

Н. П. МЕШКОВА и Н. Н. ЗАЙЦЕВА

ВЛИЯНИЕ КАРНОЗИНА И АНСЕРИНА НА ОБРАЗОВАНИЕ
БОГАТЫХ ЭНЕРГИЕЙ ФОСФОРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ
В МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

(Представлено академиком А. Д. Сперанским 31 VII 1953)

Как уже сообщалось, карнозин и ансерин, повышая гликолитическую оксидоредукцию и увеличивая интенсивность дыхательного фосфорилирования, должны принимать участие в образовании аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) ^(1, 2). Однако прямых доказательств влияния этих дипептидов на образование АТФ не было. Задачей настоящей работы являлось показать что большее образование фосфокреатина при инкубации ткани в присутствии карнозина и ансерина зависит от большего образования в этих условиях АТФ, а не от влияния их лишь на реакцию переноса фосфатного остатка АТФ на креатин ^(1, 3). Исследования проводились с измельченной грудной мышцей голубя в фосфатном буферном растворе *. Ряд опытов был поставлен в присутствии фтористого натрия (конечная концентрация 0,015 М) для уменьшения активности аденозинтрифосфатазы. Однако при проведении работы выяснилось, что фтористый натрий резко задерживает дыхание ткани и образование лабильного фосфата, поэтому большая часть опытов была поставлена без добавления фторида. Инкубация проводилась в течение 45—60 мин. при 20°. Ферментативные процессы прекращались осаждением белков трихлоруксусной кислотой. В магнезиальном фильтрате, полученном после осаждения минерального фосфата, кроме лабильного фосфора проводилось определение легко гидролизуемого фосфора АТФ. В части опытов определение АТФ проводилось после осаждения ее из трихлоруксусного фильтрата в виде ртутной соли ⁽⁴⁾. В качестве адениловой системы в пробы добавлялась натриевая соль АТФ или адениловая кислота (АК).

Как показали результаты опытов, добавленная АТФ, даже в присутствии фтористого натрия, в процессе инкубации подвергается расщеплению. Однако в опытных пробах, содержащих карнозин, постоянно обнаруживалась АТФ, даже и в тех случаях, когда она предварительно не добавлялась. Фосфокреатин накапливался только тогда, когда одновременно с креатином ** добавлялся также и карнозин. На рис. 1 приведены результаты одного из опытов этой серии исследований ***.

Из приведенных данных видно, что после инкубации в пробах с карнозином количество АТФ в 3¹/₂ раза больше (0,18 : 0,05), чем в пробах без карнозина, несмотря на предварительное добавление одина-

* Состав буферного раствора: 100 мл 0,9% раствора NaCl, 4 мл 1,15% раствора KCl, 45 мл 0,15 М раствора Na₂HPO₄ и 1 мл 3,82% раствора MgSO₄ · 7H₂O.

** Креатин добавлялся в количестве 10 мг на пробу в 3 мл.

*** Лабильный фосфор не обнаруживался после инкубации ткани: а) во всех вариантах опытов без добавления креатина и б) в 1-м и 3-м вариантах опытов, т. е. без карнозина в присутствии креатина. Легко гидролизуемый фосфор АТФ не обнаруживался после инкубации ткани «без дополнительных добавок» (1-й вариант) как в опытах с добавлением креатина, так и без него.

кового количества АТФ. Следует отметить, что в пробе с карнозином без добавления АТФ количество этого соединения в конце инкубации было больше (0,09), чем в пробе с предварительно добавленной АТФ, но без карнозина (0,05). Эти данные указывают, что добавление карнозина значительно повышает образование АТФ.

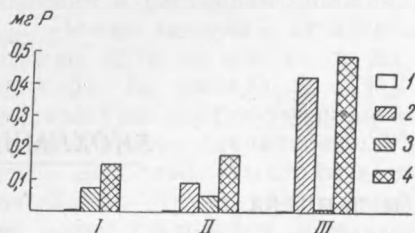


Рис. 1. Влияние карнозина на образование легко гидролизующего фосфора. I — легко гидролизующий фосфор АТФ при инкубации ткани без добавления креатина; II — то же при инкубации с добавлением креатина; III — лабильный фосфор при инкубации ткани с добавлением креатина. 1 — без дополнительных добавок; 2 — при добавлении карнозина; 3 — при добавлении АТФ; 4 — при одновременном добавлении карнозина и АТФ

нии АК и ансерина. При этом величина избытка практически представляет собой сумму избыточно образованного легко гидролизующего фосфата при добавлении одной АК или одного ансерина.

