов СССР, 1940, 164.
174. Нейман И.М. - Тканевой обмен ракового организма и значение его нарушений в патогенезе злокачественных новообразований.
Труды I съезда онкологов СССР, 1940, 164.
175. Нейман И.М. - Вопросы тканевого обмена злокачественных опухолей.
Успехи соврем. биологии, 1945, 19, 1, 45.
176. Нейман И.М. - Патология тканевого дыхания и гликолиза.
Руководство по патологической физиологии, 1947, 2, 2.
177. Нейман И.М. - Основы теоретической онкологии, 1961.
178. Нейфах С.А.,
Фомина М.П. - О влиянии активности гексокиназы на скорость гликолиза в скелетной мышце и в переживаемой рабдомиобластоме.
Биохимия, 1957, 22, 3.

179. Нейфах С.А.,
Мельникова М.П. - О ферментах фосфорилирования как факторе, обуславливающем повышенную скорость гликолиза в опухолях.
Аннотации научных работ Академии медицинских наук СССР за 1954 год. Медгиз, 1955.
180. Нейфах С.А.,
Гайцхоки В.С.,
Казакова Т.Б. - Мембранный механизм нарушения регуляции гликолиза в опухолевой клетке.
Тр. 8-го Межд. противоракового конгресса, 1963, 4, 33.
181. Николаев Г.А. - Сахар и гликоген в крови у детей при дистрофиях.
Сб. "Вопросы педиатрии в дни блокады Ленинграда". Ленинград, 1946, 2, 226.
182. Никонова А.О. - Влияние цинка на углеводно-фосфорный обмен в скелетных мышцах.
Укр. биохим. журнал, 1964, 36, 3, 440.
183. Новицкий Д.А. - Гликоген в вагинальном содержимом у новорожденных.
Врачебное дело, 1950, 5, 445.
184. Окунев Н.В. - Химия и физико-химия опухолей.
Экокачественные опухоли, 1947, I, I.
185. Остерн П.,
Холмс Э.,
Герберт Д.,
Тершаковец А.,
Губль С. - Распад и образование гликогена в печени.
Физиол. журнал СССР, 1940, 29, 4.
186. Павловский П.Е. - Автолитические превращения гликогена при охлаждении и замораживании мышечной ткани.
Биохимия, 1956, 21, 5, 616.
187. Панченко О.Н. - О щелочной деградации гликогена.
Биохимия, 1950, 15, 6, 523.
188. Пашутин В. - К вопросу об углеводном перерождении тканей.
Врач, 1884, 5, 505.
189. Петрова А.Н. - Амилаза мышц.
Биохимия, 1946, II, 2.
190. Петрова А.Н. - Гидролитический распад полисахаридов в мышцах.
Труды 7-го Всесоюзного съезда физиологов, биохимиков, фармакологов, 1947, 496.

191. Петрова А.Н. - Об энзиме расщепляющем I-6 связи в полисахаридах.
Доклады АН СССР, 1947, 58, 3, 431.
192. Петрова А.Н. - О гидролитическом расщеплении углеводов в мышцах.
Биохимия, 1947, 12, 3.
193. Петрова А.Н. - Об энзиматическом распаде и синтезе гликогена в мышцах.
Биохимия, 1948, 13, 3.
194. Петрова А.Н. - О химических свойствах и методе выделения изомеразы амилазы из мышц.
Биохимия, 1949, 14, 2, 155.
195. Петрова А.Н. - Изучение процессов энзиматического распаде и синтеза гликогена в мышцах.
Докторская диссертация, 1950.
196. Петрова А.Н., Лесёдова М.Б. - Изучение процессов амилализа и фосфорилиза гликогена в мышцах.
Биохимия, 1950, 15, 3.
197. Петрова А.Н. - О ко-факторе, ускоряющем процесс распада гликогена в мышцах.
Доклады АН СССР, новая серия, 1951, 78, 3, 551.
198. Петрова А.Н. - О ферменте мышц, расщепляющем α -I,6-связи в полисахаридах.
Биохимия, 1951, 16, 482.
199. Петрова А.Н. - О механизме действия кофактора, ускоряющего процесс распада гликогена в мышцах.
Доклады АН СССР, 1952, 86, 1, 133.
200. Петрова А.Н. - Процессы распада гликогена в мышцах при аллоксановом диабете.
В кн. "Тезисы докладов на научной сессии по нервной регуляции функций эндокринных желез, посвященной 100-летию со дня рождения академика В.Я.Данилевского", Киев-Харьков, 1952, 73.
201. Петрова А.Н. - Исследование ферментативных процессов превращения гликогена в печени при аллоксановом диабете.
Биохимия, 1955, 20, 718.
202. Петрова А.Н. - Новые данные о биосинтезе гликогена в печени.
Доклады АН СССР, 1956, III, 5, 1054.
203. Петрова А.Н. - О выделении из печени нового фермента типа трансгликозилаз.
Биохимия, 1958, 23, 1, 30.

204. Петрова А.Н. - О методе выделения трансгликозилазы из печени и определении ее активности. Биохимия, 1959, 24, 2, 228.
205. Петрова А.Н. - Новые данные о биосинтезе гликогена в печени. В кн. "Углеводы и углеводный обмен в животном и растительном организмах." Москва, 1959, 118.
206. Петрова А.Н. - Реакции переноса гликозильных групп в синтезе олиго- и полисахаридов. В кн. "Углеводы и углеводный обмен". Москва, 1962, 72.
207. Поздняков О.М. - Изменение активности некоторых окислительно-восстановительных ферментов в процессе канцерогенеза в мышцах с различным обменом. Вопросы мед. химии, 1963, 9, 4, 421.
208. Пискарева Е.В. - Гистохимия щелочной глицерофосфатазы при раках и эрозиях шейки матки. Архив патологии, 1951, 13, 6, 38.
209. Плохинский Н.А. - Биометрия. 1961.
210. Плышевская Е.Г., Розенфельд Е.Л. - О взаимодействии различных белков с гликогеном. Доклады АН СССР, 1954, 94, 6, 1141.
211. Погосов В.Л., Роговин В.А. - Успехи в области синтеза полисахаридов. Успехи химии, 1961, 30, 10, 1215.
212. Полевицкая Н.К. - Гликогенная болезнь. Вопросы педиатрии и охраны материнства и детства, 1946, 14, 3, 60.
213. Половай А.А., Шубина-Виницкая А.И., Розенфельд Е.Л. - Очистка и фракционирование гамма-амилазы различных органов животных. Биохимия, 1964, 29, 2, 312.
214. Потемкин Н.Н. - Гликоген в крови животных и человека, его значение и методы определения. Бюл. эксп. биол. и мед., 1936, 2, 9, 213.
215. Провоторова Е.Л. - Содержание гликогена в сердечной мышце человека после смерти от различных заболеваний. Архив патологии, 1951, 13, 84, 3.
216. Прохорова М.И. - Биохимия нервной системы. Изд. АН УССР, Киев, 1954.
217. Пульман А., Пульман Б. - Электронная структура и канцерогенная активность молекул ароматических веществ (новые данные). В кн. "Успехи в изучении рака", 1957, 3, 305.

218. Ракитянская А.А. - Действие специфических полисахаридов и их белковых комплексов на организм.
Тезисы докладов 34-го Пленума Ученого Совета Центрального института гематологии и переливания крови, 1955.
219. Роббинс Ф.,
Липман Ф. - Некоторые наблюдения над механизмом синтеза гликогена в мышце.
В кн. "Регуляция клеточного обмена".
ИЛ, 1962, 219.
220. Розенфельд Е.Л. - О соединении гликогена с белками.
Доклады АН СССР, 1947, 57, 9, 927.
221. Розенфельд Е.Л. - Об условиях расщепляемости различных гликогенов ферментами.
Доклады АН СССР, Новая серия, 1948, 62, 3, 373.
222. Розенфельд Е.Л.,
Равикович Х.М. - О спектрах поглощения соединений гликогена с белками.
Доклады АН СССР, 1948, 59, II, 45.
223. Розенфельд Е.Л. - К вопросу о существовании различных гликогенов и их соединений с белками.
Биохимия, 1948, 13, 4.
224. Розенфельд Е.Л. - Влияние щелочной обработки гликогенов на образование ими *in vitro* комплексов с белками.
Доклады АН СССР, Новая серия, 1949, 68, 6, 1072-1074.
225. Розенфельд Е.Л. - О расщепляемости различных гликогенов ферментами в присутствии белков.
Биохимия, 1950, 15, 3.
226. Розенфельд Е.Л.,
Панченко О.Н. - Об участии альдегидной группы молекулы гликогена в образовании гликоgeno-белкового комплекса.
Доклады АН СССР, Новая серия, 1950, 73, 5, 993.
227. Розенфельд Е.Л. - О расщепляемости различных гликогенов ферментами в присутствии белков.
Биохимия, 1950, 15, 3, 272.
228. Розенфельд Е.Л. - О содержании "легкоизвлекаемых" и "трудно-извлекаемых" фракций гликогена в печени кроликов при аллоксановом диабете.
Доклады АН СССР, 1951, 79, 4, 633.
229. Розенфельд Е.Л. - О существовании различных гликогенов и их соединений с белками.
Докторская диссертация, 1951.

230. Розенфельд Е.Л., - О роли структуры молекул гликогена в
Плышевская Е.Г. процессе образования гликоgeno-белковых
комплексов.
Доклады АН СССР, 1952, 85, 3, 615.
231. Розенфельд Е.Л., - О значении альдегидных групп молекул
Панченко О.Н. гликогена.
Биохимия, 1952, 17, 2, 214.
232. Розенфельд Е.Л. - О существовании различных гликогенов и
их соединений с белками.
Вестник Академии наук СССР, 1952, 7, III.
233. Розенфельд Е.Л. - Качественные особенности гликогенов пече-
ни и мышц кроликов при аллоксановом диабе-
те.
В кн: "Тезисы докладов на научной сессии
по нервной регуляции функций эндокрин-
ных желез, посвященной 100-летию со дня
рождения Академика В.Я.Данилевского",
Киев-Харьков, 1952, 78.
234. Розенфельд Е.Л., - Исследование качественных особенностей
Плышевская Е.Г. гликогенов мышц кроликов при аллоксановом
диабете.
Биохимия, 1953, 18, I, 51.
235. Розенфельд Е.Л. - Особенности различных гликогенов и их
соединений с белками.
Успехи соврем. биологии, 1953, 36, 2, 179.
236. Розенфельд Е.Л., - Влияние структуры различных полисахаридов
Плышевская Е.Г. растительного и животного происхождения
на их способность образовывать комплексы
с белками.
Биохимия, 1954, 19, 2, 161.
237. Розенфельд Е.Л., - Влияние облучения рентгеновскими лучами
Плышевская Е.Г. и прогревания яичного альбумина на его
способность к комплексообразованию с
гликогеном.
Биофизика, 1956, I, 2, 143.
238. Розенфельд Е.Л., - О возможности существования в печени
Лукомская И.С. полисахарида, отличного от гликогена.
Доклады АН СССР, 1956, III, 5, 1058.
239. Розенфельд Е.Л. - О полиглюкозидах, полученных после
 α -амилолиза гликогена печени.
Биохимия, 1958, 23, 6, 879.
240. Розенфельд Е.Л. - Расщепление гликогена препаратами α -I,4-
полиглюкозидазы печени, не содержащими
 α -амилазы.
Доклады АН СССР, 1959, 128, 6, 1293.

241. Розенфельд Е.Л. - О полиглюкозидах с высоким содержанием α -1,6-гликозидных связей и их расщеплении ферментами.
В кн. "Углеводы и углеводный обмен в животном и растительном организмах"
Москва, 1959, 150.
242. Розенфельд Е.Л., - Расщепление гликогена экзо- и эндоглико-
Попова И.А. - зидозами животных тканей.
Доклады АН СССР, 1961, 139, 3, 733.
243. Розенфельд Е.Л., α -1,4-экзополиглюкозидаза (γ -амилаза)
Попова И.А., печени.
Шубина А.И. Биохимия, 1961, 26, 6, 1016.
244. Розенфельд Е.Л., - Изменение активности α и γ -амилаз пече-
Попова И.А. - ни при введении кроликам адреналина.
Вопросы мед. химии, 1962, 8, 5, 468.
245. Розенфельд Е.Л. - Современное состояние вопроса о путях
энзиматического расщепления гликогена.
В кн. "Углеводы и углеводный обмен".
Москва, 1962, 99.
246. Розенфельд Е.Л., - Некоторые новые аспекты в исследовании
Лукомская И.С. обмена гликогена.
В кн. "Молекулярная биология", 1964, 333.
247. Рунде И.Р. - Изменения содержания гликогена и жира в
печени после электротравмы.
В сб. "Материалы 1-го съезда травматоло-
гов-ортопедов респ. Прибалтики", 1964,
Рига, 347.
248. Рутберг Р.А. - Использование реакции ионного обмена при
получении йодной кислоты и ее солей.
Лабораторное дело, 1959, 1, 27.
249. Рывкина Д.Е. - О гликолизе и дыхании ткани при экспери-
ментальном дегтярном раке.
Врач. дело, 1984, 8, 509.
250. Сабанеева А. - Криоскопические исследования коллоидов.
Определение молекулярного веса коллоидов
по способу Рауля.
Журнал русск. физ.-хим. о-ва, 1889, 21, 515.
251. Сейц И.Ф. - Координация аэробного и анаэробного обме-
нов и дыхательное фосфорилирование в
клетке.
Докторская диссертация, 1953.
252. Сейц И.Ф., - Уридиндифосфатглюкозный механизм синтеза
Луганова И.С., гликогена в лейкоцитах человека.
Владимирова А.Д. Биохимия, 1963, 28, 2, 295.

