

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

### ВЛИЯНИЕ КАРНОЗИНА НА ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ

При изучении влияния карнозина на углеводно-фосфорный обмен грудных (красных) мышц голубя было установлено, что добавление к инкубируемой пробе креатина приводит в присутствии карнозина к большему образованию лабильного фосфорного соединения (1). Образование лабильного фосфорного соединения частично могло объясняться ускоряющим влиянием карнозина на перенос фосфатного остатка с аденозинтрифосфата (АТФ), образующегося в процессе гликолитической оксидоредукции, на креатин. Гликолитическая оксидоредукция, как было установлено, ускоряется карнозином. Однако это не исключало возможности влияния карнозина и на дыхательное фосфорилирование и связанное с ним образование АТФ, тем более, что раньше было установлено, что добавление к мышечной кашице карнозина увеличивало поглощение тканью кислорода (2).

Настоящее исследование посвящено вопросу о влиянии карнозина на окислительное (дыхательное) фосфорилирование.

Постановка опытов. Измельченная грудная мышца голубя\* инкубировалась в фосфатном буферном растворе в присутствии фтористого натрия из расчета конечной его концентрации в 0,025 М\*\*. Для улавливания АТФ, образующегося в процессе фосфорилирования, в пробы добавлялся креатин в количестве 10 мг на пробу в 3 мл. Инкубация проводилась при 20°, продолжительность инкубации 45—90 мин. Учет потребленного кислорода проводился обычным манометрическим методом; опыты ставились в сосудиках с двумя пришлифованными ретортами (3). Определение водородного показателя проводилось капельным буферным методом с универсальным индикатором. В пробах до инкубации величина рН колебалась в пределах 7,3—7,4, в пробах после инкубации 6,8—7,0. После инкубации пробы помещались в снег и обрабатывались охлажденным раствором трихлоруксусной кислоты (добавлялся равный объем 5% раствора). Тотчас же после осаждения белков осадок белка отфильтровывался, и бралась проба для определения лабильного фосфата и фосфокреатина. Для определения лабильного фосфата 1,5—2,0 мл трихлоруксусного фильтрата выливалось в равный объем охлажденной магниальной смеси, все тщательно перемешивалось, и через 30—40 мин. осадок неорганического фосфата отфильтровывался. В фильтрате проводилось определение лабильного фосфора по цветной реакции с молибдатом (3). Фосфокреатин определялся методом А. М. Алексеевой (4) с тем лишь отличием, что раствор молибдата готовился более крепким (1,4% раствор молибденовокислого аммония на 2 N растворе серной кислоты). Определение проводилось следующим образом: 1 мл трихлоруксусного фильтрата выливался в равный объем охлажденного раствора молибденового реактива,

\* Несколько опытов было проведено на грудной мышце курицы.

\*\* Состав буферного раствора: 100 мл 0,9% раствора NaCl, 4 мл 1,15% раствора KCl, 45 мл 0,15 M раствора Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и 1 мл 3,82% раствора MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O.

все тщательно перемешивалось и оставлялось при комнатной температуре на несколько часов. Затем раствор фильтровался и в фильтрате, после его нейтрализации, проводилось определение креатинина с пикриновой кислотой. В трихлоруксусном фильтрате проводилось определение также фосфоглицериновой кислоты по цветной реакции с нафто-резорцином. Определение фосфоглицериновой кислоты могло дать представление о том, насколько образование лабильного фосфора связано с реакцией гликолитической оксидоредукции.

При постановке опытов с учетом поглощенного кислорода в центральную часть манометрического сосуда помещался раствор фосфата, в боковые реторточки наливалось по 0,5 мл 10% раствора едкого натра для поглощения угольной кислоты, образующейся в процессе инкубации. Сосудики плотно притирались к манометрам и через систему пропускался кислород. Через 2—3 мин. через один из боковых отростков вносилась навеска ткани, содержимое средней части перемешивалось тонкой изогнутой палочкой и отмечалось время. Через 2—3 мин. реторточки плотно притирались, прекращалось пропускание кислорода и манометры помещались в термостат. Через 10—15 мин. начинался учет потребления кислорода. Количество поглощенного кислорода за время, прошедшее с момента помещения ткани в сосудик до начала отсчета, рассчитывалось по количеству потребленного кислорода за первые 10 мин. инкубации в термостате.