Чтобы исключить возможность влияния карнозина и ансерина на реакцию переноса фосфата с АТФ на креатин, в дальнейшем исследования проводились с добавлением глюкозы в качестве акцептора фосфатных групп АТФ. Опыты ставились с гексокиназой, полученной из дрожжей (5), в фосфатном буферном растворе с добавлением 9 мг глюкозы и 2 мг АК. После окончания инкубации белки осаждались трихлоруксусной кислотой, трихлоруксусный фильтрат подщелачивался едким натром на фенолфталеин и добавлялся уксуснокислый барий (25% раствор) до полноты осаждения. Выпавший осадок нерастворимых бариевых соединений отделялся центрифугированием и в осадке проводилось определение фруктозодифосфата (ФДФ) по цветной реакции фруктозы с резорцином (6). В центрифугате после отделения нерастворимых бариевых соединений проводилось определение гексозомонофосфатов (глюкозо-6-фосфата и фруктозо-6-фосфата) по щелочно-гидролизующему фосфору (7). Результаты отдельных опытов приведены в табл. 1 и на рис. 3.

Как видно из приведенных данных, при добавлении ансерина значительно увеличивается количество образующегося ФДФ. Несколько меньшее количество гексозомонофосфатов в пробе с ансерином может быть объяснено большим образованием в этих условиях ФДФ. Та же закономерность наблюдается и при постановке опытов в присутствии фтористого

Чтобы исключить влияние добавляемой АТФ на образование лабильного фосфата, следующая серия исследований была поставлена с АК, которая добавлялась в количестве 5 мг на пробу в 3 мл. Чтобы увеличить интенсивность дыхательного фосфорилирования, опыты ставились без фтористого натрия. Результаты этой серии исследований приведены на рис. 2.

Как видно из приведенных данных, добавление ансерина приводит к большему образованию легко гидролизующего фосфата. Наибольшее его количество обнаруживается в пробах при одновременном добавле-

Таблица 1

Влияние ансерина на образование ФДФ

Состав проб *	Найдено	
	ФДФ, мг Р	Гексозомонофосфатов, мг Р
Ткань + Гл. + АК . . .	0	0,228
" " " + Гк. . .	0,443	0,770
" " " + ансер.	0,700	0,600

* Гл. — глюкоза, Гк. — гексокиназа.

натрия: добавление ансерина приводит к значительно большему образованию ФДФ; однако в этом случае, вследствие наличия фтористого натрия, интенсивность фосфорилирования значительно снижена (см. рис. 3).

Предварительно был поставлен опыт для выяснения влияния ансерина на гексокиназную реакцию. Опыт ставился следующим образом: к бикарбонатному буферному раствору*, содержащему глюкозу (9 мг) и АТФ (20 мг натриевой соли), добавлялся раствор гексокиназы; в отдельные пробы добавлялся также ансерин. Пробы ставились на инкубацию, после чего в трихлоруксусном фильтрате проводилось определение ФДФ и гексозомонофосфатов, как указано выше. В данной постановке опыта никакого отличия в образовании гексозофосфатов при добавлении ансерина не наблюдалось (табл. 2).

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать заключение, что карнозин и ансерин, повышая интенсивность дыхательного фосфорилирования, приводят к большему образованию окислительным путем АТФ.

Были также поставлены опыты по проверке влияния карнозина на реакцию переноса фосфатного остатка с АТФ на креатин. Опыты ставились с мышечным экстрактом, полученным путем экстракции в течение 30 мин. измельченной мышечной ткани равным объемом 0,9% раствора хлористого натрия. Диализ мышечного экстракта проводился в течение 24—72 час., в одних случаях против воды, в других — против 0,5% раствора хлористого калия. Часть мышечного экстракта не подвергалась диализу и оставлялась при тех же температурных условиях, что и диализированный экстракт. После конца диализа определялось разведение экстракта в процессе диализа и часть экстракта, не подвергавшаяся диализу, разводилась соответствующим образом водой или 0,5% раствором хлористого калия, в зависимости от того, против чего проводился диализ. Опыты ставились как в фосфатном, так и в бикарбонатном буферных растворах, при pH 8,6 одновременно с диализированным экстрактом и экстрактом, не подвергавшимся диализу. Для исключения возможности образования АТФ гликолитическим путем опыты ставились с иодацетатом в конечной его концентрации 0,002 М, а для уменьшения активности аденозинтрифосфатазы добавлялся фтористый натрий в концентрации 0,015 М. Предварительно было установлено, что иодацетат и фтористый натрий не снижают фосфоферазной активности мышечного экстракта. Во все пробы добавлялся креатин из расчета

* Состав бикарбонатного буферного раствора: 90 мл 0,9% раствора NaCl, 4 мл 1,15% раствора KCl, 60 мл 1,3% раствора NaHCO₃ и 1 мл 3,82% раствора MgSO₄ · 7H₂O.

