

ВОЗРАСТ И СОДЕРЖАНИЕ НУКЛЕОПРОТЕИДОВ В ЖИВОТНОМ ОРГАНИЗМЕ

(О возрастных соотношениях между протоплазмой и метаплазмой)

Е. Ф. СЕРГИЕНКО

Сектор общей физиологии (зав.—проф. А. В. Нагорный) Зоолого-биологического института и кафедра биохимии (зав.—проф. И. Н. Буланкин) Харьковского государственного университета

1. Постановка вопроса

Известно, что любой организм на протяжении жизненного пути изменяется, претерпевая весьма сложные возрастные превращения. В процессе этих превращений огромную роль играют химические изменения белка как важнейшего компонента в составе организма.

В организме мы встречаемся с разнообразными белками. Однако уже и сейчас мы имеем возможность разделить их на две большие группы. К первой группе следует отнести белки протоплазматические—протеины и протеиды. Вторая группа—протеиноиды—белки, из которых строятся так называемые метаплазматические образования в организме. Они являются производными от протоплазматических белков и образуют разнообразные структуры, выполняющие, главным образом, скелетную функцию.

По мнению Kassowitz'a (1899), непрерывные процессы созидания и разрушения обусловлены не общей массой белка в организме, а только активной протоплазмой. Все продукты протоплазматической дифференцировки (метаплазма) представляют собой не что иное, как продукты распада протоплазматических белков, их молекулы—простые осколки более сложных молекул протоплазмы. Этот „инактивный распад“ совершается, по Kassowitz'у, в течение всей жизни, благодаря чему количество метаплазмы все более и более возрастает, количество же протоплазмы, наоборот, прогрессивно падает. Прогрессивное уменьшение способной к ассимиляции протоплазмы и является, как думал Kassowitz, причиной старческих изменений и смерти. Приблизительно сходную теорию „биоредуктивных процессов“ развил не так давно и Мильман (1926). К теории возрастного накопления метаплазматических образований присоединяются Cohnheim (1911), Kestner (1934) и др.

Не отрицая положения о непрерывном нарастании метаплазмы с возрастом, А. В. Нагорный (1938, 1940) полагает, что последняя

не всегда должна вызывать затухание интенсивности жизненных процессов. Возникновение и прогрессивное накопление метаплазмы, увеличивая гетерогенность организма, вначале создают условия для более интенсивного обмена, и только дальнейшее накопление метаплазмы приводит к постепенному затуханию интенсивности метаболизма.

К сожалению, вопрос о возрастном нарастании метаплазмы до сих пор имеет недостаточное экспериментальное обоснование. Мы имеем разрозненные гистологические наблюдения и ряд косвенных

данных, подтверждающих это общее утверждение (Růžicka, Кизель). Эти данные говорят о накоплении метаплазмы в самых общих чертах. А в то же время несомненно, что вопрос о соотношении между протоплазмой и метаплазмой в организме имеет огромное значение. Вот почему совершенно безоговорочное решение вопроса о возрастном нарастании метаплазмы в организме имеет большой практический интерес при разрешении проблемы возрастной физиологии и биохимии. С этой целью в нашей лаборатории Г. П. Литовченко (1938) были проведены гистологические исследования различных тканей и органов, и было установлено закономерное увеличение метаплазматических образований с возрастом.

Однако гистологические исследования дают скорее качественную картину возрастных изменений и поддаются весьма относительному количественному учету. Именно поэтому перед нами встал вопрос о разработке количественного химического метода определения белков протоплазмы и метаплазмы. При разрешении этой задачи мы исходили из следующих положений:

1. Почти все образования протоплазматического типа (клеточные и синцитиальные) содержат ядерную субстанцию, в то время как метаплазматические образования, являясь главным образом межклеточными веществами, ядерной субстанции не имеют.

2. О количестве протоплазмы в организме можно судить по количеству нуклеопротеидов, сконцентрированных почти исключительно в ядерной субстанции клеток. Метаплазматические образования состоят из „деградированных“ белков—протеиноидов—и нуклеопротеидов в своем составе не имеют.

3. Отсюда уменьшение нуклеопротеидов, установленное на единицу общего количества белка, будет указывать на вытеснение с возрастом протоплазматических белков белками метаплазматическими.

II. Методика

При разрешении поставленной перед нами задачи—количественного учета нуклеопротеидов в целом организме—мы избрали метод определения нуклеопротеидного фосфора как характерного элемента, входящего в состав нуклеиновых кислот. При этом мы исходили из совершенно правильного положения, что белки метаплазмы не содержат фосфора. Основанием для выбора нашей методики послужили работы Plimmer'a и Scott'a (1908), которые разработали методы анализа фосфопротеинов и нуклеопротеидов в тканях животного организма по фосфору. Эти методы видоизменены Masing'ом (1911) и затем—нами с целью приспособления к изучаемому объекту.

Работа проводилась на белых крысах различных возрастов. Животное убивалось путем декапитации над эмалированной ванночкой, быстро вскрывалась брюшная полость, вынимался и про-

мывался от содержимого кишечника и затем все животное быстро и тщательно измельчалось ножницами. Операция эта производилась на холоду. После измельчения масса распределялась в ванночке тонким слоем и помещалась в сушильный шкаф при температуре 105° . При этой температуре быстро разрушаются ферменты и, следовательно, необратимо прерываются автолитические процессы. Подсушенная таким образом масса растиралась возможно более тщательно в фарфоровой ступке и снова помещалась в сушильный шкаф; здесь материал, превращенный в сплошную пасту с равномерным распределением всех составных частей, вплоть до костей скелета, шерсти, зубов, сушился до постоянного веса, после чего тщательно собирался в бюкс, на стенке которого записывался номер животного, его возраст и вес, а сам бюкс хранился в эксикаторе.

Таким способом было заготовлено свыше сотни животных, по 10—12 экземпляров на каждый возраст. Навеска вещества того или иного животного тщательно обезжиривалась, обрабатывалась 1% раствором соляной кислоты для отмывки кислоторастворимого фосфора и фосфора скелета. Образовавшаяся взвесь осаждалась сернокислой магнезией, осадок переносился на фильтр и многократно промывался,—сначала смесью спирта и эфира, а затем эфиром. Доведенный до постоянного веса остаток минерализовался мокрым способом, после чего производилось определение нуклеопротеидного фосфора колориметрически по Фиске и Зуббарову. Протеинового фосфора обнаружить не удалось, что совпадает с данными Plimmer'a и Scott'a. Расчет фосфора производился на 1 г сухого белка и на 1 г сухого веса общей массы животного.

III. Возрастные изменения нуклеопротеидного фосфора в целом организме

Нашими исследованиями были охвачены новорожденные, пятнадцатидневные, месячные, трехмесячные, шестимесячные, годовые, двух- и двух с половиной годовые животные, причем на каждый возраст приходилось не менее десятка индивидуумов. Результаты наших исследований сведены в табл. 1.

Из полученных данных видно, что количество нуклеопротеидного фосфора снижается на протяжении всей жизни, причем наиболее сильное снижение наблюдается в течение первых трех месяцев. Это справедливо как при расчете на единицу белковой массы, так и при пересчете на 1 г сухого веса общей массы животного. Утверждение это иллюстрируется рис. 1.

Воспользовавшись данными по содержанию воды в изучаемом объекте, полученными нашей лабораторией, мы попытались произвести пересчет нуклеопротеидного фосфора на сырой вес животного.

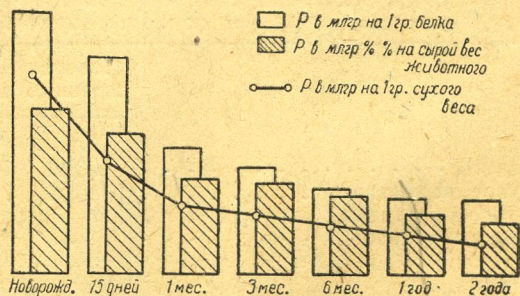


Рис. 1. Возраст и содержание нуклеопротеидного фосфора в целом организме (Незаштрихованные столбики—фосфор в мг на 1 г белка, заштрихованные—фосфор в мг % на сырой вес; точки, соединенные линией,—фосфор в мг на 1 г сухого веса).

Таблица 1

Изменение количества нуклеопротеидного фосфора в целом организме в зависимости от возраста белых крыс

Новорожденные		15 дней		1 месяц		3 месяца		6 месяцев		1 год		2—2½ года	
Р в мг на 1 г белка	Р в мг на 1 г сухого веса	Р в мг на 1 г белка	Р в мг на 1 г сухого веса	Р в мг на 1 г белка	Р в мг на 1 г сухого веса	Р в мг на 1 г белка	Р в мг на 1 г сухого веса	Р в мг на 1 г белка	Р в мг на 1 г сухого веса	Р в мг на 1 г белка	Р в мг на 1 г сухого веса	Р в мг на 1 г белка	Р в мг на 1 г сухого веса
3,56	2,43	2,71	1,35	1,65	1,06	1,30	0,73	1,17	0,61	1,05	0,50	1,01	0,45
3,23	2,70	2,54	1,18	1,66	1,05	1,35	0,77	1,01	0,60	1,01	0,48	1,02	0,45
3,41	2,66	2,85	1,40	1,74	1,05	1,36	0,72	0,91	0,54	1,10	0,55	1,00	0,37
3,48	2,84	2,50	1,20	1,40	0,68	1,72	0,96	1,09	0,67	0,99	0,47	1,07	0,46
3,45	2,90	2,75	1,65	1,42	0,60	1,49	0,86	1,16	0,64	1,00	0,47	0,90	0,36
3,39	2,81	2,65	1,62	1,73	0,95	1,33	0,80	1,10	0,60	0,93	0,45	0,91	0,35
3,44	2,81	2,69	1,33	1,55	0,92	1,37	0,72	1,12	0,63	0,98	0,51	0,94	0,37
3,50	2,23	3,38	1,77	2,00	1,00	1,42	0,72	1,19	0,70	1,08	0,56	1,01	0,48
3,62	2,53	3,33	1,71	1,53	0,85	1,28	0,78	1,13	0,63	0,97	0,53	0,92	0,45
3,63	2,25	3,02	1,46	1,52	0,82	1,20	0,70	1,00	0,60	0,94	0,50	0,96	0,44
3,47	2,61	2,84	1,46	1,62	0,89	1,38	0,77	1,08	0,62	1,00	0,50	0,97	0,41

Данные табл. 2 показывают, что количество нуклеопротеидного фосфора на единицу сырого веса с возрастом непрерывно падает. Это значит, что количество ядерной массы и, следовательно, массы протоплазматической в организме в течение жизни уменьшается. Следовательно, в организме действительно совершается возрастное замещение протоплазмы метаплазмой—явление, которому мы впервые даем не только качественное, но и количественное выражение.

Таблица 2

Вода, сухое вещество и нуклеопротеидный фосфор в организме белых крыс различного возраста

	Новорожденные	15 дней	1 мес.	3 мес.	6 мес.	1 год	2—2½ года
Вода %	83,44	74,52	72,27	68,95	67,25	65,91	65,10
Сухое вещество	16,56	25,48	27,73	31,05	32,75	34,09	34,90
Нуклеопротеидный фосфор в мг % на сырой вес	43	37	25	24	21	16	14

IV. Возрастные изменения нуклеопротеидного фосфора в отдельных органах

Установление факта возрастного нарастания метаплазматических образований было бы неполным разрешением вопроса, если бы мы ограничились только анализом нуклеопротеидного состава в целом организме. Вот почему наряду с этим мы исследовали и возрастные изменения нуклеопротеидного фосфора в наиболее важных органах

белых крыс, а именно в печени, мышцах и мозгу. Органы постепенно собирались, фиксировались спиртом и сохранялись отдельно для каждого возраста.

Обработка производилась таким образом: мышцы, мозг и печень, извлеченные из спирта, измельчались, обезживались кипячением с ацетоном и тщательно обезжиривались. Затем растертая в порошок ткань подвергалась обработке 5% трихлоруксусной кислотой для отмывки кислотнорастворимого фосфора. После обработки трихлоруксусной кислотой взвесь отфильтровывалась, осадок на фильтре промывался чистой, дистиллированной водой и вода осторожно отсасывалась при помощи водоструйного насоса; затем производилось двух-трехкратное промывание спиртом и эфиром и фильтры с содержимым сушились в сушильном шкафу до постоянного веса. Материал переносился в бюксы и сохранялся в эксикаторах. Навески (30—100 мг) сжигались мокрым способом. Определение фосфора производилось колориметрически по Фиске и Зуббарову. Результаты этих определений приводятся в табл. 3 и 4.

