

БИОХИМИЯ

Действительный член Академии медицинских наук СССР
С. Е. СЕВЕРИН и Н. П. МЕШКОВА

**ВЛИЯНИЕ КАРНОЗИНА И АНСЕРИНА НА УГЛЕВОДНО-ФОСФОРНЫЙ
ОБМЕН ГРУДНЫХ (КРАСНЫХ) МЫШЦ ГОЛУБЯ**

При изучении роли карнозина в обмене веществ мышц было показано, что добавление карнозина к взвеси мышц лягушки и крысы в фосфатном буферном растворе вызывает добавочное связывание неорганического фосфата и накопление кислотно-растворимых органических фосфорных соединений. При инкубации диализированных экстрактов влияние карнозина сказывалось только при одновременном добавлении адениловой кислоты и козимазы (¹, ²). На основании этих опытов было высказано предположение, что влияние карнозина на углеводно-фосфорный обмен мышц осуществляется на стадии эстерификации минерального фосфата при окислении фосфоглицеринового альдегида в фосфоглицериновую кислоту.

Настоящая работа посвящена выяснению вопроса о влиянии карнозина на процессы фосфорилирования в мышцах, характеризующихся интенсивным окислительным обменом*. В качестве объекта исследования были взяты грудные (красные) мышцы голубя.

Постановка опытов. Инкубация ткани (измельченная грудная мышца голубя) проводилась в фосфатном буферном растворе **, содержащем гликоген (10 мг в 1 мл) и фтористый натрий из расчета конечной его концентрации в реакционной жидкости в 0,025 M. Опыты ставились в атмосфере кислорода и в атмосфере азота. Всегда ставились 4 пробы, к одной из которых добавлялся карнозин (40 мг на пробу в 6 мл), к другой ансерин (40 мг), и две пробы были без добавок. Одна из проб без добавок являлась «начальной» пробой; в эту пробу добавлялся равный объем 5% раствора трихлоруксусной кислоты, тогда как три остальные пробы ставились на инкубацию. После инкубации pH опытных проб проверялся капельным буферным методом. pH в пробах после инкубации был одинаковым и в различных опытах колебался в пределах от 6,8 до 7,0. Во всех пробах в трихлоруксусном центрифугате проводилось определение неорганического фосфата после осаждения его магнезиальной смесью, лабильного и легко гидролизуемого фосфора, фосфора после 3-часового гидролиза и общего фосфора. Разность между общим фосфором и фосфором суммы всех определявшихся фосфорных соединений принималась за фракцию трудно гидролизуемого фосфора.

Во всех опытах в присутствии карнозина и ансерина наблюдалось большее исчезновение неорганического фосфата, чем в контрольных пробах. Весь дополнительно исчезнувший в присутствии карнозина и ансерина минеральный фосфат открывался во фракции трудно

* Работа было проведена при участии И. А. Соболевой и Е. Б. Кругляк.

** Состав фосфатного буферного раствора: 100 мл 0,9% раствора NaCl, 4 мл 1,15% раствора KCl, 45 мл 0,15 M раствора Na₂HPO₄, 1 мл 3,82% раствора MgSO₄·7H₂O, 3 мл 1,30% раствора NaHCO₃; pH буферного раствора был равен 7,9—8,1.

гидролизуемого фосфора. Изменений в других фракциях фосфора не наблюдалось. В аэробных условиях как интенсивность фосфорилирования, так и влияние добавления карнозина и ансерина на процесс фосфорилирования были выражены более отчетливо, чем в анаэробных условиях (см. рис. 1).

Для выяснения вопроса о связи добавочного фосфорилирования в присутствии карнозина с поглощением кислорода была проведена вторая серия исследований в сосудиках аппарата Варбурга. Опыты ставились в аэробных и в анаэробных условиях.