253. Синай А.Я. - Тканевой обмен саркоматозных животных.
Бюл.эксп.биол.и мед., 1940, 9, 2-3, 172.
254. Синай А.Я. - Влияние инсулина на гликоген печени и мышц при спонтанном раке у мышей.
Архив пат.анат. и пат.физ., 1941, 7, 1.
255. Соколова Л.В. - Суточная периодичность митотического деления клеток и содержания гликогена в печени белых крыс.
Бюл.эксп.биол.и мед., 1964, 58, 7, 98.
256. Соддатенков П.Ф. - Физиологическое значение гликогена крови.
Успехи современной биологии, 1952, 33, 3, 380.
257. Степаненко Б.Н., - О реакции с йодом гликогенов различного происхождения.
Афанасьева Е.М.
Биохимия, 1947, 12, 2, III.
258. Степаненко Б.Н. - Цветная реакция полисахаридов с йодом.
Успехи химии, 1947, 16, 6, 708.
259. Степаненко Б.Н., - К изучению продуктов биологического расщепления гликогена.
Афанасьева Е.М.
Доклады АН СССР, 1948, 68, 4, 415.
260. Степаненко Б.Н., - О взаимодействии с йодом гликогенов и апогликогенов.
Афанасьева Е.М.
Биохимия, 1949, 14, 4, 317.
261. Степаненко Б.Н., - О крахмалообразовании в клубнях картофеля.
Розенфельд Е.Л.,
Петрова А.Н.,
Котельникова А.В.
Успехи современной биологии, 1951, 32, 5
262. Степаненко Б.Н., - Новые данные в изучении гликогена и его биологических превращений.
Петрова А.Н.
Розенфельд Е.Л.
Известия АН СССР, сер.биологическая, 1951, 1, 89
263. Степаненко Б.Н., - О строении гликогенов различных видов животных.
Афанасьева Е.М.
Докл.АН СССР, 1953, 90, 6, 1095
264. Степаненко Б.Н., - Изучение синтетических гликогенов.
Кайнова А.С.
Доклады АН СССР, 1954, 95, 6, 1263.
265. Степаненко Б.Н. - Препаративное получение гликогенов *in vitro* при помощи мышечных ферментов и изучение синтетических гликогенов.
Сообщ.и докл.на III международном биохимическом конгрессе, 1955. Брюссель.
Изд.Акад.наук СССР, 1955.

266. Степаненко Б.Н., - К изучению биологической роли, химическо-
Хажурова Л.П., го строения гликогена и особенностей
Зубрилина Г.В. обмена гликогена при аллоксановом диабете.
Биохимия, 1955, 20, 4, 479.
267. Степаненко Б.Н. - Некоторые итоги изучения химического
строения гликогенов.
Известия АН СССР, серия биологическая,
1957, 6, 706.
268. Степаненко Б.Н., - К изучению влияния адреналина на фиксацию
Сергиенко И.З. углекислоты в животном организме и усовер-
шенствование метода синтеза гликогена и
глюкозы, меченных в 3 и 4-м положениях.
В кн. "Труды Всесоюзной научно-техничес-
кой конференции по применению радиоак-
тивных и стабильных изотопов и излучений
в народном хозяйстве и науке", 1958,
Москва.
269. Степаненко Б.Н. - О некоторых важнейших достижениях в химии
и биохимии углеводов и об основных резуль-
татах работ лаборатории физиологической
химии АН СССР в этой области.
В кн. "Углеводы и углеводный обмен в
животном и растительном организме", 1959.
270. Степаненко Б.Н., - Об эремуране - новом полисахариде из кор-
Афанасьева Е.М., ней эремуруса регеля.
В кн. "Углеводы и углеводный обмен в
животном и растительном организме",
1959, 203.
271. Степанов А.В., - Специфические полисахариды крови.
Кузин А.М., Биохимия, 1940, 5, 5, 547.
Макаева З.А.,
Косяков П.Н.
272. Стрелихеев А.А. - К вопросу о строении высших углеводов.
Докл. АН СССР, 1949, 67, 3, 471.
273. Стеркин Э.Я. - Биохимия раковой клетки.
В кн. "Общая и частная онкология", 1940, 1
274. Таракулов Я.Х. - Влияние недостаточности белка в питании на
активность фосфофорилазы печени и мышц у
белых крыс.
Биохимия, 1948, 13, 2, 127.
275. Терехова А.А. - Степень злокачественности рака шейки
матки по данным тканевого обмена, гисто-
логии и клиники.
Тр. I съезда онкологов УССР в 1938 году
М.-Л. 1940, 264.

276. Тимофеевский А.Д. - Некоторые вопросы биологии раковой клетки.
В кн. "Современные проблемы онкологии", 1965, 21.
277. Тихонович Ф. - Источники образования углеводов в организме животных и вне его.
Харьков, 1866.
278. Торопова Г.П. - Содержание гликогена в печени в первые часы после облучения крыс.
Мед.радиология, 1959, 4, 5, 89.
279. Транквилимати Н.Н. - Динамика гликогенов в организме при аллергических реакциях.
Докторская диссертация, 1952.
280. Трусов В.И. - Роль отдельных аминокислот в теле животных.
Успехи совр.биологии, 1945, 19, 2.
281. Фасске Э. - Гистохимическое изучение набора ферментов карциномы человека.
Труды 8-го Международного противоракового конгресса, 1963, 2, 199.
282. Файн М.А. - Содержание гликогена в печени при термических ожогах кожи.
Архив патологии, 1964, 26, 10, 43.
283. Фелл Г.С.,
Спенс Д.Б. - Сравнительная реактивность радикалов полициклических ароматических углеводов.
Труды 8-го Международного противоракового конгресса, 1963, 2, 299.
284. Фетисова Г.В. - Содержание гликогена в крови при экспериментальной гипергликемии.
Сб.научных работ, посвященных 100-летию Днепропетровской клинической больницы им.Мечникова. Днепропетровск, 1948, 196.
285. Хайкина Б.И. - Обмен полисахаридов в головном мозгу.
Докторская диссертация, 1953.
286. Хайкина Б.И.,
Гончарова Е.Е. - Обмен различных фракций гликогена головного мозга и некоторые данные о его структуре.
В кн. "Вопросы биохимии нервной системы", Киев, 1957.
287. Хайкина Б.И. - Обмен фракций гликогена головного мозга при различных состояниях организма.
В кн. "Углеводы и углеводный обмен в животном и растительном организмах". Москва, 1959, 130.

288. Хайкина Б.И. - Изучение условий образования гликогена и его фракций в головном мозгу.
В сб. "3-я Всесоюзная конференция по биохимии нервной системы", 1963, 447.
289. Харамоненко С.С., Лаврова Л.В. - Антигенные свойства высокополимерных полисахаридов.
Тезисы докладов 34-го Пленума Ученого Совета Центрального института гематологии и переливания крови, 1955.
290. Ходос В.И. - О содержании гликогена в костном мозгу собак в норме и при некоторых патологических условиях.
Кандидатская диссертация, 1950.
291. Ходос В.И. - О содержании гликогена в костном мозгу собак в норме и при некоторых патологических условиях.
Труды Астраханского мединститута, 1954, II, 175.
292. Цинцадзе Т.М. - Об активности гиалуронидазы при разных формах рака.
Тр. Н.-и. института онкол. Груз. ССР, 1963, 317.
293. Чахова Т.И. - Активность альдолазы, карбоангидразы и фосфатазы в крови людей, пораженных опухолью мочевых органов.
Труды ин-та урологии АН Груз. ССР, 1963, 2, 49.
294. Чанг Д.П., Ворд Д.Н., Ичино К. - Сочетание химического и гистохимического изучения равных энзиматических изменений печени крыс в процессе канцерогенеза, вызванного азокрасителями.
Труды 8-го Международного противоракового конгресса, 1963, 2, 370.
295. Чарный А.М., Сыркина П.Е., Красовицкая С.З. - Гликоген в органах в раннем периоде сенсibilизации шокового состояния.
Бул. эксп. биол. и мед., 1944, 18, 9, 3, 38.
296. Черкес Г.А. - Динамика гликогена крови. Сообщение I. Содержание гликогена в крови и изменении его при сахарных нагрузках.
Физиологический журнал СССР, 1938, 25, 1-2, 162.
297. Черкес Г.А. - Динамика гликогена крови. Сообщение II. Влияние инсулина и адреналина на содержание гликогена в крови.
Физиологический журнал СССР, 1938, 25, 1-2, 167.

298. Черкес А.И. - Сердечные средства как регуляторы трофических процессов в сердечной мышце. Труды 7-го Всесоюзного съезда физиологов, биохимиков и фармакологов, 1949, 2, 951.
299. Чернова А.А. - Содержание гликогена и активность дыхания в роговой оболочке при ожогах кислотой. Вопросы мед. химии, 1964, 10, 4, 367.
300. Чернова К.И. - К вопросу о содержании гликогена в эпителии слизистой оболочки ротовой полости. Стоматология, 1955, 3, 19.
301. Черножуков Т.М. - Содержание гликогена при эрозиях шейки матки в связи с развитием предраковых состояний и раковой опухоли. Акуш. и гинекология, 1941, 9-10, 13.
302. Черных О.В. - Активность кислой и щелочной фосфатазы в своротке крови при раке и нагноительных процессах легкого. Вопросы онкологии, 1964, 10, 2, 24.
303. Шабадаш А.Л. - Морфология распределения и превращения гликогена. Сообщение I. Принципы фиксации и окраски гликогена. Бюл. эксп. биол. и мед., 1937, 4, 10.
304. Шабадаш А.Л. - Морфология распределения и превращения гликогена. Сообщение II. Условия и техника гистохимического обнаружения гликогена. Бюл. эксп. биол. и мед., 1939, 7, 268.
305. Шабадаш А.Л. - Морфология распределения и превращения гликогена. Сообщение III. Цитология гликогеновых накоплений в двигательных клетках нормальной нервной системы. Бюл. эксп. биол. и мед., 1939, 7, 413.
306. Шабадаш А.Л., Рентович Р. - Морфология распределения и превращения гликогена. Сообщение IV. Гликоген в клетках гассерова узла и спинномозговых узлах нормальных животных. Бюл. эксп. биол. и мед., 1939, 8, 32.
307. Шабадаш А.Л. - Морфология распределения и превращения гликогена. Сообщение V. Градиент накоплений гликогена как основа гистохимической архитектоники сенсорных ганглиев. Бюл. эксп. биол. и мед., 1939, 8, 132.
308. Шабадаш А.Л. - Морфология распределения и превращения гликогена. Сообщение VI. Гистохимия гликогенового баланса в терминальных нейронах и интегративных системах центральной нервной системы. Бюл. эксп. биол. и мед., 1940, 10, 211.

99. Шабадаш А.Л. - Морфология распределения и превращения гликогена. Сообщение УП. Гистологические индикаторы углеводного обмена интернейрональных синапсов.
Бюл.эксп.биол.и мед.,1944, 18, 56.
100. Шабадаш А.Л. - Морфология распределения и превращения гликогена. Сообщение УШ. Гликогеновая загрузка межнейронного синапса и ее функциональные последствия.
Бюл.эксп.биол.и мед.,1945, 18, 30.
101. Шабадаш А.Л. - Рациональная методика гистохимического обнаружения гликогена и ее теоретическое обоснование.
Изв.Акад.наук СССР, серия биологическая 1947, 6, 745.
102. Шабадаш А.Л. - Гистохимия гликогена нормальной нервной системы.
Медгиз, 1949.
103. Шапот В.С. - Биохимия рака.
Тр.8-го Международного противоракового конгресса, 1963, 2, 19.
104. Шварц Л.С., Герзон С.Л. - Гликоген крови при патологических состояниях.
Терапевтический архив, 1929, 4, 410.
105. Шварц Л.С., Покровская Г.Н. - Гликоген в крови при физиологических условиях.
Арх.биол.наук, 1935, 38, 3, 769.
106. Шварц Л.С., Покровская Г.Н. - Гликогеновая кривая артериальной крови.
Терапевтический архив, 1939, 17, 1, 154.
107. Шершульская Л.В. - Характеристика гликогена в эпителии кожи мышей в процессе развития экспериментальных опухолей.
Кандидатская диссертация, 1944.
108. Шершульская Л.В. - Гликоген в коже мышей в процессе развития экспериментальных опухолей.
Архив патологии, 1946, 1-2, 48.
109. Шубич М.Г. - Гистохимическое исследование гликогена поперечнополосатой мышечной ткани.
В кн."Углеводы и углеводный обмен в животном и растительном организмах", 1959, Москва, 140.
110. Эйдельман М.М. - Влияние адреналина на некоторые процессы превращения углеводов в мышечной ткани.
Биохимия, 1940, 5, 6, 658.

321. Эристави К.Д.,
Нарашидзе Л.К.,
Георгадзе Г.Е.,
Булассахвили Р.В. - И патогенезу экспериментального химического бластомогенеза.
Труды 8-го Международного противоракового конгресса, 1968, 2, 295.
322. Яковлев Н.Н. - Влияние тренировки и перетренировки на биологические процессы у нормальных и голодающих животных.
Бол.эксп.биол. и мед., 1942, 13, 5.
323. Яковлев Н.Н. - Биохимические основы тренировки мышц.
Успехи современной биологии, 1949, 27, 257.
324. Яковлев Н.Н.,
Ямпольская Л.И. - Влияние различных способов тренировки на биохимические показатели мышц с различной функциональной характеристикой.
Бол.эксп.биол. и мед., 1950, 30, 126.
325. Яковлев Н.Н.,
Ямпольская Л.И. - Биохимические изменения в мышцах в зависимости от компоненты скорости в экспериментальной тренировке.
Сб. трудов Ленинградского научно-исследовательского института физкультуры, 1950, 5, 49.
326. Яковлев Н.Н.,
Ямпольская Л.И. - Влияние тренировки на содержание свободного и связанного гликогена в мышцах и печени.
Сб. трудов Ленинградского научно-исследовательского института физкультуры, 1950, 5, 44.
327. Ямпольская Л.И. - Расходование и ресинтез гликогена мышц в зависимости от характера мышечной деятельности.
Кандидатская диссертация, 1949.
328. Янкавичюте Ю. - Распределение гликогена в мышцах сердца при инфаркте миокарда.
В сб. "Материалы 14-й научной конференции преподавателей Каунасского медицинского института", 1964, Каунас, 134.
329. Янсон З.А. - Сравнительные исследования о нарушении обмена гликогена при денервации мышц и некоторых способах воздействия на него.
Кандидатская диссертация, 1950.
330. Янсон З.А. - Об изменениях структуры мышечного гликогена у зимнеспящих млекопитающих в различные периоды года.
Вестник Московского университета, 1951, 12, 3, 97.