Таблица 3

Возрастные изменения количества нуклеопротеидного фосфора (в мг на 1 г белковой субстанции) в различных органах белых крыс

Ново- рожденные	Печень					Ново- рожденные	Мозг					Ново- рожденные	Мышцы				
	15 дней	1 месяц	3 месяца	6 месяцев	2 года		15 дней	1 месяц	3 месяца	6 месяцев	2 года		15 дней	1 месяц	3 месяца	6 месяцев	2 года
13,40	9,63	9,36	7,30	6,00	5,70	10,00	4,00	3,50	3,10	3,60	3,40	7,30	4,10	2,10	1,10	1,30	1,03
11,10	8,72	8,70	7,50	6,80	5,80	9,90	3,50	3,70	3,00	—	3,80	9,20	4,03	1,90	1,25	1,10	1,07
11,90	8,90	7,60	6,56	6,00	5,70	10,00	3,80	3,60	3,20	3,80	3,20	10,00	4,75	1,80	1,10	1,04	1,02
13,00	7,90	7,10	6,60	5,74	6,10	9,00	3,50	3,30	3,00	3,40	3,80	9,20	4,82	2,20	1,42	1,05	1,10
10,70	7,60	7,60	6,00	6,00	5,00	10,00	4,50	3,90	3,60	4,50	4,30	10,00	4,73	2,10	1,20	1,04	1,10
11,10	8,90	8,50	5,50	6,20	5,10	11,00	4,80	4,10	4,00	4,30	4,00	—	—	—	—	—	—
11,86	8,61	8,14	6,74	6,12	5,63	10,00	4,00	3,68	3,61	3,92	3,75	9,10	4,49	2,02	1,21	1,10	1,06

Таблица 4

Содержание нуклеопротеидного фосфора в мг % на сырой вес органов

Органы	Ново- рожден- ные	15 дней	1 месяц	3 месяца	6 меся- цев	2 года
Печень	253,8	234,2	223,9	189,4	176,8	165,5
Мозг	115,0	—	—	81,3	84,3	82,1
Мышцы	191,1	95,6	44,0	27,8	26,2	25,6

Как видно из табл. 3 и 4 и рис. 2, во всех трех органах содержание нуклеопротеидного фосфора с возрастом закономерно падает, но характер этого падения не одинаков. Наибольшее падение испытывает мышечная ткань, особенно до месячного возраста животного. Начиная с трехмесячного возраста изменения весьма незначительны.

В общем содержание нуклеопротеидного фосфора в мышцах старых животных по сравнению с мышцами новорожденных падает на 88,4%. Такое большое падение может быть объяснено только тем, что в мышечной ткани, как, пожалуй, ни в какой другой, создается весьма много соединительнотканых, сухожильных, т. е. метаплазматических образований.

Меньшее падение содержания нуклеопротеидного фосфора наблюдается в мозгу (62,5%), но характер кривой при этом иной. Наиболее резкое падение приходится на первые 15 дней жизни. В этот период

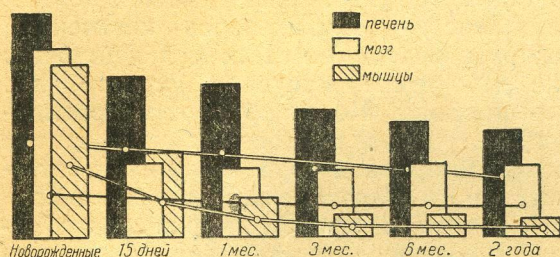


Рис. 2. Возраст и содержание нуклеопротеидного фосфора в отдельных органах (Столбики—фосфор в мг на 1 г белка; точки, соединенные линией,—фосфор в мг % на сырой вес).

количество нуклеопротеидного фосфора падает на 60%. Начиная с этого возраста цифры только слегка варьируют, не давая ясной тенденции снижения.

Данные по печени показывают наименьшее падение (52,6%) и наиболее равномерное уменьшение нуклеопротеидной массы в продолжение всей жизни животного.

Таким образом количество метаплазмы в течение индивидуального развития непрерывно растет как в целом организме, так и в отдельных важнейших органах его за счет уменьшения протоплазматических образований организма.

V. Об интенсивности обмена в связи с вопросом о количестве активной протоплазмы

После получения указанных выше данных мы поставили себе задачу увязать эти данные с интенсивностью обмена в организме в разные возрасты и, в частности, с газообменом и азотистым обменом.

Известно, что обмен у старых организмов значительно ниже, чем у молодых.

Ряд исследователей (Kassowitz, Cohnheim, Kestner, Мильман), как мы уже указывали, пытаются объяснить изменение интенсивности обмена в онтогенезе уменьшением активной протоплазмы и вытеснением последней метаплазматическими веществами, характеризующимися чрезвычайно ослабленным обменом. С этой точки зрения следует ожидать, что обмен, отнесенный на единицу протоплазмы, должен быть величиной постоянной, независимой от возраста. После того как мы установили количество нуклеопротеидного фосфора для каждого возраста белых крыс, представлялось весьма заманчивым произвести пересчет обмена на единицу этого фосфора, принимая при этом, что количество фосфора нуклеопротеидов в основном пропорционально общему количеству протоплазмы. Для этой цели мы использовали данные В. И. Махинько по газообмену и данные по белковому составу крыс (Голубицкая, 1938). Для расчета азотистого обмена нами использованы данные Махинько (1938) по коэффициенту изнашивания и соответствующие расчеты В. Н. Никитина (1940). Коэффициент изнашивания выражает минимальное количество эндогенного азота, выделяемое животным на безбелковом корме. Результаты наших пересчетов представлены в табл. 5 (см. графы 6 и 9).

Полученные таким образом весьма интересные данные показывают, что количество углекислоты на единицу нуклеопротеидного фосфора на протяжении всей жизни животного, за исключением месячного возраста, является величиной постоянной. Справедливость

Таблица 5

Возраст	Белок в г на 1 кг сырого веса	Нуклео- протеид- ный фосфор в мг на 1 г белка	Выделение CO ₂ за 1 час			Коэффициент изнашивания		
			CO ₂ в г на 1 кг сырого веса	CO ₂ в мг на 1 г белка	CO ₂ в мг на 1 мг ну- клеопро- теидного фосфора	Эндоген- ный азот мочи в мг на 1 кг сырого веса	Эндоген- ный азот мочи в мг на 1 г белка	Эндоген. азот мочи в мг на 1 мг ну- клеопрот. фосфора
15 дней .	141,2	2,84	3,70	25,8	9,1	124,1	0,885	0,311
1 месяц .	175,6	1,62	4,17	23,6	14,5	196,5	1,119	0,690
3 месяца	177,9	1,38	2,22	12,4	8,9	170,4	0,957	0,693
6 месяцев	181,6	1,08	1,82	10,0	9,2	168,1	0,925	0,856(?)
1 год .	183,6	1,00	1,75	9,5	9,5	132,7	0,722	0,722
2 года .	185,6	0,97	1,70	9,3	9,3	120,0	0,648	0,668

этого заключения подтверждается анализом эндогенного азота. Как видно из табл. 5, коэффициент изнашивания, начиная с месячного возраста, выражается однозначными величинами. Выходящую из ряда этих величин цифру в шестимесячном возрасте мы рассматриваем как случайную, ибо по данным Горбуновой (1941) количество эндогенного азота в этом возрасте ниже, чем это указывает Махинько.

Следовательно, мнение авторов, утверждающих, что интенсивность обмена пропорциональна количеству активной протоплазмы, получает как будто бы частичное подтверждение. Однако этому противоречат данные начального отрезка жизненной кривой. Как видно из табл. 5, к месячному возрасту наблюдается увеличение интенсивности дыхания и коэффициента изнашивания. С нашей точки зрения, приведенное выше мнение Kassowitz'a и др. по вопросу об интенсивности обмена страдает односторонностью.

Как уже указывалось, метаплазма не только балластное вещество, возникающее в процессе онтогенеза. Мы уже излагали точку зрения по этому вопросу А. В. Нагорного. Возникновение и прогрессивное накопление метаплазмы, увеличивая гетерогенность живого организма, вначале должно создавать условия для более интенсивного обмена и только дальнейшее накопление метаплазматических образований приводит к постепенному затуханию интенсивности метаболизма в организме. Факт повышения обмена на единицу фосфора в месячном возрасте, как нам кажется, подтверждает справедливость утверждения А. В. Нагорного. Если это так, тогда поддержку этому положению мы могли бы найти при изучении тканевого дыхания такого органа, как печень. Печень—типично паренхиматозный орган и, как показывают наши данные по фосфору, нарастание метаплазматических масс в ней идет медленно и весьма постепенно. Естественно предположить, что именно в печени, благодаря медленному и постепенному нарастанию метаплазмы, должны создаваться условия для длительного усиления интенсивности обмена без последующего затем затухания его.

Пересчеты, для которых мы воспользовались данными по тканевому дыханию, полученными в нашей лаборатории А. А. Рубановской (1938—1940), подтверждают справедливость этого положения.

В табл. 6 приводятся данные по тканевому дыханию таких органов, как печень, мозг, мышцы. Как видно из таблицы, интенсивность дыхания печеночной ткани, отнесенного на единицу нуклеопротеидного фосфора, нарастает на протяжении всей жизни, причем до месячного возраста это нарастание выражено особенно ясно. Резкий подъем интенсивности к месячному возрасту характерен также и для дыхания мышц и мозга. Мышцы особенно сильно подвержены воз-

растному замещению метаплазматическими образованиями. Это сказывается и на характере дыхания мышц после указанного подъема. В дальнейшем интенсивность метаболизма остается приблизительно на одном уровне и тем самым напоминает газообмен в целом организме (см. табл. 6).

Таблица 6

Тканевое дыхание, выраженное в поглощении кислорода (в см^3 за 1 час)

Возраст	П е ч е н ь			М о з г		
	O_2 на 1 г белка см^3	Нуклеопро- теидный фосфор в мг на 1 г белка	O_2 на 1 мг фосфора см^3	O_2 на 1 г белка см^3	Нуклеопро- теидный фосфор в мг на 1 г белка	O_2 на 1 мг фосфора см^3
1 — 3 дня	—	—	—	—	—	—
15 дней .	17,72	10,23	1,732	32,26	7,00	4,608
1 месяц .	29,36	8,14	3,606	35,16	3,68	9,554
3 месяца .	25,82	6,74	3,830	31,26	3,61	8,659
6 месяцев	27,64	6,12	4,516	31,20	3,92	7,959
2 года .	29,18	5,63	5,183	29,30	3,75	7,813

Возраст	Мышцы — 1-я серия			Мышцы — 2-я серия		
	O_2 на 1 г белка см^3	Нуклеопро- теидный фосфор в мг на 1 г белка	O_2 на 1 мг фосфора см^3	O_2 на 1 г белка см^3	Нуклеопро- теидный фосфор в мг на 1 г белка	O_2 на 1 мг фосфора см^3
1 — 3 дня	—	—	—	1,78	9,10	0,195
15 дней .	4,54	4,49	1,011	6,15	4,49	1,369
1 месяц .	6,09	2,02	3,019	9,45	2,02	4,678
3 месяца	3,51	1,21	2,900	3,96	1,21	3,272
6 месяцев	3,61	1,10	3,281	3,45	1,06	3,254
2 года .	3,00	1,06	2,830	3,45	1,06	3,254

Почти такая же картина после месячного возраста наблюдается и при дыхании мозговой ткани. После указанного выше подъема интенсивность дыхания остается в дальнейшем приблизительно на одном и том же уровне или, возможно, очень медленно падает. Это незначительное падение объясняется, как можно полагать, накоплением внутри нейронов параплазматических образований, что неоднократно отмечалось гистологами. Таким образом, приведенный в этой работе материал в основном подтверждает справедливость точки зрения проф. А. В. Нагорного.

Выводы

На основании наших исследований необходимо сделать следующие выводы:

1. Нуклеопротеидный фосфор и, следовательно, количество нуклеопротеидов на протяжении всей постэмбриональной жизни животного уменьшается как в целом организме, так и в отдельных органах (печень, мозг, мышцы). Это значит, что количество ядерной массы и, следовательно, массы протоплазматической в организме в течение жизни уменьшается.

2. В процессе постэмбрионального развития идет непрерывное замещение клеточных, протоплазматических масс образованиями ме-

таплазматического порядка, что указывает на основное направление изменений при старении организма. Данное положение нам удалось установить не только качественно, но и количественно.

3. В связи с этим нуклеопротеидный фосфор может явиться той единицей, на которую следует относить интенсивность обмена как в целом организме, так и в отдельных тканях и органах.

4. Произведенные нами расчеты интенсивности обмена на единицу нуклеопротеидного фосфора показывают, что эта интенсивность повышается до месячного возраста, после чего остается на протяжении всей жизни величиною постоянной. Эти результаты исследований говорят в пользу точки зрения А. В. Нагорного о роли метаплазмы в процессах обмена на различных стадиях онтогенеза.