По окончании инкубации белки осаждались трихлоруксусной кислотой и удалялись центрифугированием; в центрифугате проводилось определение общего и неорганического фосфора. Количество связанного фосфора рассчитывалось по разности между общим и неорганическим фосфором. Результаты определения представлены в табл. 1. Во всех опытах в присутствии карнозина наблюдалось избыточное потребление кислорода тканью, но строгой количественной зависимости между избыточно поглощенным кислородом и избыточно связанным в аэробных условиях фосфором за счет добавленного карнозина наблюдать не удалось. Добавление бромацетата практически снижало избыточное связывание фосфора за счет добавленного карнозина. Однако

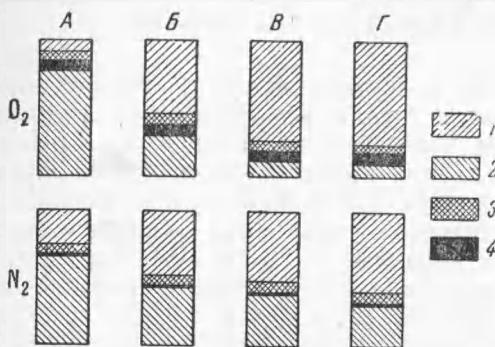


Рис. 1. А — начальная проба, Б — контрольная проба, В — с добавлением карнозина, Г — с добавлением ансерина, 1 — трудно гидролизуемый фосфор, 2 — неорганический фосфат, 3 — глюкозодифосфат, 4 — аденоинтрифосфат

избыточное потребление кислорода при концентрациях бромацетата в 0,001—0,002 М сохранялось, иногда лишь частично.

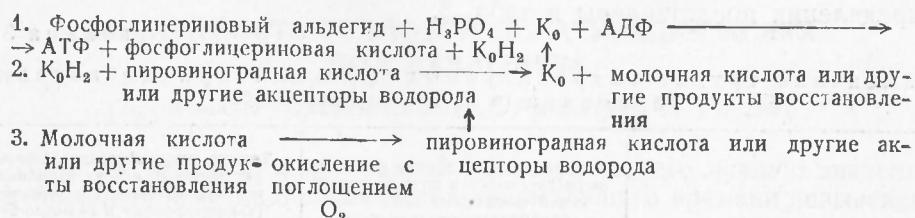
Таблица 1

Влияние карнозина и бромацетата на количество поглощенного тканью кислорода и связанный фосфор (на 1 г ткани)

Условия инкубации	Поглощено О ₂ мм ³		Избыток поглощ. О ₂ за счет добавл. карнозина		Связанный фосфор в мг		Избыток связанного фосфора за счет добавл. карнозина	
	контрольн. опыт	при до- бавл. карно- зина	мм ³	μM	контрольн. опыт	при до- бавл. карно- зина	мг	μM
	I	II	III=II-I	IV	V	VI	VII=VI-V	VIII
O ₂ , 37°, 25 мин.	125	318	193	8,6	0,60	1,46	0,86	27,7
N ₂ , 37°, 25 мин.	—	—	—	—	0,60	1,00	0,40	12,9
O ₂ , 26°, 1 час	175	292	117	5,2	1,73	2,49	0,76	24,5
O ₂ , 26°, 1 час с CH ₂ BrCOOH	199	319	120	5,3	0,95	1,05	0,10	3,2
O ₂ , 26°, 1 час	115	205	90	4,0	1,58	2,02	0,44	14,2
O ₂ , 26°, 1 час с CH ₂ BrCOOH	103	151	48	2,1	0,52	0,60	0,08	2,6

Приведенные данные дают право говорить, что карнозин в мышцах с выраженным окислительным обменом также принимает участие

в реакции, при которой фосфоглицериновый альдегид превращается в фосфоглицериновую кислоту, а пировиноградная кислота — в молочную кислоту. Меньший избыток связанного в анаэробных условиях в присутствии карнозина неорганического фосфата может быть объяснен недостатком акцепторов водорода и задержкой окисления кодегидразы, так как в анаэробных условиях в присутствии фтористого натрия образование пировиноградной кислоты за счет процесса гликолиза исключено. Атмосфера кислорода и протекающее в ней дыхание мышечной кашицы обеспечивают образование недостающих акцепторов водорода, например в результате окисления молочной кислоты, и обеспечивает быстрое течение реакции «сопряженного фосфорилирования» по следующей схеме:



Добавление в условиях нашего опыта (анаэробные условия, фтористый натрий) акцепторов водорода, например пировиноградной кислоты, должно повысить в присутствии карнозина количество избыточно связанного фосфора. Для проверки этого положения был поставлен опыт в анаэробных условиях с добавлением к части проб пировинограднокислого натрия из расчета 3 мг на пробу (около 30 μM). После инкубации проводилось определение общего и неорганического фосфора и фосфопировиноградной кислоты; для учета превращения пировиноградной кислоты проводилось определение молочной кислоты.

