

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

ВЛИЯНИЕ АНСЕРИНА НА ДЫХАТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ

При изучении влияния карнозина на дыхательное фосфорилирование было установлено, что добавление карнозина к мышечной каше голубя приводит к повышенному потреблению тканью O_2 и к накоплению лабильных фосфорных соединений (¹). Избыточное потребление кислорода и образование лабильного фосфата было прямо пропорционально количеству добавленного карнозина. При этом никакого изменения карнозина в процессе инкубации не обнаруживалось. Опыты ставились без добавления каких-либо субстратов дыхания в фосфатном буферном растворе с NaF в конечной его концентрации 0,025 M. Фтористый натрий добавлялся для уменьшения дефосфорилирования аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) за счет аденозинтрифосфатазы (²); однако, фторид мог, согласно литературным данным (³⁻⁶), задерживать также некоторые этапы окислительных превращений.

Задачей настоящего исследования являлось изучение влияния карнозина и ансерина на дыхательное фосфорилирование мышечной ткани голубя при инкубации ее без NaF. Постановка опытов была такой же, как и в предыдущем исследовании (¹), с тем лишь исключением, что NaF добавлялся только в некоторые пробы. Большая часть опытов была проведена без добавления каких-либо субстратов дыхания. В качестве акцептора, способного принимать на себя легко гидролизуемые фосфатные группировки АТФ, добавлялся креатин в количестве 10 мг на опытную пробу объемом в 3 мл.

При проведении опытов учитывалось количество потребленного тканью O_2 и образование лабильного фосфорного соединения (определение лабильного фосфата проводилось в магnezияльном фильтрате после осаждения неорганического фосфата). Результаты рассчитаны на весь объем подвергавшихся инкубации опытных проб (т. е. на 3 мл).

Оказалось, что в присутствии NaF поглощение тканью O_2 в опытных пробах, не содержащих специально добавленных субстратов дыхания, резко уменьшается, а образование лабильных фосфорных соединений не имеет места. Эти результаты нельзя объяснить недостаточным содержанием в опытных пробах пировиноградной кислоты, образование которой гликолитическим путем было задержано фторидом. Даже при

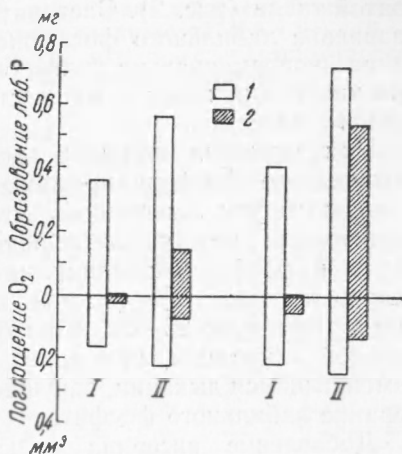


Рис. 1. Влияние фтористого натрия на дыхательное фосфорилирование. I — без добавления субстратов дыхания, II — с пировиноградной кислотой (3,5 мг). 1 — без фтористого натрия, 2 — с фтористым натрием (0,015 M)

добавлении значительных количеств пировиноградной кислоты (до 6 мг на пробу) в присутствии NaF также наблюдается отчетливое снижение интенсивности дыхательного фосфорилирования.

При этом уменьшается как потребление O_2 , так и образование лабильных фосфорных соединений (рис. 1). Таким образом, NaF является не только гликолитическим ядом, но и ядом для процессов дыхания.

При инкубации ткани без NaF добавление ансерина вызывает избыточное образование лабильного фосфата, которое при небольших количествах ансерина (от 5 до 30 мг на пробу в 3 мл, т. е. в пределах 200—1000 мг%) пропорционально количеству добавленного дипептида. Большие количества ансерина уже не вызывают добавочного фосфорилирования. При добавлении одно-

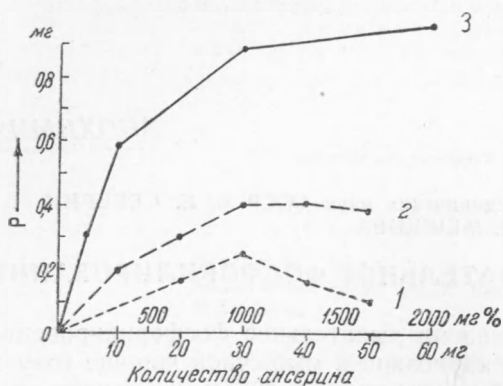


Рис. 2. Избыточное образование лабильного фосфата при различных навесках ткани в присутствии различных количеств ансерина. Инкубация в течение одного часа при 20°. 1 — 75 мг ткани, 2 — 150 мг ткани, 3 — 300 мг ткани

го и того же количества ансерина к различным навескам ткани избыточное образование лабильного фосфата пропорционально также количеству взятой ткани (рис. 2). Следовательно, образование лабильного фосфорного соединения пропорционально количеству взятой для инкубации ткани и количеству добавленного ансерина.