ЛИТЕРАТУРА

- Голубицька, Р. І.—Зміни білкової маси тварини протягом її життя. Праці Зоолого-біол. інституту ХДУ, 7, 197, 1938.
- Кизель, А. Р.—О роли пластерна миксомицетов и о его альбуминоидном характере. Журн. exper. биологии и медицины, 15, 279, 1927.
- Литовченко, Г. П.—Деякі вікові зміни гістологічної структури органів тварин. Праці Зоолого-біол. інституту ХДУ, 5, 102, 1938.
- Махинько, В. І.—Вікові зміни величини газообміну у білих щурів. Праці Зоолого-біол. інституту ХДУ, 5, 138, 1938.
- Махинько, В. І.—Вікові зміни коефіцієнта спрацьовування. Праці Зоолого-біол. інституту ХДУ, 7, 211, 1938.
- Мильман, М. С.—Учение о росте, старости и смерти, Баку, 1926.
- Нагорный, А. В.—Проблема старения и долголетия. Изд. Харьк. гос. университета, 1940.
- Нагорный, О. В.—Про закономірності вікових змін і про другий принцип енергетики. Праці Зоолого-біол. інституту ХДУ, 5, 5, 1938.
- Никитин, В. Н.—Возрастные изменения в синтезе и распаде белков в животном организме. Сборник "Старость", Труды конференции по проблеме генезиса старости. Изд. Акад. наук УССР, 1940.
- Рубановська, А. А.—Вікові зміни оксидативних процесів у тканинах. Праці Зоолого-біол. інституту ХДУ, 5, 212, 1938.
- Cohnheim—Vorlesungen über allgemeine Pathologie, 1911.
- Kassowitz—Allgemeine Biologie, Wien, Bd. 1 u. 2, 1899.
- Kestner—Chemie des Eiweißkörper, 1924.
- Kestner—Ueber die Oberflächenregel des Stoffwechsel. Pflüg. Arch., 234, 1934.
- Masing—Über ein Beziehung zwischen Kernstoffgehalt u. Entwicklung. Zeitsch. physiol. Chem., 75, 135, 1911.
- Plimmer a. Scott—A reaction dising. phosphoprotein from nucleoprotein and the distribution of phosphoprotein in Tissues. Journ. chem. Society, 93, 1699, 1908.
- Pfaundler—Ueber die energetische Flächenregel. Pflüg. Arch., 188, 273, 1921.
- Ruzicka—Ueber Protoplasmahysterisis und eine Methode zur directen Bestimmung derselben. Arch. Entwickl. Mech., 42, 1917.

AGE AND NUCLEOPROTEID CONTENT IN THE ANIMAL BODY

(On Age Correlations between Protoplasma and Metaplasma)

E. F. SERGUIENKO

Sector of General Physiology of the Zoo-Biological Institute of the Kharkov State University (Chief—Prof. A. V. Nagorny)

The following task was put before us—to establish the age changes in correlation between protoplasma and metaplasma by means of chemical analysis.

About the amount of protoplasma in the organism one can judge by the amount of nucleoproteids, in relation to which it has been firmly established that they are concentrated in the cells and almost exclusively in the nucleic substance of the latter. The diminution of nucleoproteids, established for a unit of the total amount of protein, ought to indicate the forcing out with age of the protoplasmic proteins by the metaplasmic ones.

As object of the investigation served albino rats beginning with newborn and finishing with the age of 2 and 2 $\frac{1}{2}$ years. We judge about the amount of nucleoproteids by the nucleoproteid phosphor.

On the basis of the carried out investigations it is necessary to make the following conclusions:

1. The nucleoproteid phosphor and consequently also the amount of nucleoproteids decreases during the whole postembryonal life span of the animal both in the whole organism (see tables 1 and 2, and fig. 1) and in the separate organs—liver, brain, muscles (see tables 3 and 4, and fig. 2). This means that the amount of the nucleic mass and consequently also of the protoplasmic mass diminishes in the organism during the life span.

2. In the process of postembryonal development there takes continually place the substitution of cellular protoplasmic masses by formations of the metaplastic order. The establishing of this statement indicates as to the fundamental direction of the character of the changes at senescence of the organism. We succeeded to establish this not only qualitatively, but we were also able to express it quantitatively.

3. In this connection the nucleoproteid phosphor may represent that unit, to which there ought to be referred the intensity of metabolism both in the whole organism and in the separate tissues and organs.

4. The carried out by us calculations of the metabolic intensity to one unit of the nucleoproteid phosphor (see tables 5 and 6) show that this intensity increases up to the age of one month, after which it remains a constant value during the whole life span. These results speak in favour of the viewpoint of A. V. Nagorny about the role of metaplasma in the metabolic processes at various ontogenetic stages.

О НЕКОТОРЫХ ВОЗРАСТНЫХ ИЗМЕНЕНИЯХ ТКАНЕВОГО ПРОТЕИНА

З. Г. БРОНОВИЦКАЯ

Сектор общей физиологии (зав.—проф. А. В. Нагорный) Зоолого-биологического института и кафедра биохимии (зав.—проф. И. Н. Буланкин) Харьковского государственного университета

Живой организм в процессе индивидуальной эволюции подвергается закономерным и направленным изменениям, приводящим его к естественному концу—смерти. Ясно, что в системе этих изменений огромную роль играют изменения в химической природе белковых веществ, исторически обусловивших возникновение жизни. Вот почему изучение возрастных изменений тканевых белков представляет особый интерес.

Химическая эволюция может проявляться или в возрастных изменениях аминокислотного состава и, в частности, в изменении соотношений между моно- и диаминокислотами, или в изменении внутримолекулярных связей, или, наконец, в изменении того и другого. Выяснение этого вопроса мы и поставили своей задачей.

Одной из первых работ, посвященных возрастному изменению аминокислотного состава, является работа Abderhalden'a и Fuchs'a (1908). Эти исследователи определяли содержание глютаминовой кислоты в кератине рогов и копыт молодых и старых животных и установили, что количество глютаминовой кислоты с возрастом уменьшается. Buglia и Costantino (1912) изучали различные группы азота в мускулатуре эмбриона и взрослого быка. Было установлено, что количество общего азота нарастает с возрастом. Параллельно этому нарастанию идет увеличение азота моно- и диаминокислот, причем отношение азота моноаминокислот к таковому же диаминокислот остается практически неизменным и, следовательно, от возраста не зависит. Ehrenberg (1925) в этом же возрастном разрезе произвел исследование аминокислотного состава печени и мозга человека и печени, почек и мозга кролика. Приводимый им цифровой материал показывает ясно выраженные колебания в отдельных группах азота, но установить каких-либо закономерных возрастных изменений, как мы полагаем, автору не удалось. Правда, данные Ehrenberg'a говорят как будто в пользу возрастного увеличения гистидина и соответственного уменьшения лизина в белке печени кроликов, но эти выводы в значительной мере обесцениваются тем обстоятельством, что ана-

Лизы были произведены на единичных экземплярах и, следовательно, величина возможных индивидуальных колебаний не известна. Имеется также ряд исследований, посвященных изучению содержания цистина в кератинах волос человека и животных на различных стадиях онтогенеза (Wilson a. Lewis—1927, Tadokoro—1930, Okuda a. Katai—1934 и Block—1935). Все авторы, за исключением Wilson'a и Lewis'a, приходят к выводу об увеличении цистина с возрастом. Schenck (1930) при изучении глубина обнаружил возрастное уменьшение аргинина и моноаминокислот. Эти же изменения им были обнаружены и при анемии. Deseö, Lamoth и Fodor (1934) произвели определение содержания тирозина и триптофана в альбумине сыворотки крови новорожденных телят и материнских организмов. Авторы делают вывод о возрастном нарастании этих аминокислот, однако на основании рассмотрения полученных ими данных мы полагаем, что этот вывод не соответствует их фактическому материалу. Block (1932—1937) на основании ряда произведенных им исследований аминокислотного состава тканевых белков приходит к выводу о константности аминокислот в тканевых протеинах. Отсутствие возрастных изменений в групповом составе аминокислот констатируется Галвяло (1937) при исследовании мышечных белков куриного эмбриона и взрослой курицы. Детальные работы лаборатории Капланского (1936—1938), произведенные на тканевых белках, свидетельствуют, что никаких изменений в содержании циклических, а также диаминокислот и аланина в постэмбриональном развитии человека и животных обнаружить не удаётся (Буданова—1936, Карягина—1936 и Тустановский—1938). В работе Добрыниной (1940) устанавливается некоторое различие в возрастных изменениях аминокислотного состава белка полушарий головного мозга и мозжечка. Однако утверждение автора о характере возрастных изменений триптофана, цистина и аргинина не имеет достаточных оснований, так как произведены неправомерные расчеты на сухой вес белка, а не на общий азот, количество которого также изменяется с возрастом. Гуревич (1939) не нашла возрастных изменений в содержании тирозина и триптофана при исследовании белков мышц у кур „белый леггорн“.

Весь приведенный выше материал касается животных организмов. Однако аналогичные исследования производились и на растительных объектах. Так, лабораторией А. Кизеля (1936—1938) исследовались белки семян пшеницы, ржи и льна на различных стадиях зрелости (Каструбин, Агатов, Безингер). При этом наблюдались небольшие изменения в содержании некоторых аминокислот. Изменения эти, по мнению авторов, превышают размеры ошибки метода. На основании этих исследований Кизель развивает взгляд о „малой перестройке белка“ как о процессе, весьма распространенном в природе.

Из приведенных литературных данных чрезвычайно трудно сделать какой бы то ни было общий вывод о возрастных изменениях тканевых белков. Нельзя указать ни отдельных аминокислот, ни отдельных групп аминокислот, в отношении которых возрастные изменения были бы достаточно экспериментально обоснованы. Исключение как будто бы представляют цистин и глютаминовая кислота в кератинах, для которых установлены те или иные возрастные изменения. Однако кератины являются белками опорного типа, в то время как нас, естественно, интересуют протоплазматические белки. Анализ литературного материала в отношении последних весьма затрудняется, во-первых, тем, что различные исследователи работали на неоднородном материале; во-вторых, эти исследования очень часто производи-

лись на единичных объектах и, наконец, в-третьих, при исследовании очень часто ограничивались анализом белка молодых и старых животных, иногда даже без указания точного возраста.

Перед нами встал вопрос о необходимости проведения систематических исследований возрастных изменений в течение всего постэмбрионального периода на достаточно большом количестве объектов, исключая индивидуальные колебания и субъективизм в толковании полученных результатов.

Возраст и групповой аминокислотный состав

Объект и методика. Работа производилась на белках печени белых крыс, кур „белый леггорн“ и лягушек *Rana esculenta*. При выборе тканей мы остановились на печени, учитывая огромное функциональное значение этого органа, а также и потому, что печень является типично-паренхиматозным органом, в котором всякие соединительно-тканые и прочие нечеточные образования встречаются в сравнительно небольшом количестве и при соответствующей обработке от них легко избавиться.

Экспериментальные животные предварительно голодали в течение 24 часов (новорожденные отделялись от матери на 4—6 часов) и убивались отсечением головы. Печень вырезывалась, быстро отжималась фильтровальной бумагой и помещалась в ацетон. В таком виде она, если нужно было, сохранялась в продолжение некоторого времени, пока собиралось достаточное количество материала для анализа.

Белковый препарат приготавливался следующим образом: ткань измельчалась ножницами и кипячением в ацетоне на водяной бане в течение 3 часов обезвоживалась; затем тщательно растиралась в ступке и просеивалась сквозь мелкое сито. Крупные сосуды и соединительная ткань оставались на сите. Полученный порошок в пакетиках из фильтровальной бумаги помещался на 24 часа в смесь спирта и эфира для растворения липидов. После этого остатки липидов удалялись длительной экстракцией эфиром в аппарате Сокслета. После обезжиривания материал переносился в бюкс и высушивался в сушильном шкафу при температуре 105°С до постоянного веса.

Для сравнительных исследований нами был использован метод Van-Slyke в модификации Plimmer'a, требующий для анализа 0,5—1 г сухого белка и дающий достаточно точные результаты. Мы анализировали количество моно- и диаминокислот. Определения отдельных диаминокислот мы не производили, ограничившись в отношении некоторых объектов определением одного аргинина.

Результаты. Первая серия работ была произведена с белком печени белых крыс. Исследовались следующие возрастные группы: новорожденные, 6—8-дневные, 2—3-месячные, 6-месячные, 14—20-месячные.

Полученные нами данные приведены в табл. 1 и 2; общий азот препарата белка мы брали за 100, и остальные виды азота в дальнейшем выражались в процентах к общему азоту (см. табл. 2).