В первых опытах в качестве субстрата дыхания добавлялась пировиноградная кислота в количестве от 2 до 10 мг на пробу в 3 мл\*. В последующих опытах от добавления пировиноградной кислоты мы отказались, так как сама мышечная ткань содержит достаточное количество субстратов дыхания.

Накопление лабильного фосфорного соединения наблюдалось только в атмосфере кислорода, причем добавление карнозина увеличивало образование лабильного фосфорного соединения. При инкубации ткани в анаэробных условиях лабильного фосфора не обнаруживалось (табл. 1).

Таблица 1

Образование лабильного фосфорного соединения  
(в мг P на всю пробу)

Дата опыта	Мышца	В пробу добавлено*	Инкубация ткани в атмосфере	
			кислорода	водорода
8 X 1951	Грудная мышца голубя	Пировиногр. кислота . . . . .	0,32	Следы
		То же + карнозин . . . . .	0,59	0
		Без добавок . . . . .	0	0
22 X 1951	Грудная мышца курицы	Карнозин . . . . .	0,10	0
		Пировиногр. кислота . . . . .	0,28	0
		То же + карнозин . . . . .	0,45	0,03

\* Во все пробы добавлено по 10 мг креатина.

В опытах, в которых проводился учет потребленного кислорода, было установлено, что добавление карнозина повышает интенсивность дыхания ткани (рис. 1), причем добавочное количество потребленного кислорода прямо пропорционально количеству добавленного карнозина, а также прямо пропорционально количеству добавочно образовавшегося лабильного фосфора (рис. 2). Количество образовавшейся за все вре-

\* Одновременно с пировиноградной кислотой всегда добавлялись каталитические количества яблочной кислоты.

мя опыта фосфоглицериновой кислоты при данной постановке опыта не зависело от количества добавленного карнозина. Это говорит о том, что образование лабильного фосфорного соединения не было связано с реакцией гликолитической оксидоредукции (1).

Соотношение между количеством избыточно поглощенного кислорода

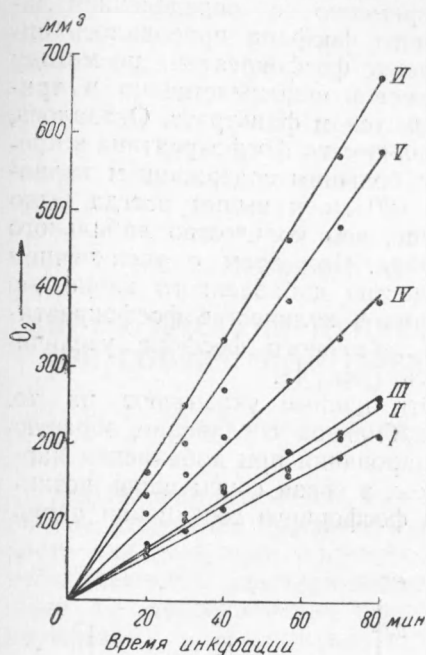


Рис. 1. Зависимость поглощения тканью кислорода от количества добавленного карнозина. I—без карнозина, II—2 мг карнозина, III—5 мг карнозина, IV—10 мг карнозина, V—20 мг карнозина, VI—30 мг карнозина

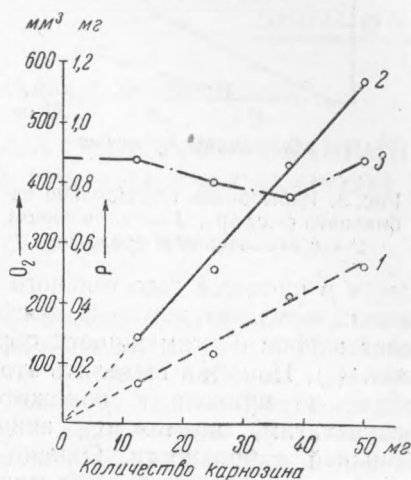


Рис. 2. Влияние карнозина на окислительное фосфорилирование. 1—избыточное потребление кислорода, 2—избыточное образование лабильного фосфора, 3—найдено фосфоглицериновой кислоты, в пробе

и количеством избыточно образовавшегося за счет добавленного карнозина лабильного фосфора от опыта к опыту колеблется и зависит, по видимому, от состояния ткани. Ферментные системы, связанные с процессами дыхательного фосфорилирования, очень нестойки и быстро разрушаются при обработке ткани.

