

Действительный член Академии медицинских наук СССР С. Е. СЕВЕРИН,
М. К. МИЛОВИДОВА и Р. М. БЕКИНА

ВЛИЯНИЕ КАРНОЗИНА НА ПРОЦЕССЫ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ В СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЕ

Влияние карнозина на обмен веществ скелетных мышц различных животных изучалось неоднократно, однако механизм его действия остается пока неясным. Установлено, что при инкубации мышечной кашицы в фосфатном буферном растворе в присутствии NaF карнозин ускоряет процесс гликолиза в целом и, в частности, повышает фосфорилирование, сопряженное с окислением фосфоглицеринового альдегида, сопровождающееся образованием избыточного количества фосфоглицериновой кислоты. Такое влияние карнозина установлено как на мышцах, характеризующихся преобладанием гликолитических процессов (лягушка, крыса) (1), так и на мышцах с интенсивным окислительным обменом (грудная мышца голубя) (2). В последнем случае было показано также (3), что добавление карнозина увеличивает образование богатых энергией фосфорных соединений в процессе дыхательного фосфорилирования.

Сердечная мышца характеризуется еще более выраженным окислительным обменом, чем грудная мышца голубя, и хотя содержание карнозина в ней незначительно (4), изучение влияния этого дипептида на протекающие в мышечной ткани сердца процессы фосфорилирования имеет существенное значение. Оно позволяет установить, насколько общим является влияние карнозина на обмен скелетной и сердечной мышцы; кроме того, подтверждение увеличенного образования богатых энергией соединений в мышечной ткани сердца под влиянием добавления карнозина должно вновь (5) привлечь внимание к исследованию фармакологической активности данного вещества.

Изложенные соображения и послужили основанием для проведения настоящей работы.

Постановка опытов

Непосредственным объектом исследования служила тканевая кашица, полученная измельчением ножницами на льду сердечной мышцы, предварительно освобожденной от жира, соединительной ткани и сгустков крови.

Для опыта бралось 500 мг кашицы. Инкубация проводилась в фосфатном буферном растворе в атмосфере кислорода. Для снижения действия высокоактивной АТФ-азы (6) пробы содержали NaF в концентрации 0,025 М. Наличие фторида одновременно снимало действие энлазы, благодаря чему исключались дальнейшие превращения фосфоглицериновой кислоты. Субстратом фосфорилирования служил гликоген в концентрации 500 мг%. Часть проб содержала карнозин в количестве 30 мг на

пробу. Общий объем проб равнялся 3 мл. Инкубация продолжалась 60 мин. при температуре 19—22°. Обычно ставились три пробы: одна — начальная («до инкубации»), в которой ферментативные процессы исключались предварительным (до введения мышечной кашицы) добавлением трихлоруксусной кислоты, и две пробы подвергались инкубации. В одну из инкубируемых проб добавлялся карнозин, другая служила контролем. Водородный показатель, определявшийся капельным методом с универсальным индикатором, в пробах до инкубации был около 7,4.

По истечении установленного времени инкубации ферментативные процессы в инкубируемых пробах прекращались добавлением трихлоруксусной кислоты, белки удалялись фильтрованием, и полученный безбелковый фильтрат подвергался анализу по методу, описанному Н. П. Мешковой и Н. В. Алексахиной. Фракционированное разделение Ва — Са-солей фосфорных эфиров производилось с использованием их различной растворимости в воде, после чего определялись количества отдельных фосфорных соединений. В нерастворимой в воде фракции определялись: неорганический фосфор ($P_{неорг}$), фосфоглицериновая кислота (ФГК) и фруктозодифосфат (ФДФ). Определение АТФ проводилось после выделения этого вещества

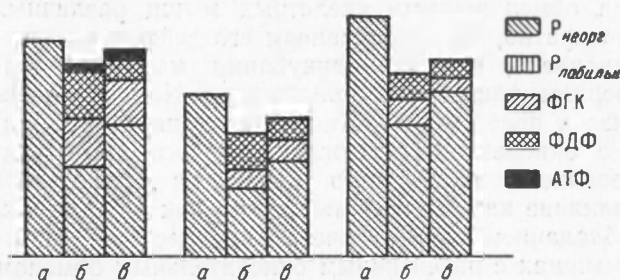


Рис. 1. Влияние карнозина на связывание минерального фосфата и на распределение фосфорных фракций. *а* — начальная проба, *б* — контрольная, *в* — с добавлением карнозина

из трихлоруксусного фильтрата в виде ртутной соли. В растворимой в воде фракции определялись монофосфаты глюкозы и фруктозы.