331. Abdel-Akher M.,
Smith F. - The repeating unit of glycogen
J. Am. Chem. Soc. 1951, 73, 994.
332. Agranoff B.W.,
Brady R.O.,
Colodzin M. - Differential conversion of
specifically labeled glucose to
 $C^{14}O_2$.
J. Biol. Chem., 1954, 211, 773.
333. Aisenberg A.C. - Studies on normal and neoplastic
mitochondria I. Respiration.
Cancer Research, 1961, 21, 3, 295.
334. Annamunthodo H.,
Keating V.J.,
Patrick S.J. - Liver glycogen alterations in
anaesthesia and surgery.
Anaesthesia, 1958, 13, 4, 429.
335. Areszi B.E. - La fosfatasi alcolica, il glicogeno
e la deidrogenasi nell' utero di
ratto intossicato da tetracoloruro
di carbonio.
Minerva ginecol, 1964, 16, 1, 15.
336. Ashmore J.,
Weber G.,
Landau R. - Isotope Studies on the pathways
of glucose-6-phosphate metabolism in
the Novikoff hepatoma.
Cancer Research, 1958, 18, 5, 974.
337. Ashmore J.F., Cahill G.F.,
Hastings A.B., Zottu S. - Studies on carbohydrate metabolism
in rat liver slices. VIII Effect of
ions and hormones on pathways of
glucose-6-phosphate metabolism.
J. Biol. Chem., 1957 224, 1, 225.
338. Ayre W.B.,
Ayre J.E. - Cytochemical study of glycogen in
the diagnosis of cervical cancer.
Am. J. Clin. Path., 1950, 20, 7, 644.
339. Barker S.A., Bourne E.J.,
Peat S. - The Enzymic synthesis and
degradation of starch. Part. V. The
action of Q-enzyme on starch and its
components.
J. Chem. Soc., 1949, 1712.
340. Baker T.,
Wholan W. - Birefringence of amylose and
amylpectin in whole structured
starches.
Nature, 1950, 116, 4209, 34.
341. Baker N.,
Wilson L. - Inhibition of tumor glycolysis
by hydrogen peroxide formed from
autooxidation of unsaturated fatty
acid.
Biochem. and Biophys. Res.
Commun., 1963, 11, 1, 60.

342. Bacon J.S.D.,
Baldwin E.,
Bell D.J.
 - The magnitude of the "unit chains" of liver glycogen of rabbits supplied with glucose, fructose and sucrose.
Biochem. J., 1944, 38, 198.
343. Bass A.,
Vodička Z.
 - Vliv denervace a nocicepčního draždění na strukturu glykogenu kosterního svalů.
Českosl. fysiolog., 1955, 4, 4, 427.
344. Barry V.,
Halsall F.,
Hirst M.,
Jones J.
 - The polysaccharides of the *Floridena* starch.
J. Chem. Soc., 1949, 1468.
345. Beattie J.
 - Insulin resistance following hypothalamic lesions and removal of the adrenal medulla.
Brit. Med. J. 9 1954, N 4874, 1287.
346. Beloff-Chain A.,
Pocchiari F.
 - Carbohydrate metabolism.
Annual Rev. Biochem., 1960, 29, 295.
347. Bell D.J.
 - Molecular structure of glycogen formed after ingestion of galactose by fasted rabbits.
Biochem. J., 1936, 30, 1612.
348. Bell D.J.
 - Molecular structure of glycogen from the whole tissues of *Mytilus edulis*.
Biochem. J., 1936, 30, 2144.
349. Bell D.J.
 - The structure of glycogens.
Biological Reviews, 1948, 23, 256.
350. Bell D.J.,
Gutfreund H.,
Gecil R.,
Ogston A.G.
 - Physicochemical observation on some glycogens.
Biochem. J., 1948, 42, 405.
351. Bell D.J.,
Manners D.J.
 - An amylolytic degradation of rabbit-liver glycogen.
Biochem. J., 1951, 49, 72.
352. Bell D.J.,
Manners D.J.
 - The action of crystalline β -amylase on some glycogens.
J. Chem. Soc., 1952, 3641.

353. Beringer A.,
Thaler H.
- Über quantitative Untersuchungen des Glykogen-gehaltes der Leber bei gesunden und kranken Menschen.
II. Mitt. Der Einfluß des Fruchtzuckers und des Traubenzuckers auf die Glykogenspeicherung.
Wiener klin. Wochenschr.,
1964, 76, 37, 627.
354. Bernard C.
- Lecons sur la Physiol. et la Pathol. du Système.
Nerveux, 1857, 1, 467.
355. Bernard C.
- Lecons sur le diabète
Paris, 1877, 553.
356. Bierry H.,
Ganzan B.,
Maguan C.
- Glycogène du foie: glycogène libre et protéidoglycogène.
C.R. de la Soc. de Biol.,
1936, 123, 762.
357. Bo W.J.,
Smith M.S.
- Glycogen synthetase in the rabbit tongue and uterus.
Anat. Rec., 1964, 148, 3, 503.
358. Bloom W.,
Lewes G.,
Shumpert M.,
Shen T.
- Glycogene fractions of liver and muscle.
J. Biol. Chem, 1951, 188, 631.
359. Bonsignore D.,
Canonica C.,
Sartori O.,
Lenzerini L.
- Effetti delle radiazioni sulla glicogenolisi e glicogenosintesi epatica.
Boll. Soc. ital. biol. sperim.,
1963, 39, 23, 1451.
360. Bonsignore D.,
Canonica C.,
Sartori O.,
Lenzerini L.
- Effetti del digiuno e dell'irradiazione sulla attivita' polisaccaride-fosforilasi epatica in ratti.
Boll. Soc. ital. biol. sperim.,
1963, 39, 24, 1664.
361. Borreback B.,
Abraham S.,
Chalkoff I.L.
- Glucokinase activities and glycogen contents of livers of normal, and hypophysectomized, x-irradiated rats subjected to different nutritional treatments.
Biochim et biophys. acta,
1964, 90, 3, 451.

362. Bourne R.J.,
Nacey A.,
Peat S.
- The Enzymic Synthesis and Degradation of Starch. Part II. The amylolytic function of the α -enzyme of the potato.
J. Chem. Soc., 1945, 882.
363. Bourne E.,
Peat S.
- The enzymic Synthesis and degradation of starch. The synthesis of amylopectin.
J. Chem. Soc., 1945, 877.
364. Breckenridge B.M.,
Crawford E.J.
- Glycogen Synthesis from Uridine diphosphate glucose in Brain.
J. Biol. Chem., 1960, 11, 3054.
365. Brown F.,
Dunstan S.,
Halsall T.G.,
Hirst E.L.,
Jones J.K.N.
- Application of new method of end-group determination to structural problems in the polysaccharides.
Nature, 1945, 156, 785.
366. Brown F.,
Halsall T.G.,
Hirst E.L.,
Jones J.K.N.
- The structure of starch. The ratio of non-terminal to terminal groups.
J. Chem. Soc., 1948, 27.
367. Brown G.W.,
Katz J.,
Chaikoff I.L.
- The oxidative Metabolic Pattern of mouse Hepatoma G954 was studied with C^{14} -labeled acetates, Propionate, octanoate, and glucose.
Cancer Research, 1956, 16, 6, 509.
368. Cecil H.C.,
Bitman J.,
Wrenn T.R.
- Effect of histamine and estrogen on the glycogen content of the rat uterus.
Endocrinology, 1964, 74, 5, 701.
369. Cestari A.,
Pellegrini R.
- Ricerche elettroforetiche sul glicogeno epatico e muscolare di differenti specie animali. Modificazioni indotte dal glucagone e dall'insulina.
Ricerca scient., 1958, 28, 2, 323.
370. Chance B.,
Castor N.
- Some patterns of the respiratory pigments of ascites tumors of mice.
Science, 1952, 116, 11, 200.
371. Chance B.,
Hess B.
- On control of metabolism in ascites tumor cell suspensions.
Ann. New York Acad. Sc.,
1956, 63, 1005.

372. Chance B.,
Hess B.
- Metabolic control mechanisms. I.
Electron transfer in the mammalian
cell.
J. Biol. Chem., 1959, 234, 9, 2404.
373. Chance B.,
Hess B.
- Metabolic control mechanisms. II.
Crossover phenomena in mitochondria
of ascites tumor cells.
J. Biol. Chem., 1959, 234, 9, 2413.
374. Chang J.P.,
Spain J.D.,
Griffin A.C.
- Histochemical Manifestation of
early changes in rat liver during
carcinogenesis induced by 3'-
methyl-4-dimethylaminoazobenzene.
Cancer Research, 1958, 18, 6, 670.
375. Chargaff E.,
Moore D.
- On bacterial glycogen the isolation
from avian tubercle bacilli of
a polyglucosan of very high particle
weight.
J. Biol. Chem., 1944, 155, 493.
376. Cheraskin E.,
Ringsdorf W.M.
- Carbohydrate metabolism and
carcinomatosis.
Cancer, 1964, 17, 2, 159.
377. Ghiodi H.,
Baca Z.V.
- Valores postnatales del glucogeno
hepatico de ratos, ratones,
cobayos y conejos.
Rev. Soc. argent. biol., 1963, 39,
N 1-4, 31.
378. Cimellaro M.,
Niccoli V.
- Influenza del digiuno sul glicogeno
del muscolo cardiaco.
Riv. biol., 1963, 56, 4, 469.
379. Crabtree H.G.
- Observations on carbohydrate meta-
bolism of tumours.
Biochem. J., 1929, 23, 536.
380. Davidson G.F.
- The progressive oxidation of
cotton cellulose by periodic acid
and metaperiodate over a wide range
of oxygen consumption.
J. Text. Inst. 1941, 32, 109.

381. DuBois K.P.,
Potter V.R.
 - Biocatalysts in Cancer Tissue. I. cytochromes.
Cancer Research, 1942, 2, 4, 290.
382. Dumazert C.,
Senegulier R.
 - Determination des groupements pseudoaldehydiques libres dans l'amidon et dans le glycogène.
Bull. Soc. Chem. biol., 1948, 30, 213.
383. Dumazert C.
 - Sur un nouveau modèle de structure de l'amidon et du glycogène.
Bull. Soc. Chim. biol., 1950, 32, 998.
384. Edlund I.,
Sunzel H.
 - The glycogen content of the human liver in extrahepatic cholestasis.
Acta Chirurg. scand., 1964, 127, 6, 646.
385. Ehrlich P.
 - Цит. по Альперну А.Е. и Транквилинтати Н.Н. "О значении гликогена в организме". Труды по вопросам патологии. Харьков, 1958.
386. Emmelot P.,
Bos G.J.,
Brombacher P.J.,
Hampe J.F.
 - Studies on isolated tumour mitochondria: biochemical properties of mitochondria from hepatomas with special reference to a transplanted rat hepatoma of the solid type.
Brit. J. Cancer, 1959, 13, 348.
387. Emmelot P.,
Bosch L.,
van Vals G.H.
 - The participation of the oxidative pathway in the glucose metabolism of mouse tumors.
Biochim. et biophys. Acta, 1955, 17, 3, 451.
388. Ewald W.,
Hübener H.,
Wildemann E.
 - Weitere Untersuchungen über die Enzym - Induktion durch Cortisol in der Leber.
Hoppe-Seyler's Z. physiol., Chem., 1963, 333, 1-3, 57.
389. Fabisch W.
 - Ricerche siero-anatologiche con particolare riguardo ai tumori maligni; glicolisi enatica normale o neoplastica.
Biochim. Ter. Sper., 1935, 22, 206.
390. Feinstein R.N.,
Coulon M.,
Seaholm J.E.
 - Effects of glucose oxidase in mice.
Biochem. Pharmacol., 1964, 13, 1, 105.

391. Fiala S.,
Fiala A.
- Intracellular localization of carcinogen and its relationship to the mechanism of carcinogenesis in rat liver.
Brit. J. Cancer, 1959, 13, 236.
392. Figueroa E.,
Pfeifer A.,
Mieneyer H.
- Incorporation of G^{14} glucose into glycogen by whole homogenate of liver
Nature, 1962, 193, 382.
393. Fischer P.
- Glycogène hépatique, rayons X et cystéamine.
Arch. internat. physiol., 1954, 62, 1, 134.
394. Fleury P.P.,
Lange J.
- HATCO NO Rankin J.C.,
Jeanes A.
Evaluation of the periodate oxidation method for structural analysis of dextrans.
Am. Chem. Soc., 1954, 76, 4435.
395. Freudenberg K.,
Schaaf E.,
Dumpe G.,
Ploetz T.
- Neue Ansicht über die Stärke.
Naturwissenschaften, 1939, 27, 850.
396. Freudenberg K.,
Boppel H.
- Die Stelle der Verzweigung der Stärkekettten.
Naturwissenschaften, 1940, 28, 264.
397. Gatt S.,
Krimsky I.,
Racker E.
- Reconstructed systems of glycolysis and oxidative phosphorylation.
Federation Proc., 1956, 15, 259.
398. Gatin-Gruzewaka Z.
- Das reine Glykogen.
Archiv für die gesamte Physiologie der Menschen und der Thiere, 1904, 102, 569.
399. Gibbons G.,
Boissonais R.
- Recherches sur l'amidon. Nature de la liaison d'embranchement du glycogène et de l'amylopectine.
Helv. chim. Acta. 1950, 48, 147.

400. Glock G.E.,
McLean P.
 - Levels of enzymes of the direct oxidative pathway of carbohydrate metabolism in mammalian tissues and tumours. *Biochem J.*, 1954, 56, 171.
401. Glock G.E.,
McLean P.
 - Levels of oxidized and reduced diphosphopyridine nucleotide and triphosphopyridine nucleotide in tumours. *Biochem J.* 1957, 65, 413.
402. Golandas G.
 - Zur Physiologie des Blutglykogens. *Pflüg. Arch. f.d. ges. Physiologie*, 1935, 2, 236.
403. Goldfeder A.
 - Der Metabolismus von Kohlenhydraten, Calcium und Iod bei experimentellen bösartigen Geschwülsten. *Zschr. krebsforsch.*, 1928, 27, 503.
404. Glock G.E.,
McLean P.
 - Levels of enzymes of direct oxidative pathway of carbohydrate metabolism in mammalian tissues and tumours. *Biochem. J.*, 1954, 56, 171.
405. Goranson E.S.,
McBride J.,
Weber G.
 - Phosphorylase activity in rat hepatoma and mouse mammary carcinoma transplants. *Cancer Research*, 1954, 14, 3, 227.
406. Graffi A.,
Hebekerl W.
 - Über chemische Frühveränderungen der Rattenleber nach Verfütterung cancerogener Azofarbstoffe. *Arch. Geschwulstforsch.* 1953, 5, 1, 1.
407. Greenwood G.T.
 - The size and shape of some polysaccharide molecules. *Advances in carbohydr. chem.* 1952, 7, 289.
408. Guzek J.W.
 - Zachowanie sie glikogenu we krwi i w trankach pod wplywen obrnizonej temperatury oceniz. *Patol. polska*, 1955, 6, 4, 287.
409. Hahn P.
 - Vyvoj thermoregulace W. Metabolismus uhlovodanu v thermoregulaci krycich mladst. *Ceskosl. fysiол.*, 1956, 5, 4, 444.