При изучении влияния ансерина на дыхательное фосфорилирование грудной мышцы голубя выяснилось, что прямая зависимость между интенсивностью дыхания и фосфорилирования имеет место только в первые 40—50 мин. инкубации при температуре 20—22°. При более длительной инкубации, при практически неизменяющемся дыхании, нарушается образование лабильного фосфата.

Добавление ансерина вызывает как повышение дыхания, так и в еще большей степени повышение интенсивности фосфорилирования (рис. 3).

Добавление даже небольших количеств α -кетоглутаровой кислоты (1,5—2,0 мг на пробу) вызывает повышение интенсивности дыхания и увеличение образования лабильного фосфата. При одновременном добавлении α -кетоглутаровой кислоты и ансерина избыточное образование лабильного фосфата представляет собой величину, близкую к сумме избыточного его образования при раздельном добавлении α -кетоглутаровой кислоты и ансерина. Той же закономерности подчиняется и величина избыточного поглощения кислорода (рис. 4).

При сопоставлении величины избыточного дыхания и избыточного образования лабильного фосфата в опытах с добавлением α -кетоглутаровой

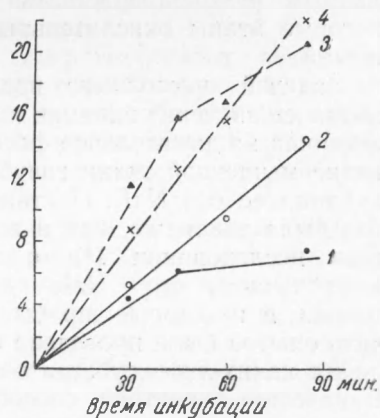


Рис. 3. Влияние ансерина на поглощение кислорода и образование лабильного фосфата (μ атомы) в процессе инкубации (150 мг ткани). 1 — образование лабильного фосфата без ансерина, 2 — поглощение кислорода без ансерина, 3 — образование лабильного фосфата с ансеринем, 4 — поглощение кислорода с ансеринем

кислоты или ансерина обращает на себя внимание, что избыточное образование лабильного фосфата при раздельном добавлении 10 мг ансерина или 1,5—2,0 мг кетоглутаровой кислоты оказывается практически одинаковым. Избыточное же поглощение O_2 является резко различным, а именно при добавлении ансерина оно было в 2—3 раза меньше, чем при добавлении α -кетоглутаровой кислоты. Это приводит к значительно более высокому коэффициенту фосфорилирования (P/O) в присутствии ансерина. Коэффициент фосфорилирования, вычисленный по избыточно образованному при добавлении ансерина лабильному фосфату и избыточно поглощенному при этом O_2 , всегда был высоким и в отдельных опытах превышал 4 ($P/O > 4$). Коэффициенты фосфорилирования, вычисленные по общему количеству поглощенного O_2 и по найденному количеству лабильного фосфора, не представляют собой действительных величин, так как в процессе инкубации помимо синтеза АТФ происходит и ее распад. Однако, и эти коэффициенты имеют наибольшую величину в пробах с ансерином (табл. 1).

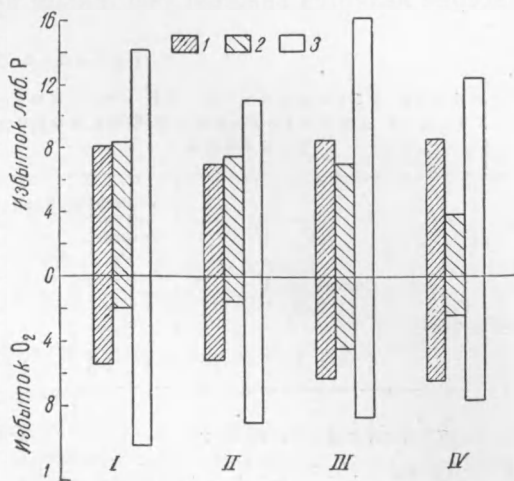


Рис. 4. Избыточное потребление кислорода и образование лабильного фосфата (μ атомы) при добавлении α -кетоглутаровой кислоты и ансерина. I — опыт 12 VI 1953 г. II — опыт 17 VI 1953 г. III — опыт 2 VII 1953 г. IV — опыт 2 VII 1953 г. (ансерина добавлено 5 мг). 1 — с α -кетоглутаровой кислотой (1,5 мг), 2 — с ансерином (10 мг), 3 — с α -кетоглутаровой кислотой и ансерином

В опытах с добавлением карнозина повышение интенсивности фосфорилирования при инкубации без NaF выражено значительно меньше.