На основании данных табл. 1 и 2 можно констатировать следующее:

1. Общий азот препарата белка до 6-месячного возраста незначительно нарастает, после чего намечается некоторое падение.

Такой характер изменений общего азота с возрастом совпадает с величинами, ранее полученными в нашей лаборатории Р. И. Голубицкой (1938), и характером данных, полученных Н. Б. Медведевой (1939).

Таблица 1

Распределение азота по группам в белке печени белых крыс различного возраста (Азот по группам выражен в г на 100 г обезжиренной и обезвоженной ткани)

Опыт	Возраст животных	Общий азот %	Азот нерастворимых гуминов	Азот аммиака	Азот моноаминокислот	Азот диаминокислот
1	Новорожденные	13,55	0,28	1,01	8,44	3,57
2		13,75	0,33	0,98	8,48	3,70
3		12,42	0,33	0,98	8,16	3,36
4		13,22	0,33	1,01	8,51	3,67
5		13,42	0,35	0,96	8,19	3,28
	В среднем	13,27	0,32	0,99	8,36	3,52
1	6—8 дней	13,34	0,23	0,99	8,79	3,52
2		13,29	0,33	0,95	7,85	3,74
3		13,26	0,41	0,97	8,15	3,66
4		13,38	0,37	1,01	8,19	3,76
5		13,40	0,29	0,94	8,18	3,70
	В среднем	13,33	0,33	0,97	8,23	3,67
1	2—3 месяца	13,57	0,34	1,01	8,81	3,71
2		13,08	0,34	1,23	8,63	3,17
3		13,00	0,37	0,98	8,08	3,27
4		15,02	0,32	0,96	8,95	4,10
	В среднем	13,67	0,34	1,04	8,61	3,56
1	6 месяцев	13,19	0,30	1,08	9,86	3,50
2		15,41	0,31	0,89	9,45	3,59
3		15,58	0,31	1,31	9,84	3,60
4		15,24	0,31	1,08	8,90	4,23
5		15,80	0,46	0,99	9,31	4,40
	В среднем	15,57	0,34	1,07	9,47	3,86
1	14—20 месяцев	14,57	0,32	0,84	9,10	3,62
2		15,42	0,26	0,86	9,99	4,00
3		13,52	0,37	1,01	8,69	3,71
4		13,52	0,37	1,03	8,77	3,51
5		15,87	0,23	0,99	9,96	4,06
6		16,21	0,44	0,94	9,71	4,30
	В среднем	14,85	0,33	0,95	9,37	3,87

Таблица 2

Средние данные табл. 1, выраженные в % к общему азоту препарата белка

Количество опытов на возраст	Возраст	Об- щий азот %	Азот нера- створимых гуминов		Азот аммиака		Азот моно- аминокислот		Азот диами- нокислот		Отношение моноаминокис- лот диаминокислоты
			в г %	в % к об- щему азоту	в г %	в % к об- щему азоту	в г %	в % к об- щему азоту	в г %	в % к об- щему азоту	
5	Новорожден- ные . . .	13,27	0,32	2,41	0,99	7,46	8,36	63,00	3,52	26,52	2,37
5	6—8 дней .	13,33	0,33	2,48	0,97	7,28	8,23	61,74	3,67	27,53	2,24
4	2—3 месяца	13,67	0,34	2,48	1,04	7,61	8,61	62,98	3,56	26,03	2,41
5	6 месяцев .	15,57	0,34	2,18	1,07	6,87	9,47	60,82	3,86	24,79	2,45
6	14—20 месяц	14,85	0,33	2,22	0,95	6,38	9,37	63,09	3,87	26,06	2,42

2. Количество азота нерастворимых гуминов практически не изменяется (от 2,41 до 2,22%).

3. Количество азота аммиака колеблется несколько больше (от 7,61 до 6,38%, т. е. на 1,23%), но эти колебания незначительны и поэтому не имеют существенного значения.

4. Азот моноаминокислот практически не изменяется. Максимальные колебания средних данных по возрастам не превышают колебаний параллельных анализов в пределах одного возраста.

5. Количество азота диаминокислот на различных стадиях онтогенеза также остается постоянным.

6. Отношение азота моноаминокислот к азоту диаминокислот в белках печени крыс всех исследованных возрастов является величиной постоянной (см. табл. 2).

Вторая аналогичная серия исследований была проведена нами на печени кур „белый леггорн“. Исследовался белок печени животных крайних возрастов: 2-дневных цыплят (40 шт.) и 4-летних кур (2 шт.). Кроме того один анализ был проведен на белке печени 19-дневных эмбрионов. Данные этой части работы помещены в табл. 3 и 4.

Таблица 3

Группы азота в белке печени кур „белый леггорн“ различного возраста
(Азот выражен в г на 100 г обезжиренной и обезвоженной ткани)

Опыт	Возраст животных	Общий азот %	Азот нерастворимых гуминов	Азот аммиака	Азот моноаминокислот	Азот диаминокислот	Азот аргинина
1	Эмбрион 18 дней	14,58	0,34	1,03	9,33	4,26	—
1	Цыплята 2-дневные	15,09	0,28	1,10	9,65	4,39	—
2		14,17	0,24	0,93	8,74	4,09	—
3		15,16	0,29	1,12	—	—	—
4		14,32	0,28	1,07	—	—	1,41
5		13,44	0,21	1,13	—	4,16	1,44
	В среднем . .	14,43	0,26	1,07	9,19	4,21	1,43
1	Куры 4-летние	15,62	0,31	0,67	9,83	4,64	—
2		15,77	0,26	1,06	9,82	4,34	—
3		15,77	0,23	1,08	10,00	4,49	—
4		14,97	0,23	1,04	9,98	4,40	1,59
5		15,73	0,29	1,16	9,32	4,40	1,63
	В среднем . .	15,57	0,26	1,08	9,79	4,45	1,61

Таблица 4

Средние данные табл. 3, выраженные в % к общему азоту препарата белка

Количество опытов на возраст	Возраст животных	Общий азот %	Азот нерастворимых гуминов		Азот аммиака		Азот моноаминокислот		Азот диаминокислот		Отношение моноаминокислоты диаминокислоты	Аргинин в % к общему азоту
			в г %	в % к общему азоту	в г %	в % к общему азоту	в г %	в % к общему азоту	в г %	в % к общему азоту		
1	Эмбрион 18 дней	14,58	0,34	2,34	1,03	7,08	9,33	64,01	4,26	29,25	2,18	—
3	Цыплята 2-дневные	14,43	0,26	1,80	0,07	7,41	9,19	63,68	4,21	29,60	2,15	9,99
5	Куры 4-летние . . .	15,57	0,26	1,66	1,08	6,93	9,79	62,87	4,45	28,58	2,19	10,34

Результаты, полученные на печени кур, совершенно аналогичны по своему характеру с данными, полученными на крысах. Также нарастает общий азот и также постоянно количество моно- и диаминокислот у исследованных возрастов. Однако при сравнении данных, полученных на курах, с данными, полученными на крысах, бросаются в глаза следующие отличия: величина азота нерастворимых гуминов у кур меньше, чем у крыс, а количество диаминокислот больше.

Таким образом отношение $\frac{\text{моноаминокислоты}}{\text{диаминокислоты}}$ у кур выражается более низкой величиной, чем у крыс. Это с достаточной наглядностью видно из табл. 7. Указание на более высокое содержание диаминокислот в белках мозга птиц мы встречали у А. Тустановского (1938).

Третья серия работ была проведена на печени лягушек *Rana esculenta* в возрасте примерно 1 года и 4—5 лет. Годичных животных было использовано 160, старых—16. Результаты приведены в табл. 5 и 6. Как видно из таблиц, количество общего азота практически не изменяется. В данных по исследованию белка печени лягушек сохраняется то же постоянство отношения $\frac{\text{моноаминокислоты}}{\text{диаминокислоты}}$ независимо от возраста животных. Количество их и соотношение соответствуют величинам, полученным ранее на белках печени крыс. Количество аргинина также практически не изменяется.

Таблица 5

Группы азота в белке печени лягушек *Rana esculenta* различного возраста
(Азот выражен в г на 100 г обезжиренной и обезвоженной ткани)

Опыт	Возраст животных	Общий азот %	Азот нерастворимых гуминов	Азот аммиака	Азот моноаминокислот	Азот диаминокислот	Азот аргинина
1	Молодые лягушата	15,06	0,36	0,98	9,45	3,90	1,63
2		15,11	0,44	1,10	9,61	3,86	1,60
3		14,90	0,43	1,03	—	3,74	1,53
4		15,07	0,39	1,12	9,80	3,75	1,42
	В среднем . .	15,03	0,41	1,05	9,62	3,81	1,54
1	Старые лягушки	—	0,40	1,00	9,10	3,93	1,69
2		14,92	0,41	1,04	9,31	3,72	1,58
3		14,83	0,40	1,14	9,69	3,60	1,50
	В среднем . .	14,88	0,40	1,06	9,36	3,75	1,59

Таблица 6

Средние данные табл. 5, выраженные в % к общему азоту препарата белка

Количество опытов на возраст	Возраст живот- ных	Об- щий азот %	Азот нера- створимых гуминов		Азот аммиака		Азот мо- ноамино- кислот		Азот диа- мино- кислот		Отношение моноаминокисл, диаминокислоты	Азот аргинина	
			в г %	в % к об- щему азоту	в г %	в % к об- щему азоту	в г %	в % к об- щему азоту	в г %	в % к об- щему азоту			
4	Молодые лягушата Старые лягушки	15,03	0,41	2,06	1,05	6,98	9,62	64,01	3,81	25,34	2,52	1,54	10,27
3		14,88	0,40	2,69	1,06	7,12	9,36	62,90	3,75	25,20	2,49	1,59	10,69

В табл. 7 приведены сводные данные для всех исследованных нами животных. Данные эти свидетельствуют о константности состава белков печени по отношению к различным возрастам.

Таблица 7

Сводные данные по исследованию групп азота на белках печени крыс, кур и лягушек крайних возрастов (в % к общему азоту препарата соответствующего возраста)

Формы азота	Крысы		Куры		Лягушки	
	Молодые	Старые	Молодые	Старые	Молодые	Старые
Общий азот	13,27	14,85	14,43	15,57	15,03	14,88
Азот нерастворимых гу- минов	2,41	2,22	1,80	1,66	2,06	2,69
Азот аммиака	7,46	6,38	7,41	6,93	6,98	7,12
Азот моноаминокислот . .	63,0	63,09	63,68	62,87	64,01	62,90
Азот диаминокислот . . .	26,52	26,06	29,60	28,58	25,34	25,20
Моноаминокислоты						
Диаминокислоты	2,37	2,42	2,18	2,19	2,52	2,49
Аргинин	—	—	9,99	10,49	10,27	10,69

О возрастной „реактивности“ белка

Как уже указывалось, приведенный выше литературный материал и полученные нами результаты не дают возможности сделать заключение об изменчивости аминокислотного состава протоплазматических белков в течение постэмбрионального развития. Наоборот, они склоняют нас к представлению об относительной устойчивости аминокислотного состава. При этом не исключается возможность возрастных изменений аминокислотного состава внутри каждой исследованной группы аминокислот. И так как более лабильной является группа моноаминокислот, то можно предположить, что в ее пределах изменение аминокислот наиболее вероятно. Однако данная задача по чисто методическим соображениям вряд ли осуществима в полной мере, так как существующие методы количественного определения каждой отдельной аминокислоты не могут считаться вполне безупречными. Вот почему мы полагали, что нужно искать иные, более чувствительные методы для обнаружения возрастных отличий не столько в аминокислотном составе, сколько в самой структуре белковой молекулы. Такой высокой чувствительностью в отношении структуры субстрата обладают, как известно, ферменты. Следовательно, вторым путем исследования белка в онтогенезе может быть ферментативный анализ. Вот почему нам представлялось более интересным подвергнуть белки исследованию при помощи ферментов.

Нами были поставлены опыты, в которых белки, выделенные из тканей животных различных возрастов, подвергались воздействию одного и того же стандартного ферментативного препарата. Ясно, что, возрастные изменения структуры тканевого белка должны сказаться на их способности к расщеплению под влиянием того или иного протеолитического фермента. В этом направлении нами проведены исследования:

- 1) действия пепсина на белок печени крыс различного возраста;
- 2) действия трипсина на белок печени крыс различного возраста;
- 3) кинетики трипсинного гидролиза белка печени белых крыс — новорожденных и старых.