410. Halsall T.G.,
Hirst E.L.,
Jones J.K.N. - The structure of glycogen. Ratio of nonterminal to terminal glucose residues.
J. Chem. Soc., 1947, 1399.
411. Halsall T.G.,
Hirst E.L.,
Jones J.K.N. - Oxidation of carbohydrates by the periodate ion.
J. Chem. Soc., 1947, 1427.
412. Harrap B.S.,
Manners D.J. - Molecular weight of glycogens determined by a light-scattering method.
Nature, 1952, 170, 419.
413. Hastings A., Solomon A.,
Anfinson C.,
Gougl R.,
Rosenberg I. - Incorporation of isotopic carbon dioxide in rabbit liver glycogen in vitro.
J. Biol. Chem., 1949, 172, 2, 717.
414. Haworth W.N.,
Percival E.G. - Polysaccharides XI. Molecular structure of glycogen.
J. Chem. Soc., 1931, 1342.
415. Haworth W.,
Hirst E. - The chemistry of the carbohydrates and the glucosides.
Annual Review of Biochem. 1936, 5, 81.
416. Haworth W.N.,
Hirst E.L.,
Isherwood F.A. - Polysaccharides. XXIII. Determination of the chain length of glycogen.
J. Chem. Soc., 1937, 577.
417. Heidelberger C. - Biochemistry of cancer.
Ann. Rev. Biochem., 1956, 25, 573.
418. Herbert P.H.,
Mole R.H. - The relation between the concentration of blood sugar and liver glycogen in fasted rats.
J. Endocrinol., 1956, 14, 2, 188.
419. Herbert S.,
Verne J. - Le glycogène dans les hépatocytes en culture en présence des hormones pancréatiques.
Ann. Histochim., 1964, 9, 1, 93.
420. Hirsch-Hoffmann A.M.,
Hölzel F.,
Maass H. - Glycolytische Enzymaktivitäten in Zellen und Zellkernen des Ehrlich-Ascitescarcinoms.
Naturwissenschaften, 1964, 51, 17, 414

421. Hoffmann-Ostenhof O. - Transferases.
Annual Rev. Biochem., 1960, 29, 73.
422. Hogeboom G.H., *Claude A.*, - The distribution of cytochrome oxidase and succinoxidase in the cytoplasm of the mammalian liver cell.
Hotchkiss R.D.
J. Biol. Chem., 1946, 165, 615.
423. Hoch-Ligeti G. - Changes in the succinoxidase activity of livers from rats during the development of hepatic tumors on feeding p-dimethylaminoazobenzene.
Cancer Research, 1947, 7, 143.
424. Holt C.,
Fisher J. - The effect of cortisol on synthesis and degradation of liver glycogen.
Biochim. et biophys. acta, 1964, 90, 2, 232.
425. Horecker B.L.,
Hiatt H.H. - Pathways of carbohydrate metabolism in normal and neoplastic cells.
New England J. of Med., 1958, 258.
426. Hou P.C.,
Fadzean A.J.S. - Glycogen in primary carcinoma of the liver.
J. Path. Bacter., 1956, 72, 2, 411.
427. Ibsen K.H.,
Coe E.L.,
McKee R.W. - Interrelationships of metabolic pathways in the Ehrlich ascites carcinoma cells.
I. Glycolysis and respiration (Crabtree effect).
Biochim. et Biophys. Acta, 1958, 30, 2, 384.
428. Illingworth B.,
Lerner J.,
Cori G.T. - Structure of glycogens and amylopectins.
Enzymatic determination of chain length.
J. Biol. Chem., 1952, 199, 631.
429. Ionezawa T.,
Bornstein M.B.,
Peterson E.R.,
Murray M.R., - A histochemical study of oxidative enzymes in lyophilizing cultures of central and peripheral nervous tissue.
Ann. histochem., 1963, 8, 3, 229.
430. Ioshida I. - Glycogen formation in the cytotrophoblast of human placenta in early pregnancy, as revealed by electron microscopy.
Exptl cell Res., 1964, 34, 2, 293.

431. Joung G.
- Observation of the chemistry of muscle glycogen.
Bioch. J. 1937, 31, 711.
432. Joung H.F.,
Abels J.C.,
Homburger P.
- Studies on carbohydrate metabolism in patients with gastric cancer; defective hepatic glycogenesis; effect of adreno-cortical extract.
J. Clin. Invest., 1948, 27, 760.
433. Jackson E.L.,
Hudson C.S.
- Application of the cleavage type of oxydation by periodic acid to starch and cellulose.
J. Am. Chem. Soc., 59, 2048, 1937.
434. Kalckar H.M.,
Robinson E.A.
- Some aberrations in metabolic patterns of malignant cells.
Biochem. Z., 1963, 338, 763.
435. Kaminer S.
- Die intracelluläre Glykogenreaction der Leukozyten.
Ztschr. J. klin. Med., 1902, 47, 408.
436. Kar A.B.,
Roy A.C.,
Chakravarty R.N.
- The effect of testosterone propionate on glycogen content and histopathology of the liver of experimental hypothyroid rats.
Indian J. Med. Res., 1955, 43, 2, 217
437. Kerly M.,
Ottaway J.
- The effect of diet on glycogen formation in rat liver.
J. Physiol. (London), 1954, 123, 3, 516.
438. Kerr R.W., Cleveland P.C.,
Katzbek W.J.,
- The molecular magnitude of amylopectin
J. Am. Chem. Soc., 1951, 73, 111.
439. Kit S.
- The Role of the hexose monophosphate shunt in tumors and lymphatic tissues.
Cancer Research, 1956, 16, 1, 70.
440. Knox W.E.
- Two mechanisms which increase in vitro the liver tryptophan peroxidase activity: specific enzyme adaptation and stimulation of the pituitary-adrenal system.
Brit. J. Exptl. Pathol., 1951, 32, 5, 462.

441. Kovach A.G.,
Takacs L.,
Kiss S.
- Phosphorolytic and hydrolytic glycogen breakdown in the muscle of normal rats and of those in shock. Acta physiol. Acad. sci. hung., 1956, 10, 2-4, 303.
442. Krisman C.R.
- α -1, 4-glucan: α -1,4-glucan -6 - glycosyltransferase from liver. Biochem. et Biophys. acta, 1962, 65, 307.
443. Kun E.,
Talalay P.,
Williams-Ashman H.G.
- Studies on Ehrlich ascites tumor. I. Enzymic and metabolic activity of ascitic cells and ascitic plasma. Cancer Research, 1954, 14, 855.
444. Laszt L.
- Analyse von Leberglykogenen normaler und diabetischer Ratten mit der Ultrazentrifuge. Biochem. Zeitschrift, 1955, 327, 1, 32.
445. Leloir L.F.,
Cardini C.E.
- Biosynthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose. J. Amer. chem. Soc., 1957, 79, 6340.
446. Leloir L.F.,
Olavarria J.M.,
Goldenberg S.H.,
Carminatti H.
- Biosynthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose. Arch. Biochem. a. Biophys., 1959, 81, 2, 508.
447. Leloir L.F.,
Cardini C.E.
- Recientes progresos en el conocimiento del metabolismo del glucogeno. Acta physiol. Latino Americans, 1960, 10, 141.
448. Leloir L.F.,
Goldenberg S.H.
- Synthesis of glycogen from Uridine diphosphate glucose in liver. J. Biol. Chem., 1960, 235, 919.
449. Leloir L.F.
- Role of uridine diphosphate glucose in the synthesis of glycogen. B kh. "Control of glycogen metabolism. Ciba Foundation symposium on control of glycogen metabolism, 23-25 July, 1964. 68.

450. Lenta M.R.,
Riehl M.A. - The coenzyme I oxidase system in normal and tumor tissues. *Cancer Research*, 1952, 12, 498.
451. Leonard S.L.,
Wimsatt W.A., - Phosphorylase and glycogen levels in skeletal muscle and liver of hibernating and nonhibernating bats. *Amer. J. Physiol.*, 1959, 197, 1059.
452. Leonard S.L. - Effekt of hormones on the trichloroacetic acid extractable glycogen in skeletal muscles. *Endocrinology*, 1955, 57, 4, 393.
453. LePage G.A. - A comparison of tumor and normal tissues with respect to factors affecting the rate of anaerobic glycolysis. *Cancer Research*, 1950, 10, 2, 77.
454. Levine R.A.,
Resch L.A.,
Klatskin G.,
Giarman M.J. - Effect of serotonin on glycogen metabolism in isolated rat liver. *J. Clin. Investig.*, 1964, 43, 5, 797.
455. Livierato P.E. - Untersuchungen über die Schwankungen des Glykogengehaltes im Blute gesunder und kranker Individuen. *Deutsch. Arch. f. klin. Med.*, 1894, 53, 303.
456. Lührs W.,
Chrometzka K. - Über die Bestimmung von glycolytischen Fermenten beim Krebskranken. *Z. klin. Chem.*, 1964, 2, 1, 11.
457. Lynen F. - Die Rolle der Phosphorsäure bei Dehydrierungsvorgängen und ihre biologische Bedeutung. *Naturwissenschaften*, 1942, 30, 398.
458. Malaprade L. - Action des polyalcohols sur l'acide periodique Application analytique. *Bull. Soc. Chim.*, 1928, 43, 683.
459. Man J.C. - Effect of cortisone on the fine structure, glycogen content, and glucose-6-phosphatase activity of hepatic cells in fasted and dimethylnitrosamine-treated rats. *Cancer Res.*, 1964, 24, 8, 1347.

460. Manus J.F.,
Findley L.A.
- Histochemical studies on glycogen in carcinoma in situ of the cervix uteri.
Surg., gynec.a. Obst., 1949, 89, 5, 616.
461. Martinek J.,
Mikulas J.,
- Změny svalového glykogenu po denervaci raném postnatalním období u krys.
Českosl. fysiolog., 1954, 3, 45.
462. Mathe V.,
Kassay G.,
Hunkar K.,
Kiss L.
- Changes in the carbohydrate metabolism of the rat brain in response to work.
Acta physiol. Acad. scient. hung., 1959, 15, 1, 61.
463. Mauro S.A.
- Efectos de los corticosteroides sobre el glucogeno intracelular de los elementos de la sangre.
Prensa med. argent., 1963, 50, 16, 977.
464. Mazzanti L.,
Loper M.
- Studio del comportamento epatico sotto l'azione dell' isotiocianato di α -haftile. Glicogeno e azoto proteico.
Boll. Soc. ital. biol. sperim., 1953, 29, 3, 308.
465. McGeachin R.L.,
Potter B.A.
- Amylase in Isolated Liver Cells.
J. Biol. Chem., 1960, 235, 5, 1354.
466. Meyer A.
- Über Stärkekörper, welche sich mit Iod roth färben.
Berichte deutsch. botan. Gesell., 1886, 4, 337.
467. Meyer K.H.,
Wertheim H.,
Bernfeld P.
- Recherches sur l'amidon. IV. Métilation et détermination des groupes terminaux d'amylose et d' amylopectine de maïs.
Helv. Chim. acta, 1940, 23, 865.
468. Meyer K.H.,
Bernfeld P.
- Recherches sur l'amidon XIV. La réaction colorée à l'iode de l'amidon et du glycogène.
Helv. chim. acta, 1941, 24, 389.
469. Meyer K.H.,
Fuld M.
- Recherches sur l'amidon XII. L'arrangement des restes de glucose dans le glycogène.
Helv. chim. acta, 1941, 24, 375.

470. Meyer K.H.,
- The chemistry of glycogen.
Advances in enzymology, 1943, 3, 109.
471. Meyer K.H.,
Geanlos R.
- Recherches sur l'amidon. Le glycogène
du muscle natif.
Helv. chim. acta, 1943, 26, 1784.
472. Meyer K.H.,
Nöelting G.,
Bernfeld P.
- Le degré de polymérisation de
l'amylose de l'amylopectine et du
glycogène.
Experientia, 1947, 3, 370.
473. Meyer K.H.,
Geanlos R.
- Recherches sur l'amidon. Le glycogène
du muscle natif.
Helv. Chim. Acta 1948, 31, 103.
474. Meyer K.H.,
Nöelting G.,
Bernfeld P.
- Recherches sur l'amidon. XXXVII.
Détermination du poids moléculaire
de polysaccharides naturels par
dosage colorimétrique.
Helv. chim. acta, 1948, 31, 103.
475. Meyer K.H.,
Bernfeld P.,
Boissonnas R.A.,
Gürtler P.,
Nöelting G.
- Starch solution and pastes and
their molecular interpretation.
J. Phys. A.Coll. Chemistry,
1949, 53, 319.
476. Meyer K.H.,
Fuld M.
- Recherches sur l'amidon. 44. Le
glycogène de Zea mais, variété
"Golden Bantam".
Helv. chim. acta, 1949, 32, 757.
477. Meyer D.K.,
Russell R.E.,
Flatner W.S.,
Purdy T.A.,
Westfall B.A.
- Synthesis of glycogen fractions by
heart homogenates.
Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med.,
1955, 90, 1, 15.
478. Meyerhof O.
- Recent advances in study of metabolic
reactions of yeast preparations.
Am. Scientist, 1952, 40, 482.
479. Mirsky A.,
Rosenbaum I.,
Wertheimer E.
- Study on the behaviour of glycogen
after diets rich in protein and in
carbohydrate.
J. Physiol., 1938, 92, 486.

480. Missale G.,
Colajacomo A.
- Oxidized and reduced pyridine coenzymes of galliera sarcoma and of Ehrlich solid carcinoma.
Ital J. Biochem., 1963, 12, 5, 327.
481. Montemagno U.,
Lauro V.
- Glicogeno tissutale e glicogenosintesi nella placenta umana in via di sviluppo.
Arch. ostetr. e ginecol., 1962, 67, 1, 77.
482. Mourek J.,
Slaviček J.
- Vliv krátkého hladování na obsah glykogenu v kůře velkého mozku a jaterní tráni v průběhu ontogeneze krysy.
Sb. lékař., 1964, 66, 6, 178.
483. Nerking J.
- Lässt sich durch genügend lange Extraktion mit siedendem Wasser sämtliches in der Organen vorhandenes Glykogen gewinnen?
Arch. für die gesamte Physiologie der Menschen und der Thiere, 1900, 81, 636.
484. Nuccolai V.,
D'Anna A.
- Sul comportamento del glicogeno epatico neonatale.
Arch. "E. Maragliano" patol.e.clin., 1962, 18, 3.
485. Niemeyer H.,
Figueroa E.,
González C.
- Influence of glycogen content on the effect of 2, 4- dinitrophenol on glycogen metabolism in rat liver slices.
Acta physiol. latinoamer., 1956., 6, 3, 117.
486. Nigan V.N.,
Helen L.,
MacDonald,
Cantero A.
- Limiting factors for glycogen storage in tumors.
Cancer Research, 1962, 22, 2, 131.
487. Noble N.L.,
Papageorge E.
- Loss of adrenal glycogen in the rat following stress of treatment with various hormones.
Endocrinology, 1955, 57, 4, 492.
488. Novikoff A.B.
- A transplantable rat liver tumor induced by 4- dimethylaminoazobenzene.
Cancer Research, 1957, 17, 1010.

