

Н. Н. ВЕЛИКИЙ, академик АН УССР Р. В. ЧАГОВЕЦ

### ИЗУЧЕНИЕ ОБМЕНИВАЕМОСТИ ХОНДРОИТИН-СУЛЬФАТА ХРЯЩА ВИТАМИН А-НЕДОСТАТОЧНЫХ ЦЫПЛЯТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕЧЕНЫХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ

Важным моментом в синтезе гликозаминогликанов (кислых мукополисахаридов) выступает включение в полисахаридную цепь боковых групп: ацетильной, аминогруппы и сульфатной в сульфатированных гликозаминогликанах. На примере гиалуроновой кислоты (<sup>1</sup>) показано, что в синтезе участвуют УДФ-производные гексуроной кислоты и гексозамина, образующиеся из глюкозы без разрыва ее углеродного скелета (<sup>2</sup>). Процессы новообразования сульфатированных гликозаминогликанов, по всей вероятности, сходны с таковыми гиалуроновой кислоты с добавлением ферментативного блока сульфатирования (активация сульфата до ФАФС — 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфата и перенос его от ФАФС к акцептору) (<sup>3</sup>).

Биосинтез сульфатированных гликозаминогликанов соединительной ткани в известной степени зависит от обеспеченности организма животных витамином А (<sup>4, 5</sup>). Предметом исследований, посвященных этому вопросу, были ферментативные системы активирования сульфата (<sup>6, 7</sup>), а также обменяемость сульфата в условиях А-авитаминоза (<sup>8</sup>). Вопросы образования полисахаридной цепи остаются неисследованными.

Исходя из работ нашей лаборатории (<sup>9-11</sup>) по включению радиоактивного сульфата, представлялось целесообразным изучить обменяемость углеводной части полисахарида при А-авитаминозе, используя глюкозу-С<sup>14</sup> и ацетат-С<sup>14</sup>, что дало бы возможность более полно судить о биосинтезе молекулы хондроитин-сульфата.

Опыты проводились на однодневных цыплятах весом 30—35 г, которых содержали на А-авитаминозной диете. Одна из групп (контрольная) получала дополнительно витамин А-концентрат из расчета 40 000 и.е. на 1 кг корма. Клинические признаки А-авитаминоза проявлялись у животных опытной группы на 30—40 сутки содержания на диете. За 24 часа до декапитации животным вводили радиоактивный сульфат натрия из расчета 0,5 мкС на 1 г веса, глюкозу-1,6-С<sup>14</sup> из расчета 0,05 мкС/г и ацетат-1-С<sup>14</sup> из расчета 1 мкС/г. Выделение гликозаминогликанов из хрящевой ткани проводилось по описанной ранее методике (<sup>9</sup>).

Выделенные из хрящевой ткани цыплят препараты гликозаминогликанов электрофоретически гомогенны и соответствуют по подвижности стандартному хондроитин-сульфату. Основной сульфатированный полисахарид хряща, входящий в состав хондроитин-сульфат-белкового комплекса, идентифицирован нами как хондроитин-4-сульфат (<sup>10</sup>). Препараты содержат 0,7—1,0% белка, определенного по Лоури (<sup>12</sup>).

Удельная радиоактивность хондроитин-сульфата хряща после введения радиоактивного сульфата, глюкозы-С<sup>14</sup> и ацетата-С<sup>14</sup> (средние данные из 8 опытов, имп/мин на 1 мг хондроитин-сульфата,  $M \pm m$ ) оказалась:

Введенный препарат	Na <sub>2</sub> S <sup>35</sup> O <sub>4</sub>	Глюкоза-1,6-С <sup>14</sup>	Ацетат-1-С <sup>14</sup>
Контроль	2624 ± 148,1	359 ± 34,2	458 ± 40,2
А-авитаминоз	1066 ± 74,6	384 ± 45,9	434 ± 31,4
P	< 0,001	недостов.	недостов.

Недостаточность витамина А приводит к значительному ингибированию (на 59,4%) включения радиоактивного сульфата в хондроитин-сульфат хряща. Эти данные подтверждают предположение о нарушении утилизации и использования сульфата в синтезе высокомолекулярных сульфат-содержащих соединений тканями витамин А-недостаточных животных.



Наряду с этим не наблюдалось изменений включения радиоактивной глюкозы и ацетата. Очевидно, нарушения в синтезе хондроитин-сульфата и недостаточности витамина А происходят лишь на стадии сульфатирования и не затрагивают предшествующих им процессов, включая полимеризацию углеводной цепи. Такой вывод вытекает из представления о сульфатировании как завершающем звене в синтезе хондроитин-сульфата.

Если принять, что сульфатирование гликозаминогликанов осуществляется через активную форму сульфата — ФАФС, возможны по крайней мере три механизма биосинтеза их сульфатированных форм:

1. По аналогии с синтезом других полисахаридов, можно было предположить введение сульфатной группы в производное моносахарида (особенно УДФ-сахара). Однако получить доказательства участия УДФ-*N*-ацетилгалактозамин-4-сульфата, выделенного из яйцевода кур<sup>(13)</sup>, в синтезе гликозаминогликанов не удалось<sup>(14)</sup>.