Избыточное потребление кислорода при добавлении карнозина не зависит от присутствия креатина. В пробах и без добавления креатина наблюдается такое же избыточное потребление кислорода, как и в пробах с карнозином и креатином (табл. 2). Образование же лабильного фосфорного соединения в значительных количествах наблюдается только при одновременном добавлении карнозина и креатина. В пробах без креатина добавление лишь больших количеств карнозина вызывает образование незначительного количества лабильного фосфорного соединения (рис. 3).

Добавление одного креатина не влияет на интенсивность дыхания и не приводит к образованию сколь-либо значительного количества лабильного фосфора.

Добавленный карнозин не претерпевает каких-либо изменений в процессе инкубации. Определение карнозина по диазореакции (5) и хроматографический анализ (6) в пробах до и после инкубации дают совершенно одинаковые результаты.

Таблица 2

Потребление тканью кислорода

Добавлено в пробу карнозина	Поглощено кислорода в мм <sup>3</sup>	
	без креатина	с креатином
—	260	289
2	289	321
5	305	345
10	407	441
20	534	530
30	648	707

Для выяснения природы лабильного фосфорного соединения, образующегося в процессе инкубации,

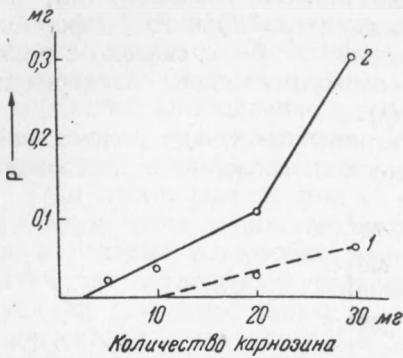


Рис. 3. Избыточное образование лабильного фосфора. 1—с карнозином, 2—с карнозином и креати́ном

одновременно с определением лабильного фосфора проводилось определение фосфокреатина по методу Алексеевой непосредственно в трихлоруксусном фильтрате. Оказалось, что количество фосфокреатина в пробах с большим содержанием карнозина (20 мг и выше) всегда было меньше, чем количество лабильного фосфора. При этом с увеличением количества добавленного карнозина разница в количестве фосфокреатина и лабильного фосфора увеличивается (рис. 4).

Эти данные указывают на то, что лабильное соединение, образующееся в процессе дыхательного фосфорилирования при добавлении карнозина, не является только фосфокреати́ном, в связи с чем вновь возникает вопрос о возможности образования фосфорного соединения карнозина<sup>(7)</sup>. Попытка выделить это соединение не привела к положительным результатам, возможно, ввиду его большой лабильности. Однако не исключена возможность образования и более сложного комплекса, в состав которого входит фосфокарнозин.

Результаты, полученные в настоящей работе, позволяют формулировать следующие положения.

1. Карнозин влияет не только на фосфорилирование, связанное с гликолитической оксидоредукцией, являющейся сравнительно мало эффективным путем образования богатых энергией фосфорных соединений, но влияет и на дыхательное фосфорилирование, т. е. на основной путь образования АТФ и фосфокреатина.

2. Лабильное соединение, образующееся при добавлении карнозина в процессе дыхательного фосфорилирования, не является только фосфокреати́ном. Полученные данные по анализу лабильного фосфорного соединения дают право высказать предположения о возможности образования фосфорилированного производного карнозина.

Химические реакции, лежащие в основе процессов дыхательного фосфорилирования в мышечной ткани, и характер участия в них карнозина подлежат дальнейшему изучению.

Поступило  
5 III 1952

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Н. П. Мешкова и Н. А. Малышева, ДАН, 81, 247 (1951). <sup>2</sup> С. Е. Северин и Н. П. Мешкова, ДАН, 74, 549 (1950). <sup>3</sup> Н. П. Мешкова и С. Е. Северин, Практикум по биохимии животных, 1950. <sup>4</sup> А. М. Алексеева, Биохимия, 16, 97 (1951). <sup>5</sup> Н. П. Мешкова, Физиол. журн. СССР, 20, 896 (1936). <sup>6</sup> С. Е. Северин и В. Н. Федорова, ДАН, 82, 443 (1952). <sup>7</sup> С. Е. Северин, Е. Ф. Гергиевская и В. И. Иванов, Биохимия, 12, 35 (1947).