489. Oakley H.,
Joung T.
 - The osmotic pressure of glycogen solutions.
Biochem. J., 1936, 30, 868.
490. Olson R.E.
 - Oxidation of C¹⁴-labeled carbohydrate intermediates in tumor and normal tissue.
Cancer Research, 1951, 11, 571.
491. Orr I.W.,
Price D.E.
 - Observations on the hepatotoxic action of the carcinogen p-dimethyl-~~amino~~-azobenzene.
J. Pathol. Bacteriol., 1948, 60, 3,461.
492. Peat S.,
Roberts P.,
Whelan W.
 - The occurrence of fructose in rabbit liver glycogen.
Biochem. J., 1952, 51, 17.
493. Poricaud H.
 - Le cancer sa glycolyse, sa respiration, son pH, son traitement.
Neoplasmes, 1931, 10, 15.
494. Pora E.A.,
Toma V.,
Madar J.
 - L'utilisation du glucose et la synthèse du glycogène par le diaphragme des rats éthymisés.
J. physiol. (France), 1962, 54, 2,401.
495. Potter A.L.,
Hassid W.Z.
 - End-group determination of amylose and amylopectin by periodate oxidation.
J. Am. Chem. soc., 1948, 70, 3488.
496. Potter V.R.,
Price J.H.,
Miller E.C.,
Miller J.A.
 - Studies on the intracellular composition of livers from rats fed various aminoazo dyes. III. Effects on succinoxidase and oxalacetic acid Oxidase.
Cancer Research, 1950, 10, 1, 28.
497. Przylecki S.,
Grynberg H.
 - Untersuchungen über die Bildung der Biokolloide VI. Teile Geronnenes Ovalbumin und verschiedene Kohlenhydrate.
Biochem. Z., 1932, 248, 16.
498. Przylecki S.,
Majmin R.
 - Über Polysaccharoproteide. II Teil. Verbindung mit denaturierten Proteinen.
Bioch. Z., 1934, 271, 168.

499. Przylecki S.,
Majmin R. - Über die Verbindung Myosin-Polysaccharid, III Teil. Der Untersuchungen über Polysaccharoproteide. Bioch. Z. 1934, 273, 262.
500. Przylecki S.,
Kafalowska H. - Über chemische Gruppen der Proteine, die Affinitäten zu Polysacchariden besitzen. IX und V Mitteilung. Bioch. Z. 1935, 280, 92.
501. Przylecki S.,
Rafalowska H.,
Gichka I. - Über chemische Gruppen der Proteine, die Affinitäten zu Polysacchariden besitzen VI und VII Mitteilung. Bioch. Z., 1935, 281, 240.
502. Racker E. - Carbohydrate metabolism in ascites tumor cells. Ann. New. York Acad. Sc., 1956, 63, 1017.
503. Raina P.N.,
Ramakrishnan C.V. - Comparative metabolic studies on normal and neoplastic rat liver. I. Changes in the glucose, lactic acid and keto acid content of the medium during cultivation on normal, neoplastic, newborn and regenerating rat liver. Oncologia, 1964, 17, 3-4, 273.
504. Raina P.N.,
Ramakrishnan C.V. - Comparative metabolic studies on normal and neoplastic rat liver. II. Comparative studies on the activities of certain enzymes of carbohydrate metabolic in normal, neoplastic, newborn and regenerating liver. Oncologia, 1964, 17, 3-4, 258.
505. Rankin J.C.,
Jeanes A. - Evaluation of the Periodate Oxidation Method for structural analysis of dextrans. J. Am. Chem. Soc., 1954, 76, 4435.
506. Reynafarje B.,
Potter V.R. - Comparison of transhydrogenase and pyridine nucleotide-cytochrome C reductase activities in Rat Liver and Novikoff Hepatoma. Cancer Research, 1957, 17, 1112.
507. Robinson E.A.,
Kalckar H.M.,
Troedsson H. - Of the loss of uridine diphosphogalactose-4-epimerase activity in Δ cell cultures and in tumor cells. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1963, 13, 4, 313.

508. Rostafinska J.,
Rejniak L.,
Krutul H.
- Wplyw tyroksyny, tapazolu i metylobiouracylu na zawartosc glikogenu w watrobie krolekow.
Patol. polska, 1964, 15, 2, 131.
509. Salomon G.
- Glycogene et Leucocytes, 1899
510. Semec M.,
Issajevich V.
- Sur la composition du glycogene.
Comptes Rend. Acad. Sci., 1924,
176, 1419.
511. Schlanowitz M.
- On the nature of rabbit liver glycogen.
I. Branching characteristics.
J. Biol. Chem., 1951, 188, 145.
512. Schneider W.C.,
Potter V.R.
- Biocatalysts in cancer tissue. III.
succinic dehydrogenase and cytochrome oxidase.
Cancer Research, 1943, 3, 6, 353.
513. Schoch T.
- The fractionation of starch.
Adv. in carbohydrate chemistry,
1949, 1, 247.
514. Sie H.,
Hablanian A.,
Fishman W.H.
- Solubilization of mouse liver glycogen synthetase and phosphorylase during starvation glycogenolysis and its reversal by cortisol.
Nature, 1964, 201, 393.
515. Sie H.G.,
Fishman W.H.
- Glycogen synthetase: its response to cortisol.
Science, 1964, 143, 3608, 816.
516. Sovik O.,
Walaas O.
- Insulin stimulation of glycogen synthesis in the isolated rat diaphragm in the absence and in the presence of puromycin and actinomycin D.
Nature, 1964, 202, 4930.
517. Spain J.D.,
Griffin A.C.
- A histochemical study of glycogen alterations in the livers of rats following azo dye administration.
Cancer Research, 1957, 17, 3, 200.
518. Staudinger H.,
Husemann E.
- Über die Konstitution des Glykogens.
J. Liebigs Ann. der Chemie, 1937,
530, 1.

519. Staudinger H. - Über natürliche Glycogen.
Die Makromolekulare Chemie,
1948, 2, 88.
520. Stolzman Z.,
Blawacka M.,
Roth Z. - Changes of liver and muscle glycogen
in mice at starvation.
Bull. Soc. amis sci. et lettres
Poznan, 1956, c, 6, 71.
521. Sydow G. - Weitere Untersuchungen zur Frage der
Hexokinase-Lokalisation in der
Tumorzelle.
Acta biol. et med. german.,
1964, 12, 4, 519.
522. Svorad D. - Über die Beziehungen zwischen den
tagesperiodischen Schwankungen des
Glycogengehaltes im Gehirn und der
vegetativen Reaktivität bei Ratten.
Acta neuroveget., 1959, 20, 11, 33.
523. Swanson M.,
Cori G. - Studies on the structure of
polysaccharides. Acid hydrolysis of
starchlike polysaccharides.
J. biol. chem. 1948, 172, 797.
524. Swanson M. - Studies of the structure of
polysaccharides. IV. Relation of
the iodine color to the structure.
J. Biol. Chem., 1948, 172, 825.
525. Thommes R.C.,
Firling C.E. - Blood glucose and liver glycogen
levels in glucagon treated chick
embryos.
Gen. and Compar. Endocrinol.,
1964, 4, 1, 1.
526. Topi G.C.,
Zane V.A. - Sulla determinazione della
glicosialia (Metodologia e tecnica
generale).
Arch. studio fisiopatol. e clin.
Ricambio, 1964, 25, 2, 93.
527. Tsai C. - Referat in chem.
Abstr., 1938, 31, 2670.
528. Viale G.L.,
Ibba F.M. - Ricerche istochimiche sull'attività
fosforilasi nei tumori del sistema
nervoso.
Ricerca scient., 1964, 2, 4, 1, 103.

529. Villar-Palasi C.,
Lerner J. - Levels of activity of the enzymes of the glycogen cycle in Rat tissues.
Arch. Biochem. a. Biophys.,
1960, 86, 2, 270.
530. Wajzer M. - Formation d'un glycogène-proteide au cours de la synthèse du glycogène.
Compt. Rend. Soc. de Biol.,
1939, 130, 1119.
531. Wajzer M. - Sur la formation et la décomposition du glycogène-proteide en relation avec les mutations du glycogène libre.
Bulletin de la société la Chimie Biologique, 1939, 21, 1242.
532. Warburg O. - Über den Stoffwechsel der Tumoren.
Berlin, Springer, 1926.
533. Warburg O. - The Metabolism of Tumors.
London, Constable, 1930.
534. Wayzer I. - Analyse de l'effect glycolytique de l'adrénaline.
Bull. Soc. Chimie biol.,
1938, 20, 828.
535. Warburg O. - On origin of cancer cells.
Science, 1956, 123, 309.
536. Weber G.,
Cantero A. - Glucose-6-phosphatase activity in Normal, Precancerous, and Neoplastic tissues.
Cancer Research, 1953, 15, 105.
537. Weber G.,
Cantero A. - Glucose-6-phosphate Utilization in Hepatoma, Regeneration and Newborn Rat Liver, and in the Liver of Fed and Fasted Normal Rats.
Cancer Research, 1957, 17, 995.
538. Weber G.,
Cantero A. - Fructose-1, 6-diphosphatase and Lactic dehydrogenase activity in hepatoma and in Control Human and animal tissues.
Cancer Research, 1959, 19, 7, 763.

539. Weber G.,
Morris H.P.,
Love W.C.,
Ashmore J. - Comparative Biochemistry of
Hepatomas. II. Isotope studies of
Carbohydrate Metabolism in Morris
Hepatoma 5123.
Cancer Research, 1961, 21, 10, 1406.
540. Weinhouse S. - Oxidative metabolism of neoplastic
tissues.
Advances in Cancer Research, 1955,
3, 269.
541. Wenner C.E.,
Weinhouse S. - Metabolism of neoplastic tissue. IX.
An isotope tracer study of glucose
catabolism pathways in normal and
neoplastic tissues.
J. Biol. Chem., 1956, 222, 399.
542. Wenner C.E.,
Hackney J.H.,
Moliterno F. - The hexose monophosphate shunt in
glucose catabolism in ascites tumor
cells.
Cancer Research, 1958, 18, 1105.
543. Wied D. - The influence of ascorbic acid on the
glycogen content of the liver of
normal and adrenalectomized rats
exposed to cold.
Acta endocrinol., 1953, 14, 3, 233.
544. Williams-Ashman H.G. - Studies on Ehrlich ascites tumor. II.
Oxidation of hexose phosphates.
Cancer Research, 1951, 11, 721.
545. Williams W.,
Davis R.L.,
Lowe C.U. - Effects of cortisone and epinephrine
on hepatic and myocardial glycogen
of mice and rats.
Anat. Rec., 1956, 126, 1, 43.
546. Wellstätter R.,
Rohdewald M. - Über den Zustand des Glykogens
in der Leber, im Muskel und in
Leukocyten.
Zeitschr. Physiol. Chem, 1934,
225, 103.
547. Wolfrom H.L.,
O'Neil A.N. - Degradation of glycogen to isomaltose.
J. Am. Chem. Soc., 1949, 71, 3857.
548. Wolfrom H.L.,
Thompson A. - Degradation of glycogen to isomalto-
triose and nigerose.
J. Amer. Chem. Soc.,
1957, 79, 13, 4242.

549. Wray J.B.
- Alterations in muscle and liver glycogen secondary to fracture. Metabolism, 1964, 13, 6, 551.
550. Wu R.,
Racker E.
- Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism. IV. Pasteur effect and Crabtree effect in ascites tumor cells. J. Biol. Chem., 1959, 234, 1036.
551. Zamecnik P.C.,
Loftfield R.B.,
Stephenson H.L.,
Steele J.M.
- Studies on the carbohydrate and protein metabolism of the rat hepatoma. Cancer Research, 1951, 11, 592.
552. Unshelm E.,
- Über das Glykogen im Blut des Menschen. Ztsch. für die ges. Experim. Med., 1935, 96, 2, 128.
553. Burk D.,
Behrens O.,
Sugiura K.
- Metabolism of "Butter Yellow" rat liver cancers. Cancer Res., 1941, 1, 9, 733.
554. Burk D.
- On the specificity of glycolysis in malignant liver tumors as compared with homologous adult or growing liver tissues. B KH, A symposium on respiratory enzymes, Madison, 1942, 235.
555. Buschak G.
- Vergleichende histochemische Untersuchungen über die Aktivität einiger Phosphatasen in transplantablen Tumoren und deren homologen Normalgeweben. Acta biol. et med. german., 1963, 11, 1, 118.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица I

Изменение веса здоровых кроликов, используемых
в качестве контрольных, в период недельной
инкубации, предшествующей началу исследований

Срок наблюдения в днях:													
1	1	2	1	3	1	4	1	5	1	6	1	7	
2120	2153	2160	2168	2170	2168	2170							
2896	2905	2920	2925	2929	2930	2929							
1988	1996	2008	2012	2020	2024	2025							
2230	2251	2264	2279	2285	2289	2290							
2792	2810	2818	2825	2830	2829	2830							
2096	2112	2136	2150	2168	2180	2190							
2986	3002	3030	3056	3084	3098	3105							
1980	1996	2006	2020	2032	2046	2050							
2290	2314	2325	2353	2361	2368	2370							
1896	1911	1928	1940	1962	1986	2000							
2300	2325	2336	2340	2342	2340	2340							
2922	2938	2946	2960	2969	2970	2970							
2018	2029	2036	2037	2038	2037	2037							
2800	2830	2842	2850	2854	2860	2860							
2125	2150	2162	2170	2179	2182	2185							
2110	2128	2136	2149	2160	2172	2185							
1900	1936	1942	1950	1968	1972	1972							
2150	2156	2154	2152	2150	2152	2152							
2896	2905	2920	2925	2929	2930	2929							
1800	1829	1840	1853	1870	1882	1895							
2590	2600	2605	2605	2610	2608	2610							

Таблица П.