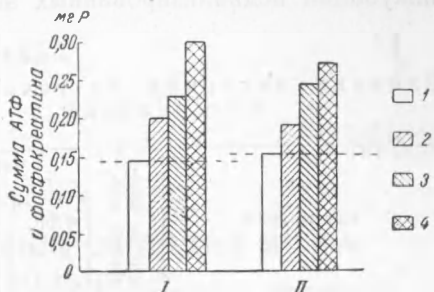


Рис. 2. Влияние ансерина на образование легко гидролизимого фосфора. Навеска ткани 300 мг, инкубация без фтористого натрия. I — опыт 18 III 1953 г.; II — опыт 23 III 1953 г. 1 — без добавок, 2 — с ансеринном; 3 — с АК, 4 — с ансеринном и АК

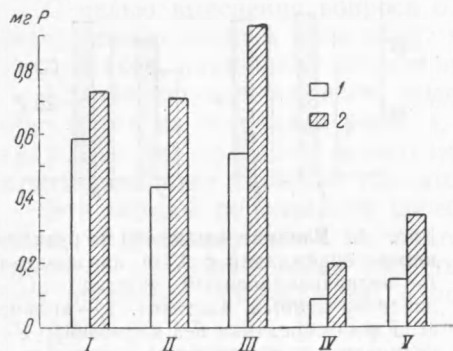


Рис. 3. Влияние ансерина на образование ФДФ. I, II, III — инкубация без фтористого натрия; IV и V — инкубация в присутствии фтористого натрия. 1 — без добавления ансерина, 2 — с добавлением ансерина

против чего проводился диализ. Опыты ставились как в фосфатном, так и в бикарбонатном буферных растворах, при pH 8,6 одновременно с диализированным экстрактом и экстрактом, не подвергавшимся диализу. Для исключения возможности образования АТФ гликолитическим путем опыты ставились с иодацетатом в конечной его концентрации 0,002 М, а для уменьшения активности аденозинтрифосфатазы добавлялся фтористый натрий в концентрации 0,015 М. Предварительно было установлено, что иодацетат и фтористый натрий не снижают фосфоферазной активности мышечного экстракта. Во все пробы добавлялся креатин из расчета

10 мг и АТФ в количестве 10 мг натриевой соли на пробу в 3 мл. Длительность инкубации в отдельных опытах колебалась от 3 до 10 мин. Практически за 3—5 мин. достигается равновесие реакции переэстерификации.

Как было показано рядом опытов, добавление карнозина только при инкубации недиализированных экстрактов сдвигает реакцию в сторону

большого образования фосфокреатина. В диализированных экстрактах, в противоположность данным Р. Я. Юделович⁽³⁾, это влияние карнозина выражено чрезвычайно слабо, а часто и полностью отсутствует (см. рис. 4).

Обращает на себя внимание тот факт, что в диализированных экстрактах переэстерификация идет значительно интенсивнее. Добавление карнозина как бы снимает какое-то тормозящее действие, проявляющееся

Таблица 2
Влияние ансерина на гексокиназную реакцию

Состав проб	Время инкубации, мин.	Найдено	
		ФДФ, мг Р	Гексозо-монофосфатов, мг Р
Глюкоза + Гк. + АТФ	15	Следы	0,200
+ ансер. ".	15	Следы	0,161
Глюкоза + Гк. + АТФ	45	0,066	0,316
+ ансер. ".	45	0,057	0,316

с в недиализированных экстрактах, и приближает интенсивность переэстерификации к интенсивности этого процесса в диализированных экстрактах.

На основании проделанной работы можно сделать следующие выводы:

1. Карнозин и ансерин, добавленные к измельченной ткани грудной мышцы голубя, повышая интенсивность окислительного фосфорилирования, приводят к большему образованию АТФ.

2. В присутствии глюкозы и гексокиназы в качестве акцептирующей системы фосфатных групп АТФ добавление ансерина приводит к повышенному накоплению ФДФ. Накопление в присутствии ансерина ФДФ является результатом большего образования АТФ, так как на гексокиназную реакцию добавление ансерина никакого влияния не оказывает.

3. Карнозин и ансерин заметно влияют на реакцию переэстерификации с АТФ на креатин, повышая образование фосфокреатина, только в недиализированных экстрактах.

За ценные указания и постоянное внимание при проведении данной работы приносим проф. С. Е. Северину глубокую благодарность.

Поступило
29 VII 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. П. Мешкова, Н. А. Малышева, ДАН, 81, 247 (1951). ² С. Е. Северин, Н. П. Мешкова, ДАН, 81, 105 (1952). ³ С. Е. Северин, В. И. Иванов, Н. П. Карузина, Р. Я. Юделович, Биохимия, 13, 158 (1948). ⁴ Н. Е. Саков, Биохимия, 6, 163 (1941). ⁵ L. Berger, M. W. Slein, S. P. Colowick, C. F. Cori, J. Gen. Physiol., 23, 379 (1946). ⁶ Н. П. Мешкова, С. Е. Северин, Практикум по биохимии животных, 1950. ⁷ R. Robinson, M. G. MacFarlane, E. In Vamann, K. Mirbäck, Methoden der Fermentforschung, 1, 1944, S. 310.

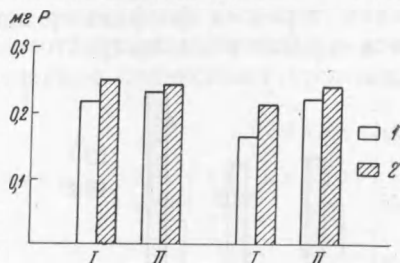


Рис. 4. Влияние карнозина на реакцию переэстерификации с АТФ на креатин. I — недиализированный экстракт; II — диализированный экстракт. I — количество фосфокреатина без карнозина; 2 — количество фосфокреатина с карнозином