2. Сузуки и Стремингер<sup>(15)</sup> наблюдали, что олигосахариды, состоящие из чередующихся остатков уроновой кислоты и гексозамина с аминтерминалом на невосстанавливаемом конце, являются высокоэффективными ингибиторами для сульфотрансферазной системы. Возникло предположение об этерификации углерода в ходе ступенчатого удлинения цепи. В связи с этим, по данным Тельсера и сотрудников<sup>(3)</sup>, сульфатирование концевой *N*-ацетилгалактозамина ингибирует присоединение к нему  $C^{14}$ -УДФ-урононовой кислоты и является, очевидно, механизмом ограничения синтезируемой цепи гликозаминогликана.

3. Способность сульфатированных гликозаминогликанов (хондроитин-сульфата, гепарина, кератан-сульфата) служить непосредственно субстратами сульфатных групп указывает на возможность сульфатирования высокомолекулярных полисахаридов, т. е. полимеризация цепи должна предшествовать сульфатированию. Степень сульфатирования наиболее высокая для природных гликозаминогликанов с низким содержанием сульфатных групп и снижается по мере насыщения их сульфатными группами<sup>(16, 17)</sup>. Наличие в тканях высокоспецифичных сульфотрансферазных систем также предполагает сульфатирование после завершения полимеризации цепи<sup>(11-13)</sup>.

Результаты проведенных нами исследований дают возможность считать, что сульфатирование хондроитин-сульфата, являясь завершающим звеном в синтезе данного гликозаминогликана, следует за полимеризацией углеводной цепи. В противном случае нарушения включения радиоактивной глюкозы и ацетата неминуемо сопровождалось бы сходными изменениями во включении глюкозы- $C^{14}$  и ацетата- $C^{14}$ . Сделанный вывод согласуется с данными Дингла и Луси<sup>(21)</sup>, показавших, что внедрение меченого глюкозамина в гликозаминогликаны в культуре клеток не зависит от витамина А.

Институт биохимии  
Академии наук УССР Киев

Поступило  
16 XII 1969

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> A. Dorfman, *Federat. Proc.*, **21**, 1070 (1962). <sup>2</sup> S. Roseman, F. E. Moore et al., *J. Biol. Chem.*, **203**, 213 (1953). <sup>3</sup> A. Telser, H. C. Robinson, A. Dorfman, *Arch. Biochem. and Biophys.*, **116**, 458 (1966). <sup>4</sup> G. Wolf, P. T. Varadachari, *Biochim. et biophys. acta*, **43**, 501 (1960). <sup>5</sup> K. Subba Rao, J. Ganguly, *Biochem. J.*, **98**, 693 (1966). <sup>6</sup> P. R. Sundaresan, *Biochim. et biophys. acta*, **112**, 5 (1966). <sup>7</sup> A. S. Lewi, S. Geller et al., *Biochem. J.*, **109**, 69 (1968). <sup>8</sup> V. Malyhergi, B. K. Vachawat, *Indian J. Biochem.*, **2**, 90 (1965). <sup>9</sup> М. М. Великий, А. А. Думейко, Р. В. Чаговец, *Укр. биохим. журн.*, **40**, 63 (1968). <sup>10</sup> М. М. Великий, *Укр. биохим. журн.*, **40**, 572 (1968). <sup>11</sup> А. А. Думейко, М. М. Великий, М. А. Артемченко, *Укр. биохим. журн.*, **41**, 31 (1969). <sup>12</sup> O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough et al., *J. Biol. Chem.*, **193**, 165 (1951). <sup>13</sup> J. L. Strominger, *Biochim. et biophys. acta*, **17**, 283 (1955). <sup>14</sup> S. Suzuki, *Biochemistry and Medicine of Mucopolysaccharide*, Tokyo, 1962, p. 12. <sup>15</sup> S. Suzuki, J. L. Strominger, *J. Biol. Chem.*, **235**, 274 (1960). <sup>16</sup> S. Suzuki, J. L. Strominger, *J. Biol. Chem.*, **235**, 257 (1960). <sup>17</sup> E. A. Davidson, J. G. Riley, *J. Biol. Chem.*, **235**, 3367 (1960). <sup>18</sup> J. B. Adams, *Biochem. J.*, **76**, 520 (1960). <sup>19</sup> B. Wornatman, *Federat. Proc.*, **22**, 413 (1963). <sup>20</sup> R. L. Perlman, A. Telser, A. Dorfman, *J. Biol. Chem.*, **239**, 3623 (1964). <sup>21</sup> D. M. Kochhar, J. Dingle, J. A. Lucy, *Exp. Cell. Res.*, **52**, 591 (1968).