ИЗМЕНЕНИЕ ВЕСА КРОЛИКОВ С КАРЦИНОМой БРОУНА-ПЕРС, ЗАБИТЫХ В РАЗЛИЧНЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ ПЕРЕВИВКИ
ОПУХОЛЕВОГО ШТАМПА

Вес кроликов до перевивки (в г.)	Количество суток, прошедших после перевивки карциномой Броуна-П и р с																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
2385	2316	2288	2225	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2597	2534	2500	2405	2462	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1767	1677	1600	1682	1725	1750	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2495	2395	2345	2330	2320	2410	2440	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1932	1865	1890	1935	1950	1980	2000	1950	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2140	2100	2040	1957	1935	1934	1895	1879	1930	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1854	1740	1630	1780	1817	1830	1840	1860	2040	1995	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2142	2030	2044	2120	2125	2178	2154	2109	2064	2060	2030	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1777	1754	1787	1820	1820	1797	1775	1700	1756	1810	1850	1815	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2300	2270	2265	2125	2286	2283	2290	2320	2336	2360	2352	2346	2290	-	-	-	-	-	-	-	-
2150	2080	2050	2018	2068	2072	2090	2120	2116	2090	2076	2050	2042	2030	-	-	-	-	-	-	-
1695	1692	1640	1745	1750	1795	1800	1835	1797	1795	1778	1782	1809	1815	1820	-	-	-	-	-	-
2400	2372	2369	2222	2385	2387	2395	2414	2435	2454	2449	2445	2385	2400	2430	2456	-	-	-	-	-
2530	2479	2450	2420	2400	2520	2525	2480	2465	2455	2450	2460	2462	2460	2465	2455	2445	-	-	-	-
2040	2034	2064	2070	2075	2089	2075	2050	2055	2079	2087	2090	2120	2129	2116	2096	2084	2073	-	-	-
2495	2490	2440	2400	2434	2479	2459	2375	2487	2507	2487	2487	2465	2444	2420	2411	2398	2380	2364	-	-
2285	2210	2200	2189	2235	2239	2240	2260	2487	2464	2315	2298	2280	2295	2310	2335	2300	2282	2269	2253	-
2450	2420	2416	2270	2435	2439	2445	2466	2485	2500	2510	2500	2435	2450	2485	2490	2462	2430	2400	2382	2350

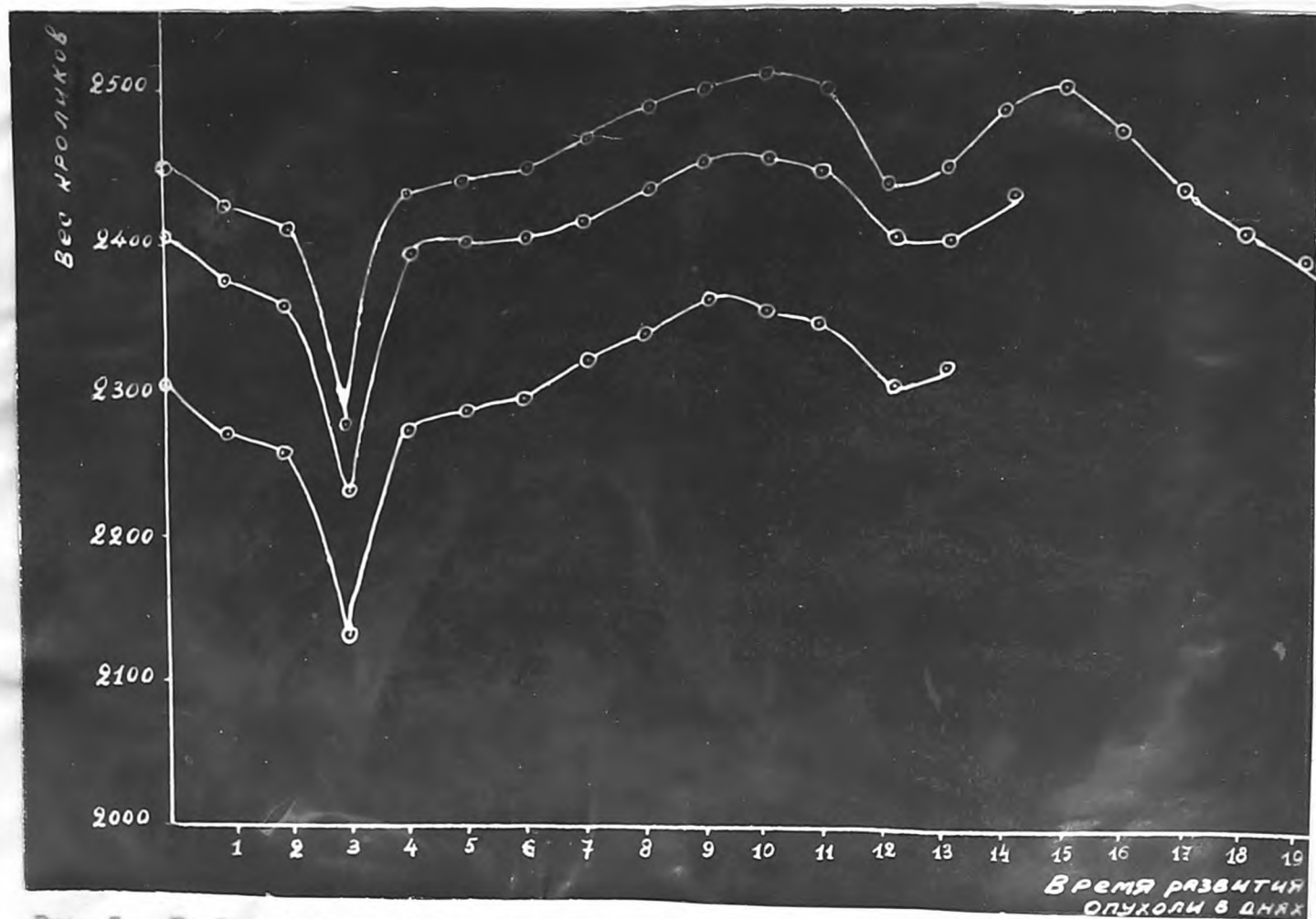


Рис. 1. Графическое изображение изменения веса кроликов после интратестикулярной пересадки штамма карциномы Броуна-Пирс в процессе развития опухоли.

Таблица III.

Данные, характеризующие процентное содержание азота и фосфора в препаратах гликогенов, полученных из печени здоровых кроликов и с карциномой Броуна-Пирс

Препараты гликогенов печени кроликов			
здоровых		раковых	
содержание азота в %	содержание фосфора в %:	содержание азота в %	содержание фосфора в %
0,015	0,0025	0,027	0,0010
0,020	0,0011	0,023	0,0052
0,027	0,0012	0,018	0,0011
0,020	0,0061	0,050	0,0069
0,016	0,0011	0,020	0,0077
0,027	0,0011	0,016	0,0056
0,025	0,0048	0,048	0,0011
0,013	0,0012	0,015	0,0011
0,019	0,0015	0,027	0,0014
0,026	0,0017	0,034	0,0015
0,024	0,0016	0,017	0,0026
0,032	0,0014	0,019	0,0017
0,050	0,0012	0,026	0,0013
0,042	0,0032	0,048	0,0011
0,040	0,0014	0,015	0,0017
0,024	0,0011	0,029	0,0012
0,027	0,0026	0,046	0,0014
0,030	0,0014	0,033	0,0045
0,034	0,0025	0,035	0,0020
0,031	0,0034	0,038	0,0046
0,026	0,0014	0,012	0,0013
0,019	0,0043	0,018	0,0033
0,030	0,0036	0,033	0,0013
0,027	0,0034	0,029	0,0025
0,053	0,0031	0,020	0,0053
0,027	0,0011	0,026	0,0012
0,048	0,0015	0,030	0,0015
0,042	0,0033	0,027	0,0033
0,018	0,0014	0,028	0,0016
	0,0034		0,0027

Таблица IV.

Содержание гликогена в печени кроликов с
карциномой Броуна-Пирс после 13-го дня
развития опухолевого процесса

Вес кролика в грам- мах	: Вес печени : в грам- мах	: Количество гликогена : в печени : в %	: Вес кролика : в грам- мах	: Вес печени : в грам- мах	: Количество гликогена : в печени : в %
2170	51,2	0,26	2065	65,8	0,51
2050	58,6	0,31	1820	85,0	0,40
2619	95,0	0,56	2080	58,7	0,16
2320	87,5	0,22	1515	51,0	0,72
1157	53,5	0,46	2445	65,3	0,48
1887	72,0	0,96	2400	60,5	0,32
2587	90,8	0,32	2300	51,2	0,79
1900	65,4	0,53	2392	72,0	0,40
1640	53,7	0,38	2070	63,4	0,48
2465	64,0	0,56	1705	57,1	0,30
1815	54,1	0,24	2140	80,0	0,24
2438	67,7	0,20	2430	82,0	0,23
1985	42,9	0,39	2075	56,4	0,41
1465	39,6	0,42	2470	65,7	0,31
1795	49,7	0,24	2340	91,0	0,30
2411	73,2	0,67	1990	63,7	0,62
1910	57,0	0,32	2290	59,2	0,32
2315	79,2	0,47	2441	63,0	0,25
1995	65,6	0,68	1993	70,4	0,29
1912	53,0	0,26	2125	65,2	0,58
Средние данные :			2098	66,0	0,41

Таблица У.

СОДЕРЖАНИЕ ГЛИКОГЕНА В ПЕЧЕНИ ЗДОРОВЫХ КРОЛИКОВ

Вес кролика в грам- мах	Вес печени : в грам- мах	Количество гликогена : в печени : в %	Вес кролика : в грам- мах	Вес печени : в грам- мах	Количество гликогена : в печени : в %
2850	72,0	6,72	2185	56,2	1,96
2540	88,5	4,09	1585	48,0	2,49
2100	56,9	6,04	1730	52,6	2,63
2000	67,0	3,28	3105	63,2	1,98
2290	59,2	4,52	3619	107,0	2,07
1495	42,2	3,10	4168	112,0	3,58
2115	56,7	3,06	2860	74,8	2,61
3089	67,0	2,58	2370	60,3	2,42
2929	67,5	2,45	2830	66,0	2,89
1972	95,0	6,42	2025	60,5	2,86
1707	57,0	4,78	1895	56,3	2,45
1630	53,7	2,81	2286	79,0	2,42
1660	36,0	3,36	2100	57,6	2,07
2595	74,3	2,53	2190	76,0	2,95
1780	49,1	2,22	2340	67,4	5,21
2970	95,4	4,19	2152	78,0	4,49
2070	58,0	2,59	1840	74,7	2,46
1625	46,7	2,31	2037	75,2	4,66
1529	57,2	3,47	2610	110,0	2,55
1845	64,0	2,39	1840	61,7	2,47
Средние данные :			2263	67,4	3,25

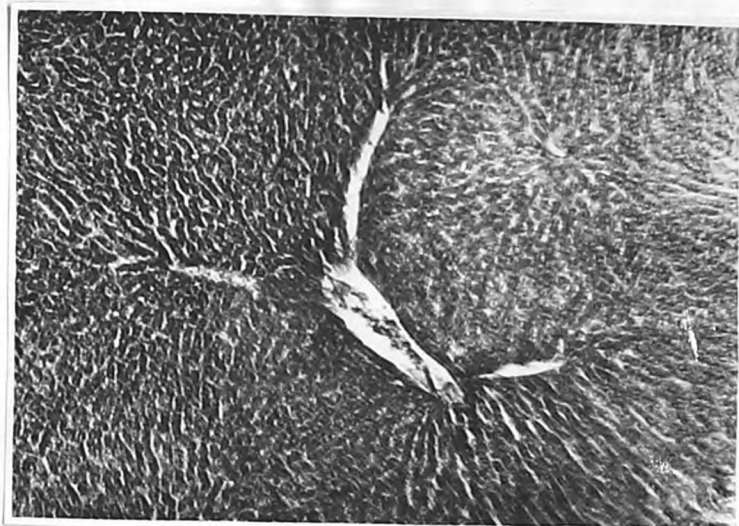


Рис. II. Микрофотография печени здоровой белой мыши.
Окраска по А. Л. Шабадашу.
Увеличение $\times 240$.

В печени здоровых белых мышей, содержавшихся на полноценном пищевом рационе, на протяжении всего срока эксперимента содержание гликогена в печени существенно не изменялось. При исследовании печени этих животных, забиваемых в каждый день опыта, наблюдалась однотипная картина, свидетельствующая о значительном количестве гликогена в изучаемом органе. Зерна гликогена, окрашенные в красно-фиолетовый цвет, диффузно заполняли почти всю печеночную ткань, оставляя свободными лишь просветы сосудов и межбалочные пространства.

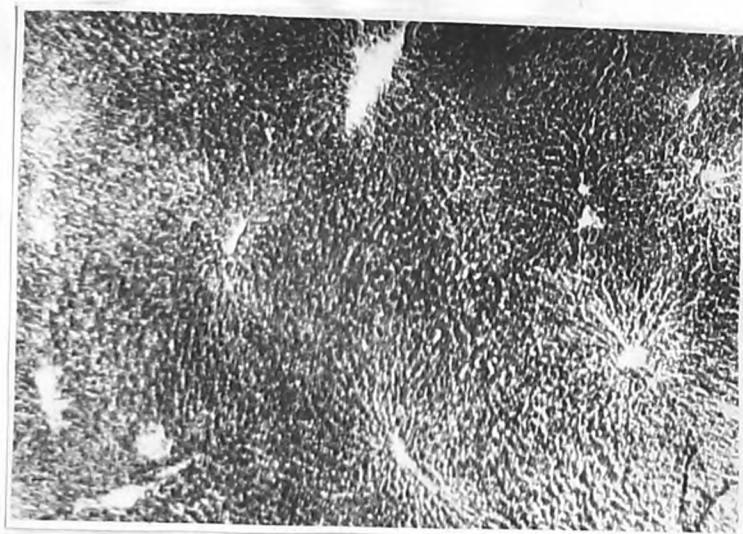


Рис. II. Микрофотография печени белой мыши, забитой через сутки после перевивки карциномы Эрлиха. Окраска по А.А.Шабадаву. Увеличение $\times 240$.

Наблюдается заметное уменьшение содержащегося в печени гликогена. Отложение исследуемого полисахарида носит выраженный очаговый характер с концентрированием у просветов центральных вен. Периферия печеночных балок, как правило, свободна от гликогена, а если он имеется там, то обнаруживается в виде очень мелких диффузно расположенных зерен.