Общий ход работы сводился к следующему:

К белку известного возраста прибавлялся свежеприготовленный раствор фермента. Через установленное для каждого фермента время действие его останавливалось прибавлением трихлоруксусной кислоты и затем производилось фильтрование. Нерасщепившийся белок осаждался трихлоруксусной кислотой и, следовательно, находился в осадке, а продукты распада белка переходили в фильтрат. Об интенсивности расщепления белка можно судить по количеству азота в фильтрате. Из величин азота, полученных в опытных пробах, вычитывался азот контрольных проб. Количество азота гидролизованного белка выражалось в процентах к общему азоту препарата белка данного возраста. Полученные результаты (пепсин) приведены в табл. 8 и на рис. 1.

Таблица 8

Расщепление белка печени белых крыс под влиянием пепсина в течение 22 часов при $t = 37^\circ \text{C}$ и $\text{Ph} = 2,0$ (Общий азот фильтрата в % к общему азоту препарата белка)

Опыт	Новорожденные	1 месяц	3 месяца	6 месяцев	20 месяцев	30 месяцев
1	58,21	49,84	39,87	35,95	40,07	32,24
2	56,62	48,84	39,87	38,20	33,16	33,62
3	60,71	40,87	46,35	33,71	40,59	36,85
4	58,21	44,38	44,85	38,20	39,15	30,86
5	60,86	41,35	47,35	40,01	40,59	32,24
6	66,15	—	—	—	38,21	—
7	60,12	—	—	—	—	—
В среднем	60,12	45,05	43,66	37,21	38,62	33,16
Расщепляемость в % .	100	74,9	72,6	61,9	64,2	55,2

Из этих данных с полной отчетливостью следует, что интенсивность расщепления белка молодых и старых животных различна. Если у молодых белок в указанных условиях расщепляется на 60,12%, то белок печени старых животных расщепляется только на 33,16%. Таким образом, если количество расщепленного белка при действии пепсина в молодом возрасте принять за 100, то количество расщепленного белка печени старых животных составляет по отношению к нему только 55,2%, т. е. почти вдвое меньше.

Следующим этапом нашей работы было исследование способности к расщеплению белков различных возрастов под влиянием второго протеолитического фермента—трипсина, действующего при других условиях среды.

Кроме того, в отличие от пепсина, расщепляющего белки только до пептонов, трипсин (активированный) производит более глубокое гидролитическое расщепление со значительным приростом карбоксильных и аминных групп. Вот почему в фильтрате, после отделения нерасщепившегося белка, нами определялся также аминный азот по Van-Slyke. Данные, полученные нами в этой части работы, приведены в табл. 9 и 10.

Таблица 9

Расщепление белка печени белых крыс под влиянием трипсина в течение 3 часов при $t = 37^\circ \text{C}$ и $\text{Ph} = 8,0$ (Аминный азот фильтрата в % к общему азоту данного препарата белка)

Опыт	Новорожденные	2 недели	1 месяц	6 месяцев	30 месяцев
1	29,58	30,16	25,47	21,17	16,38
2	26,27	30,48	23,37	22,73	14,67
3	27,28	27,82	23,42	18,42	18,69
4	30,09	24,72	20,79	20,22	17,17
5	28,80	29,25	21,57	19,58	18,29
6	—	—	—	20,09	17,31
В среднем . . .	28,24	28,28	22,92	20,37	17,18
Расщепляемость в %	100	100	81,1	72,1	60,82

Таблица 10

Расщепление белка печени белых крыс под влиянием трипсина в течение 3 часов при $t = 37^\circ \text{C}$ и $\text{Ph} = 8,0$ (Общий азот фильтрата в % к общему азоту данного препарата белка)

Опыт	Новорожденные	2 недели	1 месяц	6 месяцев	30 месяцев
1	82,03	85,73	69,78	62,91	59,88
2	82,03	76,73	69,77	65,16	62,18
3	79,38	83,61	67,28	66,51	56,12
4	83,08	84,67	77,91	63,81	64,48
5	80,44	82,03	—	63,81	—
В среднем . . .	81,39	82,55	71,18	64,44	60,66
Расщепляемость в %	100	—	87,4	79,2	75,57

Как видно из табл. 9 и рис. 1, количество аминного азота, образовавшегося при трипсинном гидролизе белка новорожденных и 2-недельных животных практически одно и то же. Затем оно резко падает к 1 месяцу и более медленно снижается с дальнейшим увеличением возраста животных. Если количество аминного азота в гидролизате белка новорожденных животных принять за 100, то количество его в гидролизате белка старых животных составляет только 60,82%.

Аналогичным образом изменяется и общий азот гидролизата, т. е. азот всех продуктов расщепления белка (см. табл. 10 и рис. 1). В этом случае белок новорожденных животных расщепляется на 81,39%, 2-недельных — на 82,55%, т. е. практически одинаково; затем наблюдается резкое падение к 1 месяцу (71,18%) и более равномерное падение — к 30 месяцам (60,66%).

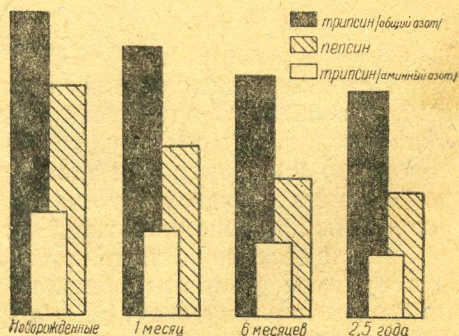


Рис. 1. Расщепление белка печени белых крыс под влиянием ферментов. Заштрихованные столбики — пепсин, черные — трипсин (общий азот), незаштрихованные — аминный азот.

После установления различной интенсивности ферментативного расщепления белка печени молодых и старых животных в течение определенного времени, интересно было проследить кинетику ферментативного действия. Мы воспользовались для этой цели трипсином. В фильтрате определялся аминный азот по Van-Slyke. Полученные нами данные приведены в табл. 11 и на рис. 2. И данные таблицы, и особенно рисунок, с отчетливостью свидетельствуют о резком возрастном различии белка старых и молодых животных.

Таблица 11

Кинетика действия трипсина на белки печени животных крайних возрастов (Аминный азот в % к общему азоту данного препарата белка)

	Белок новорожденных животных				Белок 30-месячных животных			
	30 мин.	1 час 30 мин.	3 часа	6 час.	30 мин.	1 час 30 мин.	3 часа	6 час.
	9,46	24,53	29,58	37,48	4,21	13,23	16,38	23,75
	7,24	17,54	26,27	31,98	3,57	8,88	14,67	23,09
	8,52	15,88	27,28	36,29	4,54	8,14	17,31	21,71
	9,29		28,80	35,98	4,44	8,55	18,69	26,65
			30,09				18,29	
							17,77	
В среднем	8,63	19,32	28,24	35,43	4,19	9,70	17,18	23,80

Приведенный нами экспериментальный материал по ферментативному гидролизу белков животных, стоящих на различных ступенях онтогенетического развития, показывает, что при воздействии одним и тем же препаратом фермента в совершенно идентичных условиях эффект от такого воздействия был резко отличным в зависимости от возраста животного. На основании этого мы вправе заключить, что каждому этапу развития животного соответствует белок определенного, специфического качества.

Обсуждение результатов

Истолкование полученных нами данных—вопрос чрезвычайно сложный и важный. С одной стороны, наши исследования по групповому аминокислотному составу, как и ряд исследований других авторов, говорят о константности тканевого белка. С другой стороны, данные по ферментативному анализу свидетельствуют о ясно выраженных возрастных изменениях тканевого протеина.

Исследования последних лет внесли значительную ясность в вопрос о структуре различных белковых веществ. Работы Svedberg'a (1924) по молекулярному весу, Felix'a (1937), Bergmann'a и Niemann'a (1935—1938) по количественному и качественному аминокислотному составу различных белков, ферментативный анализ белков, произведенный Waldschmidt-Leitz'ем, Scheffner'ом и Grassmann'ом (1926), а затем Calvery (1933) свидетельствуют об определенной стабильности структуры белковой молекулы и, в частности, о ритмическом чередовании аналогичных аминокислотных групп при построении молекулы белка.

Нам не удалось уловить эти изменения в групповом аминокислотном составе, что, по нашему мнению, соответствует современным

представлениям о константности структуры белковых веществ. Чем же объясняется значительное изменение „реактивности“ тканевого белка с возрастом? Очевидно, с возрастом изменяется характер внутримолекулярных связей в белковой молекуле. Мы не считаем нужным подробно разбирать данный вопрос и отсылаем читателей к напечатанной в этом сборнике работе И. Буланкина и М. Блюминой, где данная проблема освещается достаточно подробно.

Исходя из циклольной теории Wrinch (1937), получившей экспериментальное обоснование в работах Талмуда (1938—1939), можно сделать предположение, что в процессе жизнедеятельности или некоторые молекулы в целом, или, скорее, части молекул циклольно построенного белка теряют способность к перегруппировкам. Отдельные циклы их, представляющие псевдодикетопиперазиновые образования, прочно фиксируются. Возможно, что эта фиксация обусловлена взаимным сцеплением боковых цепей, играющих значительную роль в определении свойств белковых веществ.

Таким образом можно предположить, что с возрастом происходит нарастание более стабильных циклических группировок наподобие дикетопиперазинов. И так как соединения дикетопиперазинового типа расщепляются ферментами слабо или вовсе не расщепляются, то будет понятно, почему белок старых тканей оказывает большее сопротивление расщепляющему воздействию ферментов, чем белок тканей молодых. Конечно, это пока только предположение, требующее тщательной проверки.

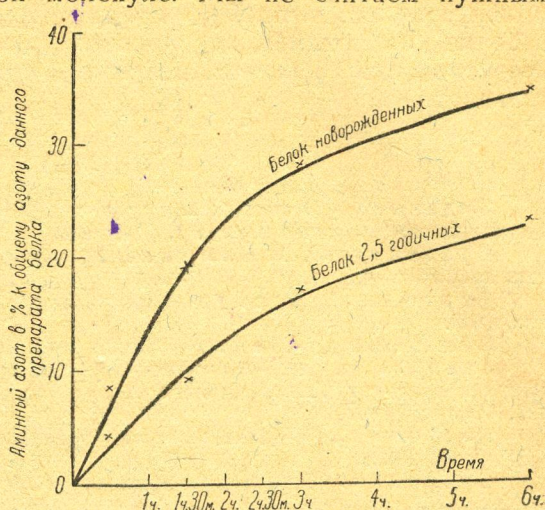


Рис. 2. Кинетика действия трипсина на белок печени белых крыс—новорожденных и в 2,5 года.

Общие выводы

1. Наши исследования, произведенные на белках печени белых крыс, кур и лягушек различных возрастов, с несомненностью свидетельствуют, что количество моно- и диаминокислот и их соотношение являются величинами постоянными для данного вида и не зависят от возраста животных.

2. Анализ цифрового материала, полученного рядом других авторов при изучении аминокислотного состава белков различных тканей, подтверждает наше заключение независимо от того, какие выводы из своих данных пытается делать тот или иной исследователь. Все это, по нашему мнению, соответствует современным представлениям о константности состава белковых веществ. Этим мы, однако, не отрицаем возможности так называемой „малой перестройки белка“.

3. Ферментативный анализ белка печени животных различных возрастов свидетельствует о значительных возрастных изменениях белка, так как способность к расщеплению под влиянием пепсина и трипсина исследованных нами белков с возрастом падает.

4. Указанное выше дает нам основание сделать вывод, что возрастные изменения белка обусловлены не столько аминокислотным составом, сколько изменением в характере внутримолекулярных связей.

5. На основании современных взглядов на структуру белковой молекулы нами высказано предположение о возрастном накоплении в белке необратимых группировок циклического типа, понижающих „реактивность“ белковых веществ в организме в процессе жизнедеятельности.