Во всех опытах с карнозином неожиданно была обнаружена меньшая убыль неорганического фосфора, причем по сравнению с контрольной пробой (без добавления карно-

зина) наблюдалось явное перераспределение фракций: примерно в два раза снижалась фракция ФДФ, количество ФГК практически было одинаковым и, как правило, наблюдалось накопление АТФ (рис. 1).

Такое перераспределение фракций, особенно снижение ФДФ, давало право предположить, что карнозин переключает обмен сердечной мышцы с гликолитического пути на дыхательный. Однако меньшая убыль неорганического фосфора противоречила этому предположению.

Известно, что при нормальном состоянии ферментной системы сердечной мышцы дыхание всегда сопряжено с фосфорилированием, результатом которого является синтез фосфокреатина через адениловую систему (^{7, 8}). Кроме того, ранее указывалось, что карнозин ускоряет реакцию переноса фосфорного остатка с АТФ на креатин (¹). Было высказано предположение, что в присутствии карнозина образуется большое количество лабильного фосфорного соединения, которое, вследствие своей неустойчивости, расщепляется с образованием неорганического фосфора, понижая тем самым количество фактически связанного фосфора в присутствии карнозина.

Для проверки этого предположения было введено определение лабильного фосфора ($P_{лабильн}$) в трихлоруксусном фильтрате после осаждения $P_{неорг}$ магниезиальной смесью. При этом соблюдались все предосторожности (быстрота обработки, низкая температура), необходимые для предохранения лабильного фосфорного соединения от расщепления.

Результаты определений, приведенные в табл. 1, не подтвердили нашего предположения, так как и в контрольной пробе и в пробе с карнози-

ном образуются практически равные и очень незначительные количества лабильного фосфора.

Возможно, что недостаток акцептора фосфата обуславливал такое незначительное накопление лабильных фосфорных соединений. Известно, что одним из основных акцепторов фосфата с АТФ является креатин (7, 8), запас которого в сердечной мышце значительно меньше, чем в скелетной.

Таблица 1

Влияние карнозина на фосфорилирование и образование лабильного фосфорного соединения

Пробы	$P_{\text{неорг.}}$ мг	$P_{\text{связан.}}$ мг	$P_{\text{лабильн.}}$ мг
Начальная	3,09	—	—
Контрольная . . .	1,27	1,82	0,06
С карнозином . . .	1,81	1,28	0,08
Начальная	4,60	—	—
Контрольная . . .	2,48	2,12	0,04
С карнозином . . .	3,12	1,48	0,05

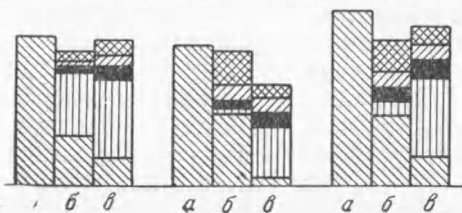


Рис. 2. Влияние карнозина на связывание минерального фосфата и на распределение фосфорных фракций при добавлении креатина. а — начальная проба, б — контрольная, в — с добавлением карнозина. Обозначения см. рис. 1

В наших условиях опыта, при использовании измельченной ткани, этот малый запас креатина, повидимому, не мог обеспечить улавливания всего переносимого с АТФ фосфора, в результате чего АТФ подвергался гидролитическому расщеплению и фосфор открывался во фракции неорганического фосфата.

Для подтверждения высказанного сообщения последующие опыты ставились с добавлением в каждую пробу 10 мг креатина, содержание же остальных веществ в пробах оставалось прежним.

Таким образом, в этой серии опытов контрольная проба содержала гликоген и креатин, а опытная — гликоген, креатин и карнозин.