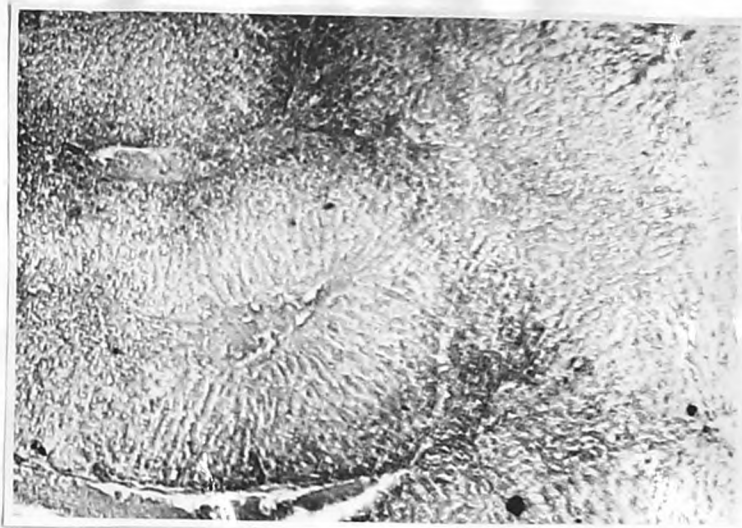


Рис. IV. Микрофотография печени белой мыши, забитой через 2 суток после перевивки карциномы Эрлиха. Окраска по А.Л.Набадшу. Увеличение $\times 240$.

В этот период обнаруживается значительное уменьшение содержания гликогена в печени подопытных животных. Исследуемый полисахарид имеется лишь только в центре печеночных балок, где он располагается в непосредственной близости от просвета сосудов в виде мелких зерен, диффузно заполняющих печеночные клетки.

При этом большая часть ткани печени остается свободной от гликогена.

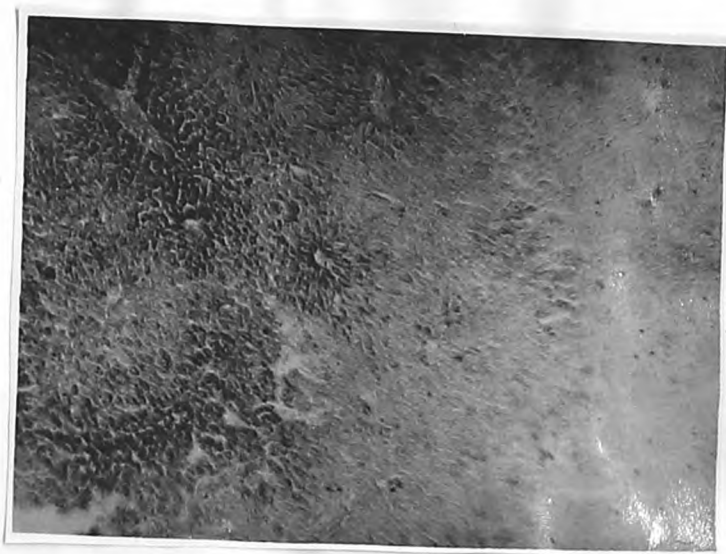


Рис.У. Микрофотография печени белой мыши, забитой через 3 суток после пересадки карциномы Эрлиха. Окраска по А.Л.Шабадашу. Увеличение $\times 240$.

Наблюдается дальнейшее обеднение печени гликогеном вплоть до почти полного исчезновения интересующего нас полисахарида из клеток изучаемого органа. В этот срок исследования в печени мышей обнаруживаются слабовыраженные отложения гликогена, представленные единичными зернами, расположенными около сосудов. В ряде препаратов даже в непосредственной близости от просвета сосудов, где обычно концентрируется изучаемый нами полисахарид, наблюдается лишь слабовыраженная мелкая зернистость, представляющая собой следы гликогена.

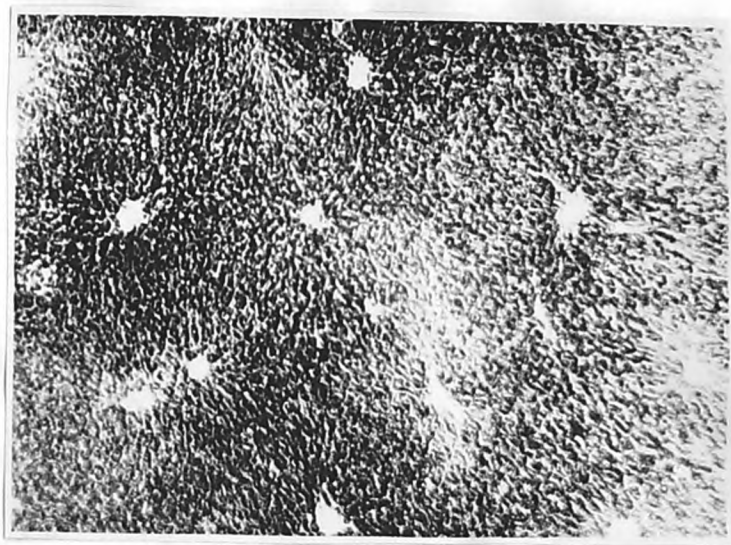


Рис. УІ. Микрофотография печени белой мыши, забитой через 4 суток после перерыва карциномы Эрлиха. Окраска по А.Л. Набадашу. Увеличение $\times 240$.

На данном этапе развития опухолевого процесса в печени подопытных животных в ряде случаев имела место выраженная очаговость отложения гликогена с концентрацией его у просветов центральных вен, у других животных наблюдались едва заметные отложения этого полисахарида у сосудов печени, а у некоторых мышей гликоген в печени гистохимическим методом практически не обнаруживался.

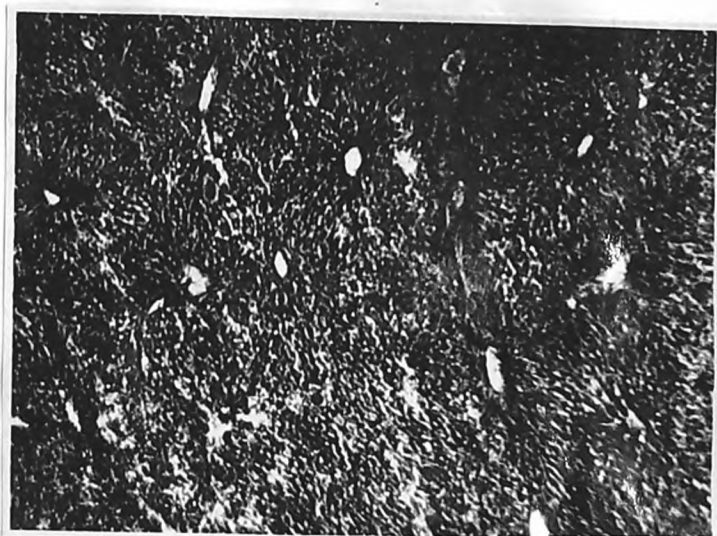


Рис. УП. Микрофотография печени белой мыши, забитой через 5 суток после перенесения карциномы Эрлиха. Окраска по А.Л.Шабадашу. Увеличение $\times 240$.

В этот срок заболевания в значительном количестве случаев исследования печени больных животных наблюдалась картина, свидетельствующая о явном накоплении гликогена в изучаемом органе. Отложение гликогена носило очаговый характер, при этом исследуемый полисахарид отличался по микроскопической картине от гликогена, определяемого во все предыдущие сроки исследования, а также от гликогена, наблюдаемого в печени здоровых белых мышей.

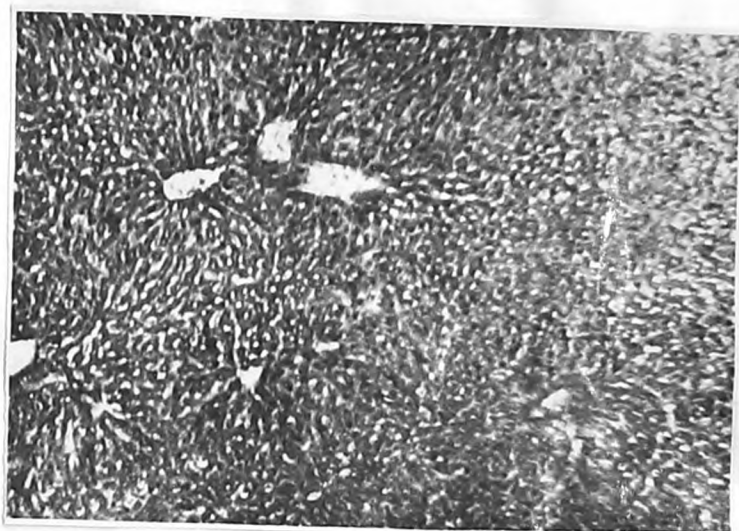


Рис. УШ. Микрофотография печени белой мыши, забитой через 6 суток после перенесения карциномы Эрлиха. Окраска по А.Л.Шабдашу. Увеличение $\times 240$.

В этот период исследования у большей части забитых животных в печени обнаруживаются значительные количества гликогена, который откладывается в клетках в виде крупных, резко очерченных, интенсивно окрашенных зерен. Последние располагаются по всей ткани печени или локализируются, представляя собой картину разлитой очаговости, с выраженной концентрацией его около просветов сосудов.

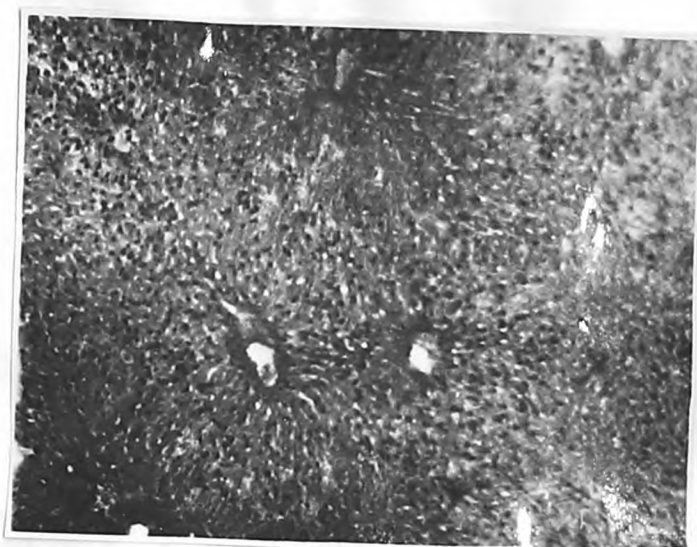


Рис. IX. Микрофотография печени белой мыши, забитой через 7 суток после перенесения карциномы Эрлиха. Окраска по А.Л.Шабадашу. Увеличение $\times 240$.

У большей части исследованных животных в этот период наблюдается заметное уменьшение количества гликогена в печени. При этом у всех подопытных животных гликоген печени компактный, представленный в виде крупных, резко очерченных зерен, отличающихся по гистохимической картине от первоначально существующего в печени гликогена, исчезнувшего на первом этапе канцеризации организма.

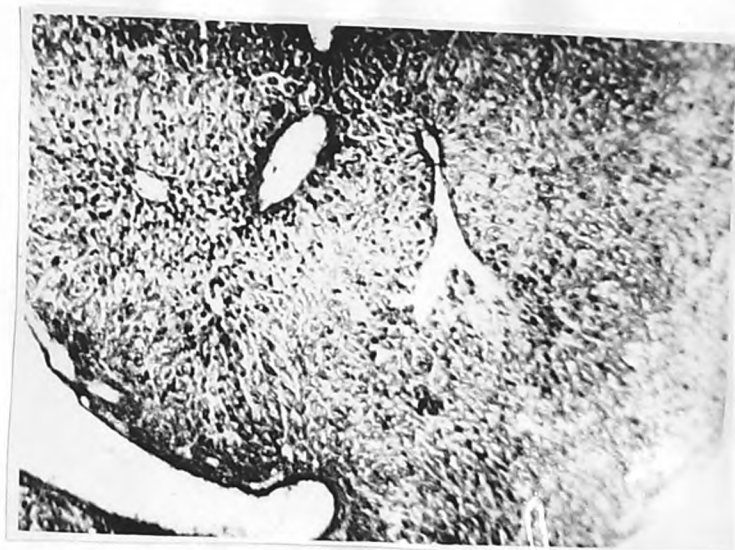


Рис.Х. Микрофотография печени белой мыши, забитой через 8 суток после перенесения карциномы Эрлиха. Окраска по А.Л.Шабадашу. Увеличение $\times 240$.

При исследовании раковых мышей на данном этапе развития заболевания у большинства животных в печени обнаруживались компактные глыбки гликогена со слабо выраженной очаговостью расположения около сосудов, а у части животных имело место выраженное обеднение печени гликогеном.

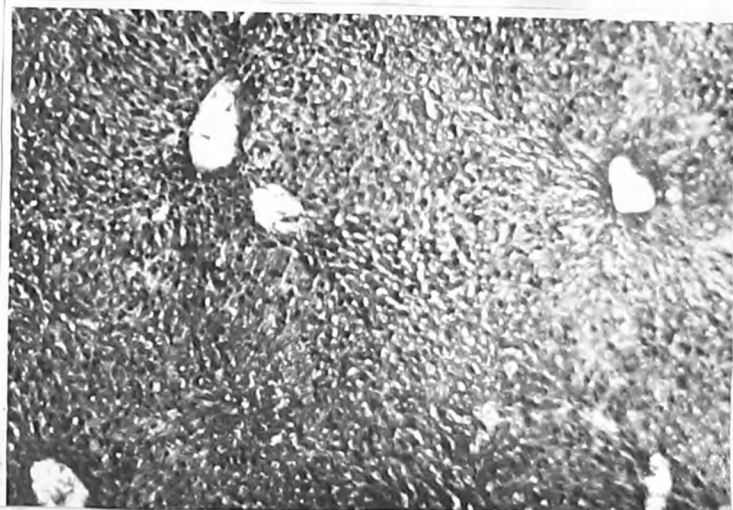


Рис. XI. Микрофотография печени белой мыши, забитой через 9 суток после перенесения карциномы Эрлиха. Окраска по А.Л.Шабадашу. Увеличение $\times 240$.

По мере развития заболевания обнаруживается дальнейшее обеднение печени гликогеном. Последний обнаруживается в виде единичных крупных зерен лишь в ткани печени, прилегающей к центральным венам. Остальная часть ткани исследуемого органа почти свободна от гликогена.