ЛИТЕРАТУРА

- Буданова — О содержании аргинина в белках мозга позвоночных животных. Бюлл. exper. биологии и мед., 1, 114, 1936.
- Буланкин, И. и Блюмина, М. — Возрастные изменения тканевых белков (см. данный сборник).
- Берто и Грассман — Практическое руководство по биохимии. Медгиз, 1938.
- Вальдшмидт-Лейтц — Химия белковых веществ. Химико-техн. изд., 1934.
- Галвяло и др. — Химическая характеристика белков мышечной ткани. Сборник докладов VI всесоюзного съезда физиологов, биохимиков и фармакологов, 421, Тбилиси, 1937.
- Голубицкая — Білковий склад органів і вік. Праці Зоолого-біол. інституту ХДУ, 5, 81, 1938.
- Грассман — Структурно-химические исследования белков. Успехи химии, 6, 1295, 1937.
- Гуревич — Тирозин и триптофан в белках мышц у птиц „белый леггорн“ в зависимости от возраста и пола. Физиол. журн., 27, 615, 1939.
- Добрынина — К вопросу о возрастных изменениях аминокислотного состава мозга человека. Физиол. журн., 29, 220, 1940.
- Капланский — Физиол. журн., 21, 1056, 1936.
- Карягина — О содержании аланина в белках мозга позвоночных животных. Бюлл. эксп. биол. и мед., 1, 116, 1936.
- Кизель, А. — О специфичности и изменчивости строения белков в организме. Успехи совр. биологии, 8, 151, 1938.
- Кизель, А. с участием Агатова, Безингер и Каструбина — О вариациях в аминокислотном составе белков растительного организма и об их причинах. Биохимия, 1, 201, 1936.
- Медведева — О возрастных изменениях белкового состава тканей и об омолаживающем влиянии гемолитической сыворотки. Медичн. журн. Академії наук УРСР, 7, 793, 1937.
- Нагорный, А. В. — Проблема старения и долголетия. Изд. Харьк. гос. университета, 1940.
- Новосельская — Аминокислотный состав белков некоторых органов человека в норме и при раке. Медгиз, 1940.
- Ринч, Д. — Структура протенинов и некоторых физиологических активных веществ. Успехи химии, 6, 284, 1937.
- Сведберг — Ультрацентрифуга и область ее применения. Успехи химии, 4, 711, 1935.
- Сведберг — Белковые молекулы. Успехи химии, 6, 715, 1937.
- Талмуд — Строение белковой молекулы. Журн. общей химии, 9, 1243, 1939.
- Тустановский — Об изменчивости аминокислотного состава мозга. Биохимия, 3, 218, 1938.
- Феликс — Протамины и их биологическое значение. Успехи биол. химии, 13, 138, 1937.
- Abderhalden u. Fuchs — Der Gehalt verschiedener Keratinarten an Glutaminsäure. Ztschr. physiol. Chem., 57, 339, 1908.
- ✓ Bergmann a. Niemann — On the structure of protein cattle hemoglobin, egg albumin, cattle fibrin and gelatin. J. Biol. Chem., 118, 301, 1937.
- ✓ Bergmann a. Niemann — On blood fibrin. A contribution to the problem of protein structure. J. Biol. Chem., 115, 77, 1936.
- ✓ Bergmann a. Niemann — On the structure of silk fibroin. J. Biol. Chem., 122, 577, 1938.
- Block, R. — The basic amino acids from neurokeratin: is neurokeratin a true keratin? J. Biol. Chem., 94, 647, 1932.
- Block, R. — The basic amino acids of serum proteins. J. Biol. Chem., 103, 261, 1933.

Block, R.—Chemical studies on the neuroproteins: The amino acid composition of various mammalian brain proteins. *J. Biol. Chem.*, 119, 765, 1937.

Buglia u. Costantino—Beitr. zur Chemie des Embryo. *Ztschr. physiol. Chem.*, 81, 143, 1912.

Calvery—*J. Biol. Chem.*, 102, 73, 1933. Цитировано по Grassmann'y.

Deseö, Lamoth u. Fodor—Ueber den Tyrosin und Tryptophangehalt des Globulins und Albumins beim neugeborenen Kalbe und beim Muttertier. *Biochem. Ztschr.*, 271, 381, 1934.

Ehrenberg—Chemische Altersuntersuchungen. *Biochem Ztschr.* 164, 175, 1925,

Okuda a. Katai—*J. Biochem. Japan.*, 24, 207, 1936.

Plimmer—*The Biochem. J.*, 19, 1016. 1925.

✓ Schenck—Untersuchungen über das Globin bei Tieren, gesunden und kranken Menschen. *Archiv f. exp. Pathol. u. Pharm.*, 150, 160, 1930.

Tadokoro a. Ugami—On cystin and cystein contents of human hair. *J. Biochem.*, 12, 187, 1930. Цитировано по Кизелю.

Waldschmidt-Leitz, Schaeffner u. Grassmann—*Ztschr. physiol. Chem.*, 156, 68, 1926. Цитировано по Вальдшмидт-Лейтцу.

Wilson a. Lewis—The cystin content of hair and other epidermal tissues. *J. Biol. Chem.*, 73, 543, 1927.

ABOUT SOME AGE CHANGES OF TISSUE PROTEIN

Sector of General Physiology of the Zoo-Biological Institute of the Kharkov State University (Chief—Prof. A. V. Nagorny)

Z. G. BRONOVITZKAYA

1. Our investigations carried out on liver proteins of albino rats, hens and frogs of various age undoubtedly testify that the amount of mono- and diaminoacids and their correlation are constant values for the given species and does not depend on the age of the animals (tables 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7).

2. The analysis of the figures obtained by a series of other authors at studying the aminoacid composition of proteins of various tissues confirms principally our conclusion, regardless what conclusions the one or the other author is attempting to draw from his data. All this corresponds, in our opinion, with the contemporary notion of the constancy of composition of proteic substances. However, by this we do not deny the possibility of the so called „small reconstruction of the protein“.

3. The fermentative analysis of liver protein testifies as to the considerable age changes, as the capacity to split under the influence of pepsine and trypsine of the investigated by us protein diminishes regularly with age (tables 8, 9, 10 and 11, and fig. 1, 2).

4. This gives us reason to make the conclusion that age changes of the protein are conditioned not so much by the aminoacid composition, as by the change in the character of the intramolecular connections.

5. On the basis of contemporary viewpoints on the proteic structure of the molecule we advance the opinion about age accumulation in the protein of irreversible groupings of the cyclic type, which decrease the „reactivity“ of the proteic substances in the organism in the process of vital activity.

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ТКАНЕВЫХ БЕЛКОВ

И. Н. БУЛАНКИН и М. А. БЛЮМИНА

Сектор общей физиологии (зав.—проф. А. В. Нагорный) Зоолого-биологического института и кафедра биохимии (зав.—проф. И. Н. Буланкин) Харьковского государственного университета

Живой организм в процессе своей индивидуальной эволюции подвергается закономерным и направленным изменениям, приводящим его к естественному концу—смерти. Это изменения химические и физико-химические, морфологические и функциональные. Естественно предположить, что в системе этих изменений огромную роль должны играть изменения в химической природе белковых веществ, исторически обусловивших возникновение жизни. Вот почему изучение возрастных изменений тканевых белков представляет особый интерес с точки зрения проблемы возрастной физиологии и биохимии, разрабатываемой в последнее десятилетие в нашей лаборатории.

Химические изменения могут проявляться или в возрастном изменении аминокислотного состава и, в частности, в изменении соотношений между моно- и диаминокислотами, или в изменении характера внутримолекулярных связей, или, наконец, в изменении того и другого. Исследования нашей лаборатории (З. Г. Броновицкая—1941) по групповому аминокислотному составу белка печени не обнаружили каких-либо возрастных изменений. Данные этих исследований на белках печени белых крыс, кур и лягушек с несомненностью свидетельствуют, что количество моно- и диаминокислот и их соотношения являются величинами постоянными и не зависят от возраста животных. Детальный анализ цифрового материала других авторов, произведенный Броновицкой, подтверждает заключение о константности аминокислотного состава тканевых белков независимо от того, какие выводы пытается делать по этому поводу тот или иной автор. Подобное заключение на первый взгляд кажется весьма неожиданным, ибо до последнего времени те или иные свойства белка увязывались исключительно с составом аминокислот, входящих в белковую молекулу. Однако исследования последних лет внесли значительную ясность в вопрос о характере различных белковых веществ. Исследования Svedberg'a (1926), посвященные определению молекулярного веса, и исследования Bergmann'a (1936—1938), посвященные определению числа входящих в состав белковой молекулы аминокислотных остатков, говорят в пользу единого плана строения различных белков и свидетельствуют о некоторой стабильности белкового состава того или

инного белкового тела. Работами Felix'a (1937) над структурой протаминов и работами Bergmann'a над структурой ряда других белков было показано, что в белковой молекуле имеют место простые количественные соотношения между различными аминокислотами и что в основе структуры белков лежат периодически повторяющиеся апа-логично или одинаково построенные трипептиды. Отсюда мало вероятно, чтобы в процессе возрастной эволюции могли происходить сколько-нибудь значительные изменения в составе тканевых белков именно в этом направлении. Как уже указывалось, нашей лаборатории этого установить не удалось, как не удалось этого сделать и большинству других исследователей. Полагая, что возрастные изменения белка обусловлены не столько аминокислотным составом, сколько изменением характера внутримолекулярных связей, мы и направили наши искания по этому пути. Для разрешения этого вопроса мы обратились к ферментологическому методу исследования, ибо ферментативный анализ является самым тонким анализом химической структуры белков.

Объект и методика

В качестве объекта исследования нами были избраны печень, сердце и головной мозг белых крыс различного возраста. Эти важнейшие органы, как известно, выполняют различные функции и характеризуются специфической для каждого из них структурой. Кроме того в качестве неклоточных образований нами были взяты коллагеновые волокна из крысиных хвостов.

Известно, что в организме, кроме типично протоплазматических белков, характеризующихся своей химической и физико-химической лабильностью, имеются белки метаплазматического типа. Это так называемые протеиноиды, входящие главным образом в состав различных опорных образований организма. Белки последнего типа характеризуются значительной стабильностью и возникают как продукт жизнедеятельности клеток в результате деградации протоплазматических белков. Коллагеновые волокна и являются типичным представителем этих метаплазматических образований.

Известно, что белки метаплазматического типа в отличие от протоплазматических белков не обладают видовой специфичностью. В связи с этим мы имели основание предполагать, что коллаген, как их типичный представитель, не обнаружит и возрастных изменений химической структуры. Это положение нами уже было подкреплено при анализе желатины, получаемой из коллагена животных различного возраста (Буланкин и Каплан—1939). Сейчас, при анализе возрастных изменений белкового состава различных тканей организма, представляло особый интерес проверить это наше утверждение.

Первым подготовительным этапом нашей работы была заготовка достаточного материала для исследования. Для этой цели органы постепенно собирались и фиксировались спиртом, в котором и сохранялись в закрытых сосудах отдельно для каждого возраста. Обработка материала и заготовка белка производились следующим образом. Сердечная мышца и печень, извлеченные из спирта, измельчались на микромясорубке, изготовленной для этой цели в мастерской нашей лаборатории. Измельченный материал заворачивался в пакетики фильтровальной бумаги и кипятился в течение 3 часов в ацетоне для дальнейшего обезвоживания и удаления некоторых жироподобных веществ. Мозг кипятился в ацетоне в течение 9 часов, причем ацетон менялся трижды через каждые 3 часа. Обработанная таким об-

разом мозговая ткань растиралась в ступке и каша завертывалась в пакетики фильтровальной бумаги. Затем производилось обезжиривание. Обезжиренное вещество после подсушивания на воздухе растиралось в ступочке, переносилось в бюксы и затем сушилось в сушильном шкафу при 105°C до постоянного веса. Коллагеновые волокна после обезжиривания измельчались очень мелко ножницами и подсушивались до постоянного веса.

Для разрешения поставленных нами задач препараты белка различного возраста подвергались воздействию одних и тех же стандартных ферментативных препаратов—пепсина и трипсина.

Во всех опытах брались навески белка в 100 мг и помещались в эрленмейеровские колбочки объемом в 25 см^3 . К взятой навеске добавлялись 3 см^3 5% раствора солянокислого пепсина ($\text{Ph}=1,6$). Содержимое колбочки осторожно перемешивалось и затем к нему добавлялось еще 7 см^3 раствора соляной кислоты того же Ph . Колбочки закрывались пробкой и помещались сериями в термостаты на 6 часов. Отрезок в 6 часов и для пепсина и для трипсина выбран нами после тщательной экспериментальной проверки, произведенной при изучении кинетики ферментативного действия при различных температурах. Именно в масштабе этого отрезка времени получались наиболее отчетливые результаты. Исследования производились параллельно при трех температурах: 32° , 37° и 42°C . Каждые 30 мин. колбочки осторожно встряхивались для более равномерного действия фермента. После 6-часового пребывания в термостате во все колбочки добавлялось по 3 см^3 12% раствора трихлоруксусной кислоты, благодаря чему прерывалось воздействие фермента и производилось осаждение нерасщепленного белка. Через 10 мин. производилось фильтрование в мерные колбочки на 50 см^3 , затем трехкратное промывание колбочек и фильтров 5 см^3 6% раствора трихлоруксусной кислоты. Путем разведения дистиллированной водой фильтрат доводился до объема 50 см^3 . В фильтрате определялся общий азот по микрокельдалю. При расчетах делались поправки на азот контрольных проб. Об интенсивности ферментативного расщепления белка судили по количеству азота в фильтрате.