Результаты этих опытов, приведенные на рис. 2, полностью подтвердили высказанное соображение и убедительно показали, что карнозин в сердечной мышце, так же как и в скелетной, повышает связывание неорганического фосфора. В присутствии карнозина значительно увеличивается количество лабильного фосфора и примерно в 2 раза по сравнению с контролем уменьшается образование ФДФ. Избыточное образование за счет карнозина лабильного фосфора в значительной мере покрывает избыточное связывание неорганического фосфора (рис. 2).

Нужно отметить, что и без карнозина (с одним креатином) образуется довольно много лабильного фосфора, что отличает обмен сердечной мышцы от скелетной (9).

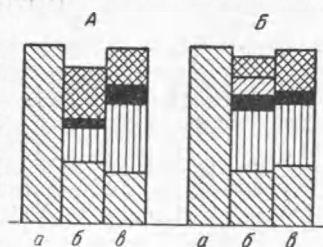


Рис. 3. Влияние карнозина и бромацетата на связывание минерального фосфата и распределение фосфорных фракций. А — влияние карнозина при добавлении бромацетата: а — начальная проба, б — контрольная (с добавлением бромацетата), в — с добавлением бромацетата и карнозина. Б — влияние бромацетата при добавлении карнозина: а — начальная проба, б — контрольная (с добавлением карнозина), в — с добавлением карнозина и бромацетата. Обозначения см. рис. 1

Подтверждением того, что карнозин повышает процессы фосфорилирования, сопряженные с реакциями окисления, могут служить приведенные на рис. 3 результаты опытов, поставленных в присутствии бромацетата. В одном случае (рис. 3 А) обе инкубируемые пробы содержали бромацетат в концентрации 0,002 М. К одной из этих проб был добавлен карнозин в количестве 30 мг. Наличие бромацетата не препятствовало повышенному связыванию неорганического фосфора при добавлении карнозина. Избыточное образование при этом лабильного фосфора и АТФ, а также снижение фракции ФДФ в присутствии бромацетата указывали на явное преобладание дыхательного пути обмена в сердечной мышце и участие в нем карнозина. В другом случае (рис. 3 Б) обе инкубируемые пробы содержали карнозин и к одной из них добавлялся бромацетат в той же концентрации, как и в первом случае (0,002 М). Полученные результаты еще раз подтвердили, что наличие бромацетата не снимает избыточного связывания минерального фосфата за счет карнозина.

Результаты опытов, поставленных с бромацетатом, находятся в соответствии с указанием на возможность образования фосфокреатина при выключенном гликолизе (7) и не противоречат данным, полученным при изучении деятельности изолированного сердца в атмосфере кислорода в присутствии иодацетата (10).

В заключение можно сказать, что добавление карнозина к кашице сердечной мышцы, так же как и к скелетной, оказывает в присутствии NaF выраженное влияние на процессы фосфорилирования, увеличивая количество связанного фосфора, лабильного фосфора и АТФ, причем избыточное связывание неорганического фосфора и образование лабильного Р за счет карнозина не снимается бромацетатом.

Поступило
18 VIII 1952

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ С. Е. Северин, В. И. Иванов и др., Биохимия, 13, 158 (1948). ² С. Е. Северин, Н. П. Мешкова, ДАН, 74, 549 (1950). ³ С. Е. Северин, Н. П. Мешкова, ДАН, 84, 105 (1952). ⁴ Н. А. Юдаев, Усп. соврем. биол., 30, 176 (1950). ⁵ Н. А. Исиченко, Е. Н. Филиппова, Фармакология и токсикология, 2, 32 (1939). ⁶ S. Oschoa, J. Biol. Chem., 151, 493 (1943). ⁷ В. А. Белицер, Биохимия, 2, 332 (1937). ⁸ В. А. Белицер, Е. Т. Цыбакова, Биохимия, 4, 516 (1939). ⁹ Н. П. Мешкова, Н. А. Малышева, ДАН, 81, 247 (1951). ¹⁰ A. Clark et al., J. Physiol., 75, 332 (1939).