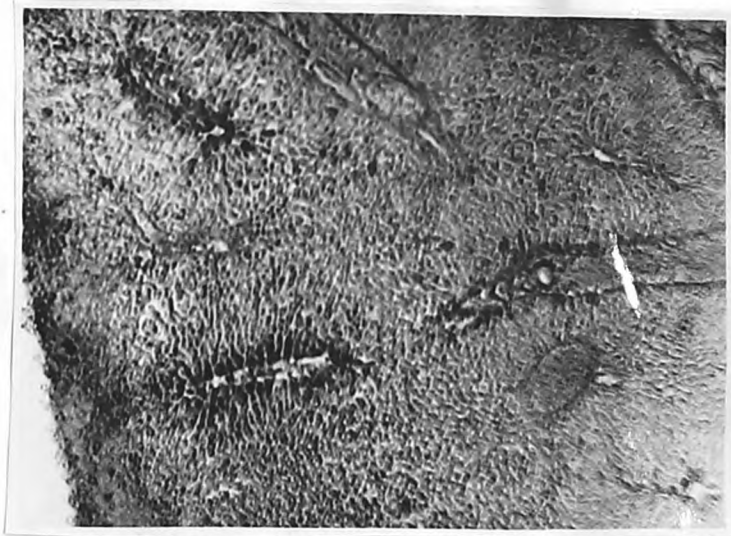


Рис. XII. Микрофотография печени белой мыши, забитой через 10 суток после перенесения карциномы Эрлиха. Окраска по А.Л.Набадашу. Увеличение $\times 240$.

Дальнейшее развитие процесса канцеризации в организме подопытного животного приводит к тому, что гликоген практически исчезает из печени или же обнаруживается в виде единичных зерен лишь только в непосредственной близости от просветов сосудов исследуемого органа. Животные в этот период находятся уже в тяжелейшем состоянии, свидетельствующем о приближении гибели.

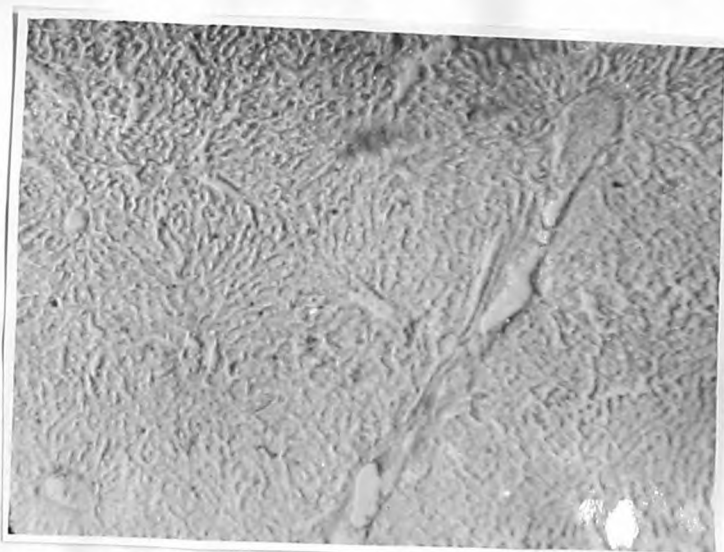


Рис. XIII. Микрофотография печени белой мыши, забитой через II суток после перенесения карциномы Эрлиха. Окраска по А.Л.Шабадашу. Увеличение $\times 240$.

В этот период заболевания и в последующие сроки исследования вплоть до гибели животных гликоген в печени не обнаруживался. Полное освобождение печени от гликогена совпадало со сроком гибели подопытных животных. У животных, погибающих или только что погибших от карциномы Эрлиха, печень всегда была свободна от гликогена, который не обнаруживался даже в виде следов.

- 0 -

Гистохимические исследования проведены на 228 белых мышках с привитой карциномой Эрлиха с параллельным определением гликогена печени у 192 здоровых контрольных животных того же вида, у которых количество и локализация гликогена в печени почти не изменялись. Следовательно, иллюстрируемые выше изменения в содержании печеночного гликогена у группы опытных животных связаны с процессом канцеризации организма белой мыши.

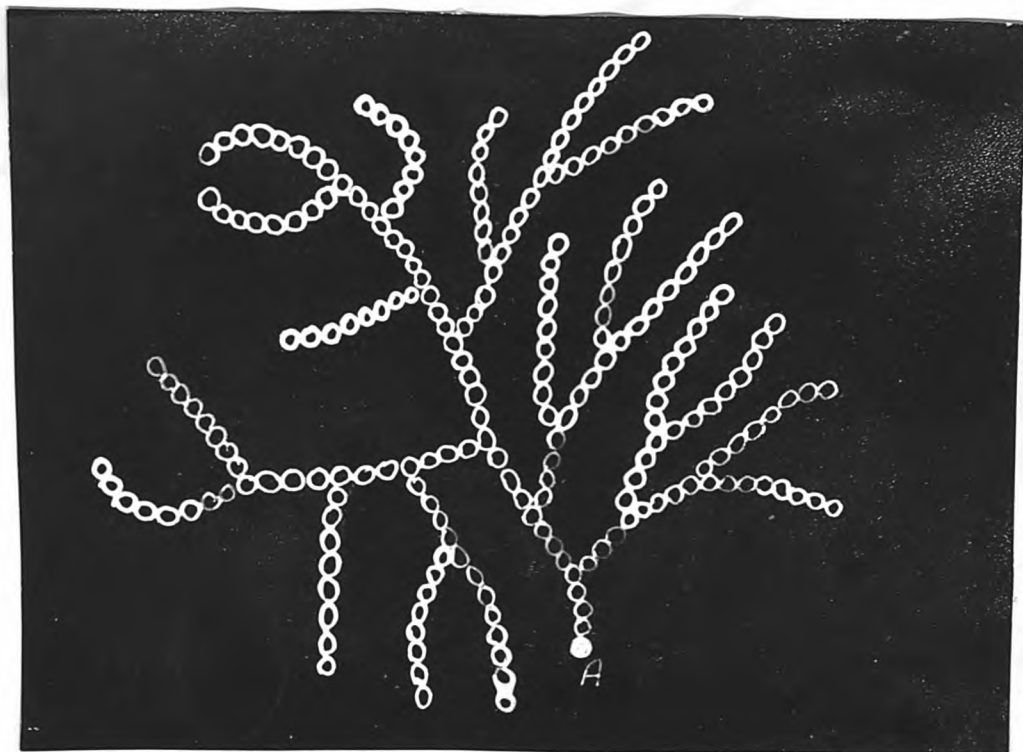


Рис. XIV. Схема строения молекулы гликогена по Meyer'у
 А - альдегидный конец молекулы (редуцирующий гликозный остаток).

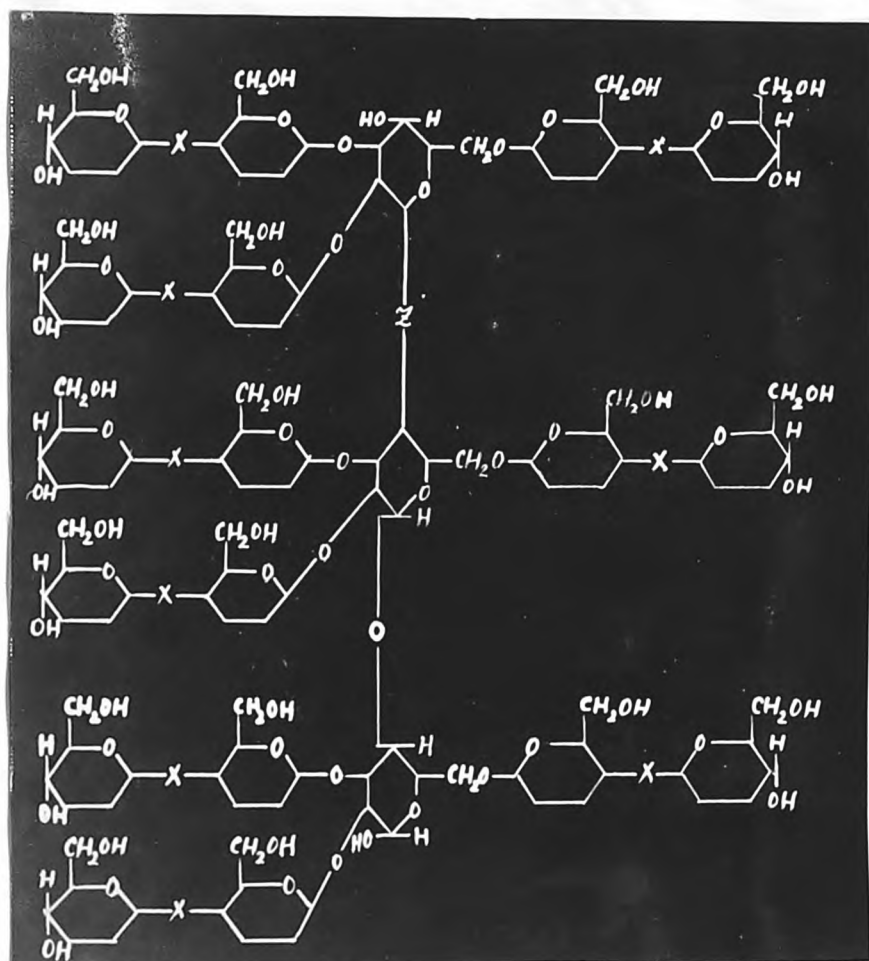


Рис. XV. Схема строения молекулы гликогена по Staudinger'у.

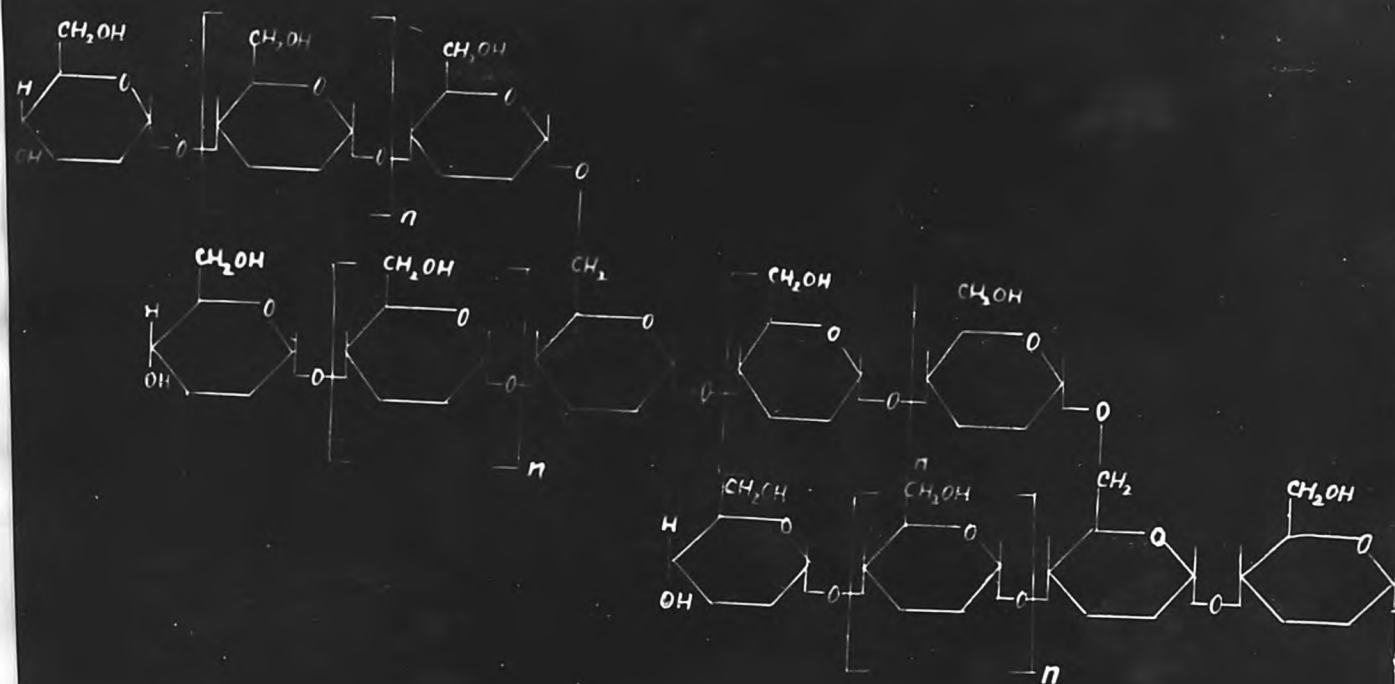


Рис. XVI. Схема строения молекулы гликогена по Haworth'у.

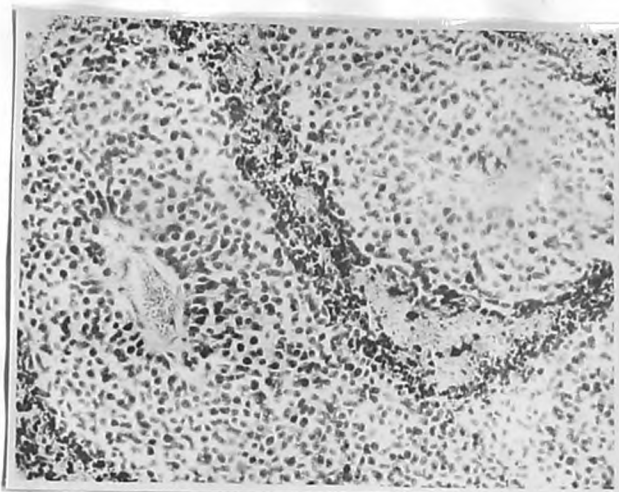


Рис. XVII. Микрофотография гистологического среза ткани карциномы Броуна-Пирс. Опухоль характеризуется наличием крупных атипических клеток округлой формы, которые занимают массивные поля. Ядра клеток большие, овальные. По ядру каждой клетки в виде мелких глыбок равномерно распределен хроматин. Имеется значительное количество фигур митоза. Наблюдаются обширные зоны некроза опухолевой ткани с очаговым отложением извести.

Периодическое гистологическое исследование опухолевого штанина, используемого в работе, проводилось в лаборатории кафедры патологической анатомии Омского медицинского института (зав. кафедрой профессор К.С. Бульбаков).



Рис. ХУВ. Макроскопическая картина, наблюдаемая при вскрытии кролика с карциномой Броуна-Пирс, забитого на 20-ые сутки развития опухолевого процесса. Имеются множественные опухолевые разрастания на сальнике в области диафрагмы, на брыжейке кишечника, на стенках желудка, на селезенке. Массовые разрастания опухолевой ткани обнаруживаются также в области малого таза. В почках, в легких, на внутренней стенке брюшины в этот период имеется большое количество метастазов.

В брюшной полости скапливается асцитическая жидкость. Извлеченная опухоль сальника (в чашке Петри слева) имеет вес 110 граммов.