Аналогичным же образом производилась и работа с воздействием на белки трипсина. Исследования производились при $\text{Ph}=7,7$, для чего употреблялся фосфатный буфер. Для каждой серии опытов готовился свежий 1% раствор трипсина на указанном буфере. К навескам белка сначала прибавлялось по 7 см^3 буферной смеси и через 30 мин. добавлялось по 3 см^3 раствора трипсина. Колбы загружались в термостаты. После 6-часового стояния они обрабатывались указанным выше способом трихлоруксусной кислотой, затем производилось фильтрование и в фильтрате определялся как общий азот по микрокельдалю, так и аминный азот по Van-Slyke (микрометод). Делалась поправка на контроль. Расчеты производились на 1 г сухого препарата белка.

Известно, что коллагеновые волокна непосредственно трипсином не расщепляются. После проверки этого положения нам, в связи с этим, пришлось видоизменить опыт. Для этой цели колбочки с навесками коллагена предварительно подвергались воздействию пепсина в течение 12 часов при 37°C , после чего действие пепсина прерывалось подщелочением среды до $\text{Ph}=7,7$. Затем добавлялся трипсин и колбочки загружались в термостаты на 6 час., после чего уже производились все вышеуказанные операции для определения как азота продуктов распада, так и аминного азота.

Результаты исследований

Уже исследования З. Броницкой над возрастными изменениями белка печени показали, что чем старше взятый для изучения белок, тем хуже он расщепляется пепсином и трипсином. Это указывает, по нашему мнению, на возрастные изменения характера внутримолекулярных связей белка. Наши данные целиком подтверждают это заключение. Молекулы тканевых белков печени, сердца и мозга с возрастом становятся устойчивее по отношению к протеолитическому воздействию ферментов. Коллагеновые волокна возрастных изменений не обнаруживают и расщепляются ферментами с одинаковой скоростью независимо от возраста. Поскольку ферментативное действие характеризуется своей специфичностью и поскольку специфичность ферментов выражается в высокой чувствительности уже к незначительным изменениям в химической и даже пространственной структуре субстрата, постольку мы имеем основание заключить о качественных возрастных изменениях структуры тканевых белков. Представляло интерес найти количественное выражение этим качественным изменениям. Для этой цели мы использовали температурную постоянную Аррениуса—величину, выражающую энергию активации в грамм-калориях. В последнее время этот метод анализа широко используется А. В. Благовещенским и его сотрудниками. Известно, что при реакциях, идущих с измеримой скоростью, реагируют не все сталкивающиеся между собой молекулы реагирующих веществ, а только весьма небольшая их часть. По мнению Аррениуса, в реакцию вступают только активные молекулы, обладающие некоторым повышенным запасом энергии, и число их в каждый данный момент весьма невелико по отношению к общему числу молекул системы.

Факторы, повышающие число активных молекул, увеличивают скорость реакции. К таким факторам относится повышение температуры, участие катализатора и т. д. Влияние температуры на величину скорости химической реакции выражается по Аррениусу температурной постоянной (E_A). Температурная постоянная химических превращений есть не что иное, как величина энергии активации частиц, подвергающихся химическому превращению. Энергия активации (μ)—это избыточная энергия движения молекул, необходимая для перевода их в активное состояние. Мы не намерены здесь входить в обсуждение вопроса о тождественности температурной постоянной и энергии активации ферментативного процесса, так как в данном конкретном случае это не имеет практического значения. Метод определения энергии активации для ферментативных процессов сводится к практическому определению скоростей реакций при двух различных температурах. Скорости реакций обычно выражаются константами скорости, вычисленными на основании изучения кинетики реакций при обеих температурах. Полученные для абсолютных температур T_1 и T_2 константы скорости K_1 и K_2 вставляются в уравнение Аррениуса. Тогда энергия активации

$$\mu = (\ln K_2 - \ln K_1) R \frac{T_1 T_2}{T_2 - T_1},$$

где R —газовая константа = 1,9864 грамм-калории. Если T_1 и T_2 отличаются на 10°C , то $(\ln K_2 - \ln K_1) = \ln Q_{10}$, то-есть логарифму температурного коэффициента вант-Гоффа. При этих условиях, переводя натуральные логарифмы в десятичные, энергию активации можно выразить уравнением

$$\mu = 0,457 \lg Q_{10} T_1 T_2.$$

Следовательно, для удобства расчетов выгодно брать температурный интервал в 10°C , определяя температурный коэффициент Q_{10} . Однако, при определении температурного коэффициента, представляющего отношение скорости при разных температурах, выбранный вант-Гоффов интервал в 10°C бывает часто очень широк, особенно при изучении биохимических процессов. Так, например, повышение температуры от 32 до 37° и от 37 до 42° может оказать неодинаковое влияние на скорость изучаемого процесса. Эта разница во влиянии может ускользнуть от наблюдателя при определении Q_{10} в интервале $32-42^\circ\text{C}$ вследствие нивелирования. Нетрудно видеть, однако, что практически для определения Q_{10} нет необходимости брать температурный интервал в 10°C . Его можно вычислить для любой пары температур по формуле

$$\lg Q_{10} = 10 \frac{\lg v_2 - \lg v_1}{t_2 - t_1},$$

где $t_2 - t_1$ — произвольно взятый температурный интервал, а v_2 и v_1 — скорости процесса.

Для определения энергии активации при ферментативном расщеплении белков мы и обратились сначала к определению Q_{10} . Для этой цели исследования велись при температурах в 32° , 37° и 42°C . Термостаты были отрегулированы с точностью до $0,1^\circ\text{C}$. Так как из-за недостатка материала мы не имели возможности изучать кинетику ферментативного расщепления, то вместо констант скорости K_1 и K_2 нам пришлось использовать непосредственно определяемую величину скоростей v_1 и v_2 , которые выражались количеством азота продуктов белкового распада под влиянием 6-часового действия ферментов. Табл. 1, 2 и 3 иллюстрируют величины Q_{10} в различных интервалах температур.

Таблица 1 (сводная)¹

Возрастные изменения расщепляемости тканевого белка и коллагеновых волокон под влиянием пепсина ($\text{Ph}=1,6$), выраженные количеством N (мг) продуктов распада

Возраст	t°	N (мг) продуктов распада на 1 г белка	Q_{10} в интервале $32-37^\circ\text{C}$	t°	N (мг) продуктов распада на 1 г белка	Q_{10} в интервале $37-42^\circ\text{C}$	t°	N (мг) продуктов распада на 1 г белка	Q_{10} в интервале $32-42^\circ\text{C}$
Печень									
15 дней—1 мес.	32°	91	1,13	37°	97	1,15	42°	104	1,14
3 мес.		76	1,22		84	1,17		91	1,20
6 "		63	1,24		70	1,21		77	1,22
2 года		48	1,31		55	1,61		70	1,45
Сердце									
1—15 дней	32°	99	1,14	37°	106	1,13	42°	113	1,14
1 мес.		91	1,16		98	1,14		105	1,15
3 "		78	1,36		91	1,16		98	1,24
6 "		70	1,40		83	1,20		90	1,28
2 года		56	1,56		70	1,21		77	1,37

¹ Каждая цифра в табл. 1, 2 и 3 является средней из 3 параллельных определений для каждого возраста.

Таблица 1 (продолжение)

Возраст	t°	N (мг) продуктов распада на 1 г белка	Q ₁₀ в интервале 32—37° С	t°	N (мг) продуктов распада на 1 г белка	Q ₁₀ в интервале 37—42° С	t°	N (мг) продуктов распада на 1 г белка	Q ₁₀ в интервале 32—42° С
Мозг									
1—15 дней	32°	91	1,16	37°	98	1,19	42°	107	1,17
1 мес.		84	1,17		91	1,25		101	1,21
3 "		77	1,19		84	1,30		96	1,24
6 "		65	1,39		77	1,30		88	1,34
2 года		54	1,45		65	1,40		77	1,42
Коллагеновые волокна									
15 дней	32°	105	1,28	37°	119	1,24	42°	133	1,26
1 мес.		105	1,28		119	1,24		133	1,26
6 "		105	1,28		120	1,24		133	1,26
1 год		106	1,28		119	1,24		134	1,26
2 года		105	1,28		119	1,24		133	1,26

Таблица 2 (сводная)

Возрастные изменения расщепляемости тканевого белка и коллагеновых волокон под влиянием трипсина (Ph = 7,7), выраженные количеством N (мг) продуктов распада

Возраст	t°	N (мг) продуктов распада на 1 г белка	Q ₁₀ в интервале 32—37° С	t°	N (мг) продуктов распада на 1 г белка	Q ₁₀ в интервале 37—42° С	t°	N (мг) продуктов распада на 1 г белка	Q ₁₀ в интервале 32—42° С
Печень									
15 дней—1 мес.	32°	99	1,14	37°	106	1,13	42°	113	1,14
3 мес.		86	1,16		93	1,15		100	1,16
6 "		77	1,19		84	1,17		91	1,18
2 года		70	1,21		77	1,19		84	1,20
Сердце									
1—15 дней	32°	98	1,14	37°	105	1,13	42°	112	1,14
1 мес.		91	1,16		98	1,14		105	1,15
3 "		84	1,17		91	1,16		98	1,16
6 "		74	1,31		84	1,17		91	1,23
2 года		56	1,56		70	1,18		76	1,35
Мозг									
1—15 дней	32°	98	1,14	37°	105	1,13	42°	112	1,14
1 мес.		91	1,16		98	1,14		105	1,15
3 "		84	1,17		91	1,16		98	1,16
6 "		77	1,19		84	1,17		91	1,18
2 года		63	1,24		70	1,21		77	1,22
Коллагенные волокна									
15 дней	32°	119	1,24	37°	133	1,22	42°	147	1,23
1 мес.		119	1,24		133	1,22		147	1,23
6 "		119	1,24		133	1,22		147	1,23
1 год		119	1,24		133	1,22		147	1,23
2 года		119	1,24		133	1,22		147	1,23

Таблица 3 (сводная)

Возрастные изменения расщепляемости тканевого белка и коллагеновых волокон под влиянием трипсина ($\text{Ph} = 7,7$), выраженные количеством аминного N по Van-Slyke

Возраст	t°	Аминный N (мг)	Q_{10} в интервале 32—37° C	t°	Аминный N (мг)	Q_{10} в интервале 37—42° C	t°	Аминный N (мг)	Q_{10} в интервале 32—42° C
Печень									
15 дней—1 мес.	32°	73,62	1,19	37°	80,57	1,16	42°	87,06	1,18
3 мес.		68,02	1,21		74,95	1,25		83,92	1,23
6 "		60,59	1,31		69,54	1,26		78,05	1,28
2 года		47,75	1,34		55,17	1,57		69,20	1,45
Сердце									
1—15 дней	32°	69,78	1,19	37°	76,29	1,16	42°	82,26	1,17
1 мес.		63,42	1,24		70,44	1,17		76,47	1,20
3 "		58,65	1,26		65,89	1,22		73,01	1,24
6 "		49,31	1,30		56,40	1,25		63,26	1,28
2 года		41,83	1,31		47,94	1,35		55,75	1,33
Мозг									
1—15 дней	32°	68,60	1,18	37°	74,76	1,26	42°	83,95	1,22
1 мес.		62,79	1,19		66,70	1,27		77,53	1,23
3 "		57,16	1,27		64,51	1,28		72,74	1,25
6 "		51,55	1,28		58,40	1,31		65,33	1,26
2 года		42,96	1,30		49,11	1,33		56,69	1,31
Коллагеновые волокна									
15 дней	32°	84,15	1,28	37°	95,37	1,25	42°	106,59	1,26
1 мес.		84,15	1,28		95,37	1,25		106,59	1,26
6 "		84,15	1,28		95,37	1,25		106,59	1,26
1 год		84,15	1,28		95,37	1,25		106,59	1,26
2 года		84,15	1,28		95,37	1,25		106,59	1,26

Уже анализ данных по Q_{10} позволяет сделать вывод о значительных сдвигах в возрастном разрезе. В частности Q_{10} печени, сердца и мозга с возрастом, как это видно из таблиц, совершенно отчетливо растет. Возрастных изменений при протеолизе коллагеновых волокон в этом случае не наблюдается.

Так как расхождений между практически определенными величинами Q_{10} в интервале 32—42° C и Q_{10} , вычисленными для более узких интервалов внутри этих границ, как это видно из материалов, по существу не обнаружено, мы использовали Q_{10} в этом более широком интервале для подсчетов энергии активации (μ) с тем, чтобы выразить возрастные изменения тканевых белков в определенных энергетических единицах (грамм-калории). Как уже указывалось, это и будет количественным отражением качественных, структурных изменений. Это положение иллюстрируется табл. 4.

Анализ материала табл. 1, 2, 3 и 4 приводит нас к следующим выводам:

1. У протоплазматических белков с возрастом температурный коэффициент вант-Гоффа и энергия активации непрерывно растут. Это последнее обстоятельство говорит о том, что чем старше организм,

тем больше необходимо энергии извне для расщепления его тканевых белков.