В присутствии пировиноградной кислоты наблюдалось более выраженное избыточное связывание неорганического фосфата и нарастание молочной кислоты за счет добавленного карнозина (см. табл. 2). Ни в одной из проб фосфопировиноградной кислоты найдено не было.

Таблица 2

Влияние добавления пировиноградной кислоты и карнозина на количество связанного фосфора и образование молочной кислоты при инкубации ткани в анаэробных условиях

Наименование проб	Найдено в μM			
	связанного фосфора	избыток по сравн. с контр. пробой	молочной кислоты	избыток по сравн. с контр. пробой
Контрольная	48,7		20	
С карнозином	68	19,3	20	0
С пировиноградной к-той	58,7	10	25	5
С карнозином и пировиноградной к-той	87,4	38,7	46	26

Для выяснения природы фосфорного соединения, накапливающегося при инкубации ткани в присутствии карнозина, была предпринята попытка разделения фосфорных соединений, используя различную растворимость их бариевых солей.

Фосфор гексозодифосфата и фруктозомонофосфата рассчитывался по фруктозе, которую определяли колориметрическим методом с ре-зорцином (3), в некоторых опытах проводилось определение АТФ.

Опыты были поставлены в аэробных и анаэробных условиях как с добавлением бромацетата, так и без него. При инкубации ткани с добавленным карнозином и ансерином нарастание фосфора наблюдалось только в трудно гидролизуемых фракциях как нерастворимых в воде бариевых солей (фосфоглицериновая кислота), так и растворимых (фосфоглицерин и глюкозо-6-фосфат). В присутствии бромацетата избыточного образования трудно гидролизуемых фракций фосфорных соединений не наблюдалось. Избыточное образование в присутствии карнозина трудно гидролизуемой фракции бариевых солей, растворимых в воде, можно объяснить нарастанием глицирофосфата, который в присутствии NaF может образоваться в процессе реакции окисления восстановленной козимазы за счет фосфодиоксиациетона. Результаты определения представлены в табл. 3.

Таблица 3

Изменение трудно гидролизуемых фракций при добавлении карнозина (в мг Р в опытной пробе)

Условия опыта	Трудно гидролизуемая фракция неравторимых в воде бариевых солей фосфорных соединений (фосфоглицериновая к-та)			Трудно гидролизуемая фракция растворимых в воде бариевых солей фосфорных соединений (глицирофосфат и глюкозо-6- фосфат)		
	контр.	карн.	избыт.	контр.	карн.	избыт.
O ₂	0,28	1,16	0,88	1,11	1,58	0,47
N ₂	0,17	0,36	0,19	1,06	1,17	0,11
O ₂	0,71	1,42	0,71	1,20	1,57	0,37
N ₂	0,13	0,50	0,37	0,41	0,80	0,39
O ₂	0,28	1,15	0,87	1,10	1,55	0,45
N ₂	0,16	0,28	0,12	1,06	1,18	0,12
O ₂	0,50	0,93	0,43	1,19	1,46	0,27
C ₂	0,50	1,16	0,66	1,19	1,49	0,30*
O ₂ с бромацетатом	0,33	0,41	0,08	0,93	0,84	-0,09
O ₂ с бромацетатом	0,24	0,28	0,04	1,09	0,76	-0,35

* С ансерином.

Таким образом, добавление карнозина и ансерина к мышечной ткани голубя ускоряет реакцию фосфорилирования, связанную с окислением фосфоглицеринового альдегида. Этот вывод можно сделать на основании следующих данных.

1. Интенсивность фосфорилирования при добавлении карнозина больше в аэробных условиях, чем в анаэробных. Добавочное связывание фосфора за счет добавленного карнозина сопровождается избыточным потреблением мышечной кашеющей кислорода.

2. Добавление бромацетата снимает избыточное связывание фосфора за счет добавленного карнозина.

3. Добавление пировиноградной кислоты при инкубации в анаэробных условиях повышает избыточное связывание фосфора за счет добавленного карнозина.

4. Избыточно связанный за счет добавления карнозина фосфор открывается во фракции трудно гидролизуемых фосфорных соединений, в основном во фракции фосфоглицериновой кислоты.

Поступило
14 VII 1950

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ С. Е. Северин, Е. Ф. Георгиевская и В. И. Иванов, Биохимия, **12**, 35 (1947). ² С. Е. Северин, В. И. Иванов, Н. П. Карузина и Р. Я. Юделович, Биохимия, **13**, 158 (1948). ³ J. N. RoI, Journ. Biol. Chem., **107**, 15 (1934).