Таблица 1

Влияние α -кетоглутаровой кислоты и ансерина на дыхательное фосфорилирование грудной мышцы голубя

№№ проб	Состав проб	Потребл. O_2 , μ атомы	Образов. лаб. P, μ атомы	P/O	Избыток		
					Потребл. O_2 , μ атомы	Образов. лаб. P, μ атомы	P/O
1	Ткань	16,50	9,25	0,56			
2	Ткань + α -кетогл. к-та	21,70	16,20	0,75	5,20	6,95	1,33
3	Ткань + ансерин	18,05	16,75	0,93	1,55	7,50	4,85
4	Ткань + ансер. + α -кетогл. к-та	25,65	20,40	0,80	9,15	11,15	1,22
1a	Ткань	20,10	13,00	0,64			
2a	Ткань + α -кетогл. к-та	25,60	21,40	0,82	5,50	8,40	1,47
3a	Ткань + ансерин	22,10	21,30	0,96	2,00	8,30	4,15
4a	Ткань + ансер. + α -кетогл. к-та	30,50	27,10	0,89	10,40	14,10	1,35

Примечание. Время инкубации 50 мин. Количество ткани 150 мг, α -кетоглутаровой кислоты 1,5 мг, ансерина 10 мг.

Количество образующейся при этом фосфоглицериновой кислоты всегда превышает величины, найденные в контрольных пробах, добавление же ансерина не вызывает большего образования фосфоглицериновой кислоты. При инкубации ткани с NaF добавление карнозина и ансерина приводит к совершенно одинаковому повышению потребления O_2 и образо-

ванию лабильного фосфорного соединения. Эти данные говорят о специфичности влияния ансерина на дыхательное фосфорилирование при инкубации ткани без NaF.

Анализируя полученные результаты, можно прийти к заключению, что ансерин является важным участником процесса дыхательного фосфорилирования

Таблица 2

Влияние ансерина и АК на интенсивность дыхательного фосфорилирования

№№ проб	Состав проб	Количество потребл. O ₂		Количество образов. лабильн. P	
		мм ³	избыток мм ³	цг	избыток цг
Опыт от 18 III 1953 г.					
1	Ткань	345		146	
2	Ткань + ансерин	389	44	202	56
3	Ткань + АК	486	141	235	89
4	Ткань + ансерин + АК	518	173	336	190
Опыт от 23 III 1953 г.					
1а	Ткань	387		154	
2а	Ткань + ансерин	410	23	190	36
3а	Ткань + АК	463	76	247	93
4а	Ткань + ансерин + АК	513	126	276	122

Примечание. Количество ткани 300 мг, ансерина 20 мг, АК 5 мг. Время инкубации 50 мин.

При одновременном добавлении ансерина и кетоглютаровой кислоты наблюдается суммирование величин как избыточного потребления O₂, так и избыточного образования лабильного фосфата, найденных при добавлении каждого из указанных веществ в отдельности (см. рис. 4). Это говорит о том, что ансерин не участвует в первом этапе окислительного фосфорилирования — в реакции собственно окисления субстрата дыхания. Опыты, поставленные с добавлением адениловой кислоты (АК), показали, что избыточное дыхание, а также избыточное фосфорилирование при одновременном добавлении ансерина и АК также практически суммируются (табл. 2).

Эти данные говорят о том, что участие ансерина в процессе дыхательного фосфорилирования не осуществляется и на стадии непосредственного образования АТФ. Следовательно, участие ансерина имеет место на каком-то промежуточном этапе между реакцией непосредственного окисления субстрата и реакцией образования АТФ.

Кроме того на основании полученных данных надо сделать заключение, что исследование дыхательного фосфорилирования нельзя проводить в присутствии NaF, так как последний резко задерживает как потребление тканью O₂, так и накопление лабильного фосфата.

Поступило
31 VII 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ С. Е. Северин, Н. П. Мешкова, ДАН, 84, 105 (1952). ² S. Ochoa, J. Biol. Chem., 151, 493 (1943). ³ В. А. Белицер, Е. Т. Цыбакова, Биохимия, 4, 517 (1939). ⁴ J. L. Webb, P. R. Saunders, C. H. Thienes, Arch. of Biochem., 22, 462 (1949). ⁵ J. H. Copenhaver, H. A. Lardy, J. Biol. Chem., 195, 225 (1951). ⁶ M. Rabinovitz, M. Stulberg, P. Boyer, Science, 114, 641 (1951). ⁷ D. Green, ibid., 115, 661 (1952).