2. Температурный коэффициент и энергия активации коллагеновых волокон остаются неизменными и от возраста не зависят.

3. Поскольку, начиная приблизительно с 6-месячного возраста и выше, величина энергии активации тканевых белков значительно превышает таковую коллагеновых волокон, постольку нельзя, вероятно, свести возрастные изменения тканевых белков только к замещению их белками метаплазмы.

4. Коллагеновые образования, относящиеся к белкам метаплазматического типа, химических возрастных изменений не претерпевают, в то время как протоплазматические белки обнаруживают ясно выраженные возрастные изменения своей структуры.

Таблица 4 (сводная)
Температурный коэффициент (Q_{10}) и энергия активации (μ) тканевых белков различного возраста

Объект и возраст	Пепсин		Т р и п с и н			
			Расчеты на общий N		Расчеты на аминный N	
	Q_{10} (32—42° C)	μ	Q_{10} (32—42° C)	μ	Q_{10} (32—42° C)	μ
Печень						
15 дней—1 мес.	1,14	2498	1,14	2498	1,18	3155
3 мес.	1,20	3476	1,16	2837	1,23	3947
6 "	1,22	3791	1,18	3155	1,28	4707
2 года	1,45	7085	1,20	3476	1,45	7085
Сердце						
1—15 дней	1,14	2498	1,14	2498	1,17	2993
1 мес.	1,15	2665	1,15	2665	1,20	3476
3 "	1,24	4101	1,16	2837	1,24	4101
6 "	1,28	4707	1,23	3947	1,28	4707
2 года	1,37	6002	1,35	5722	1,33	5437
Мозг						
1—15 дней	1,17	2293	1,14	2498	1,22	3791
1 мес.	1,21	3635	1,15	2665	1,23	3947
3 "	1,24	4101	1,16	2837	1,25	4254
6 "	1,34	5580	1,18	3155	1,26	4406
2 года	1,42	6686	1,22	3791	1,31	5148
Коллагеновые волокна						
15 дней	1,26	4406	1,23	3947	1,26	4406
1 мес.	1,26	4406	1,23	3947	1,26	4406
6 "	1,26	4406	1,23	3947	1,26	4406
1 год	1,26	4406	1,23	3947	1,26	4406
2 года	1,26	4406	1,23	3947	1,26	4406

Обсуждение результатов

Исследования нашей лаборатории (З. Брновицкая), как и ряд других исследований, говорят о константности аминокислотного состава тканевого белка. С другой стороны, наши данные по ферментативному анализу свидетельствуют о ясно выраженных возрастных изменениях белков печени, сердца и мозга. Это дает основание для

заклучения, что возрастные изменения белков обусловлены не столько аминокислотным составом, сколько изменением в характере внутри-молекулярных связей. В самом деле, одни и те же протеолитические ферменты расщепляют с большей интенсивностью белки молодых тканей, чем старые белки, при чем на расщепление белков старых тканей требуется большее количество энергии извне, чем на белки тканей молодых. Какие конкретные перегруппировки происходят в белковой молекуле с возрастом, мы, к сожалению, еще не знаем и поэтому ограничимся более или менее вероятным предположением, сводящимся к следующему. Исходя из современного представления о циклольной структуре белков, можно предположить, что с возрастом некоторые молекулы в целом или, скорее, отдельные части циклольно построенных молекул теряют способность к обратимым перегруппировкам, а отдельные циклы их, представляющие псевдодикетопиперазиновые образования, прочно фиксируются. Возможно, что фиксация эта обусловлена взаимным сцеплением боковых цепей, играющих значительную роль в определении свойств белковых веществ. Последнее утверждение получает подкрепление в исследованиях Astbury, указавшего, что стойкое сохранение сверхвытянутой и сверхсокращенной формы кератина волос обязано, повидимому, фиксирующему действию боковых цепей, связывающих цепи главных валентностей друг с другом каждый раз в новом положении.

Известно, что образования дикетопиперазинового типа ферментами не расщепляются или расщепляются весьма слабо. Нарастание необратимых группировок псевдодикетопиперазинового типа с возрастом может создавать, по нашему мнению, условия, понижающие способность тканевых белков к расщеплению, и тем самым понижать реактивность тканевого белка.

Высказывая соображения о возрастном накоплении в белке необратимых группировок циклического типа, понижающих лабильность белковых веществ, мы отнюдь не разделяем выдвинутой в свое время

Pictet (1915) и развитой в дальнейшем Ruzicka, а затем А. В. Благовещенским теории циклизации. Не отрицая возможности возрастной циклизации, мы полагаем, однако, вместе с А. В. Нагорным (1940), что выдвигание этой циклизации как теории индивидуальной эволюции совершенно не приемлемо.

Теория циклизации исходит из механистически-упрощенного взгляда на организм как на замкнутую систему, в которой все процессы протекают в направлении, определяемом вторым принципом энергетики. Поскольку циклические соединения заключают в себе менее свободной энергии, чем соединения ациклические, переход последних в первые в замкнутых системах является спонтанным процессом. Однако живой организм является системой незамкнутой и характеризуется непрерывным процессом обмена веществ и энергии. Отсюда очевидно, что процессы циклизации в организме не могут быть первичными. Они являются только отражением особенностей метаболизма и подчиняются ему. Да и вообще не всякая циклизация связана с понижением физиологической активности. Достаточно указать в этом отношении на гормоны.

По всем данным, нативные, протоплазматические белки имеют циклольную структуру (Wrinch—1937). Белки мицеллярные, как правило, образуют внутри- и внеклеточные опорные структуры и являются деградированными белками, большей частью входящими в состав метаплазмы. Таким образом именно нативные белки имеют циклическую

структуру, в то время как большинство метаплазматических белков имеет вытянутые упорядоченные полипептидные цепи. С точки зрения термодинамической эти вытянутые цепи обладают большим энергетическим потенциалом, чем цепи циклольно свернутые, но их линейное расположение в мицеллах фиксировано, в то время как циклольные решетки нативных белков обеспечивают способность к перегруппировке и обладают, как это показал Талмуд (1938—1939), определенными каталитическими способностями. Следовательно, в организме не всякая циклизация связана с понижением энергетического потенциала живой системы. Скорее, уничтожение циклольной структуры белков может приводить в конечном счете к понижению физиологической активности протоплазмы. Доказано, что с возрастом в организме наблюдается относительное и абсолютное накопление метаплазматических образований. С этой точки зрения неверно и

утверждение Ruzicka о возрастной циклизации, которую он связывает с нарастанием метаплазмы. С точки зрения нарастания метаплазматических белков упорядочение, дециклизация—процесс более характерный для организма, чем его циклизация.

Итак, отрицая циклизацию как теорию биохимической эволюции, мы полагаем, что изменения в структуре тканевых белков обусловлены не столько возрастной циклизацией, сколько нарастающей фиксацией уже имеющихся циклических структур белковой молекулы, потерей ее лабильности. Ясно, что это пока гипотеза, требующая экспериментальной проверки.

Выводы

Результаты наших исследований коротко можно подытожить следующими положениями:

1. Способность к расщеплению под влиянием протеолитических ферментов у тканевых белков (печень, сердце, мозг) с возрастом падает, а температурный коэффициент (Q_{10}) и энергия активации (μ) непрерывно нарастают.

2. Способность к расщеплению, температурный коэффициент и энергия активации коллагеновых волокон остаются неизменными и от возраста не зависят.

3. Отсюда следует, что протоплазматические белки обнаруживают ясно выраженные возрастные изменения своей химической структуры, в то время как коллагеновые образования, относящиеся к белкам метаплазматического типа, химических возрастных изменений не претерпевают. Свести эти химические возрастные изменения тканевых белков только к нарастанию метаплазматических образований невозможно.

4. Анализ данных многих авторов и данные нашей лаборатории свидетельствуют о константности аминокислотного состава тканевого белка. Это дает нам основание сделать вывод, что возрастные изменения белка обусловлены не столько аминокислотным составом, сколько изменением в характере внутримолекулярных связей.

5. На основании современных взглядов на структуру белковой молекулы нами высказана гипотеза о возрастной стабилизации имеющихся в белковой молекуле циклических структур, благодаря чему понижается „реактивность“ белковых веществ в организме в процессе жизнедеятельности.

ЛИТЕРАТУРА

- Аррениус, С.—Количественные законы в биологической химии. ГИЗ, 1925.
- Благовещенский, А. В.—К вопросу о направленности процесса эволюции. Бюл. Средне-Азиатск. университета, 10, 1925.
- Благовещенский, А. В.—О различиях ферментов одного наименования в зависимости от их происхождения. Биохимия, 2, 154, 1937.
- Благовещенский, А. В.—Биохимическая эволюция растений в связи с изменением качества ферментов. Успехи современной биологии, 11, 320, 1939.
- Буланкин, И. и Каплан, В.—О возрастных физико-химических и химических изменениях коллагеновых производных кожи. Тезисы докладов на конференции по вопросам сравнительной биохимии. Академия наук УССР, 1939, стр. 62.
- Броновицкая, З. Г.—О некоторых возрастных изменениях тканевого протеина. Диссертация, 1941—см. данный сборник.
- Нагорный, А. В.—Проблема старения и долголетия. Изд. Харьковского гос. университета, 1940.
- Пикте—Строение молекул и жизнь. Природа. 1916, стр. 421.
- Ринч, Д.—Строение протеинов и некоторых физиологически-активных веществ. Успехи химии, 6, 284, 1937.
- Сведберг, Т.—Белковые молекулы. Успехи химии, 6, 715, 1937.
- Талмуд, Д. Л.—Строение белковой молекулы. Ж. общ. химии, 9, 1243, 1939; Доклады Акад. наук СССР, 20, 153, 1938.
- Феликс, К.—Протамины и их биологическое значение. Успехи биологической химии, 13, 138, 1937.
- Arrenius, Sv.—Über die Reactionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren. Zeitsch. physik. Chem. 4, 226, 1889.
- Astbury, W.—Röntgenstrahlen Abenteuer unter den Eiweisskörpern. Koll., Z. 83, 130, 1938.
- Bergmann, M. a. Niemann, C.—On blood fibrin. A contribution to the problem of protein structure. Journ. biol. Chem., 115, 77, 1936.
- Bergmann, M. a. Niemann, C.—On the structure of proteins: cattle hemoglobin egg albumin, cattle fibrin and gelatin. Journ. biol. Chem., 118, 301, 1937.
- Bergmann, M. a. Niemann, C.—On the structure of silk fibroin. Journ. biol. Chem. 122, 577, 1938.
- Ruzicka, V.—Das chemische Korellat der Protoplasmahysteresis. Arch. Entwich. Mech., 106, 104, 1929.
- Svedberg, Th.—Über die Bestimmung von Molekulargewichten durch Zentrifugierung. Z. physik. Chem., 121, 65, 1926; 127, 51, 1927.
- Wrinch, D.—On the structure of insulin.—Science, 85, 566, 1937.
- Wrinch, D. a. I. Langmuir—Nature of the cyclol Bond. Nature, 143, 49, 1939.

AGE CHANGES OF TISSUE PROTEINS

I. N. BULANKIN and M. A. BLUMINA

Sector of General Physiology of the Zoo-Biological Institute of the Kharkov State University (Chief—Prof. A. V. Nagorny)

There have been studied age changes of the chemical structure of proteins of liver, heart and brain, as well as of collagenic fibres of albino rats of various age. At solving this question we applied the fermentologic method of investigation, because the fermentative analysis is the most delicate analysis of the chemical structure of protein.

On basis of obtained data the following conclusions can be reached at:

1. The capacity to split under the influence of proteolytic ferments in tissue proteins (liver, heart, brain) decreases with age, and the temperature coefficient Q_{10} (see tables 1, 2, 3) and the energy of activation (μ) constantly increases (see t. 4).
2. The capacity to split, the temperature coefficient and the energy of activating collagenic fibres remain unchanged and do not depend on age (see tables 1, 2, 3, 4).

3. Hence it follows that protoplasmic proteins show distinctly expressed age changes of their structure, while collagenic formations, which belong to proteins of the metaplastic type, do not undergo chemical age changes. It is impossible to consider these chemical changes of the tissue proteins only as an increase of the metaplastic formations.

4. An analysis of the data of many authors and the data of our laboratory (Bronovitskaya) testify as to the constancy of the aminoacid composition of the tissue protein. This permits us to conclude that age changes of the protein are conditioned not so much by the aminoacid composition, as by the change in the character of the intramolecular connections.

5. On the basis of contemporary viewpoints on the structure of the proteic molecule we advance a hypothesis about age stabilization that exists in the proteic molecule of cyclic structures, owing to which, there decreases „the reactivity“ of proteic substances in the organism in the process of vital activity.
