

Н. А. ЮДАЕВ

**СОДЕРЖАНИЕ β -АЛАНИНА В МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ КРОЛИКОВ
В РАЗЛИЧНЫЕ СТАДИИ ОНТОГЕНЕЗА И В МЫШЦАХ
НЕКОТОРЫХ РЫБ**

(Представлено академиком Л. А. Орбели 1 II 1950)

Карнозин и ансерин появляются в мышечной ткани, как это ранее было показано нами, в различные периоды индивидуального развития организма (1). Раньше появляющийся карнозин достигает сравнительно больших количеств в молодом возрасте и уменьшается до следов у взрослого животного (грачи). Это уменьшение карнозина совпадает по времени с быстрым нарастанием другого дипептида — ансерина. Поскольку эти два соединения различаются между собою лишь метильной группой, легко допустить, что столь быстрое нарастание ансерина является результатом метилирования карнозина. Относительно путей и места образования самого карнозина никаких экспериментальных данных в литературе нет. Упомянутые дипептиды являются специфическими веществами мышц, поэтому естественно допустить, что и образуются эти вещества в мышечной ткани. Это кажется тем более вероятным, что ферменты паренхиматозных органов расщепляют карнозин на его компоненты (2, 3). Кроме того, если бы карнозин образовывался в других органах (как это доказано для креатина), он должен был бы транспортироваться кровью к мышечной ткани и обнаруживаться в составе крови. Однако литературные данные противоречат этому (4, 5).

До сих пор попытки открыть карнозин в крови проводились с помощью далеко не совершенных методов, поэтому мы сочли целесообразным их повторить, используя для этого хроматографический метод определения карнозина и ансерина (6). Избрав в качестве объекта исследования кролика, мы подтвердили литературные данные об отсутствии этих веществ в крови (предел чувствительности 1 μ г на 1 мл крови). Все вышесказанное подтверждает заключение, что карнозин и ансерин образуются в мышечной ткани; поэтому изучение в ней свободных аминокислот в различные периоды онтогенеза должно указать возможные пути синтеза этих дипептидов.

Исследованию подвергались эмбрионы кролика (23 дней), не содержащие карнозина, новорожденные кролики (3 дня), содержащие карнозин, но не содержащие ансерина, и, наконец, взрослые животные, для мышц которых характерно присутствие обоих интересующих нас веществ. Из мышц готовились трихлоруксусные экстракты, спиртовые (5:1) или водные, которые после упаривания обрабатывались пятикратным объемом этилового спирта. Определение аминокислот проводилось с помощью метода распределительной хроматографии на бумаге (7).

Полученные результаты иллюстрируются фотографией хроматограммы (см. рис. 1), наглядно показывающей изменение аминокислот в онтогенезе. Эти изменения сводятся к следующему: 1) резко уменьшается количество глутаминовой кислоты (ряд I); 2) отчетливо выражено умень-

шение аминокислот, обозначенных цифрой II (главным образом, глицин и еще какие-то, нами ближе не изученные аминокислоты); 3) заметно уменьшается количество α -аланина (ряд III); 4) особенно важным является исчезновение из мышц взрослого кролика β -аланина (ряд IV), содержащегося в заметных количествах (около 20 мг%) в мышцах эмбрионов и молодых кроликов. Идентификация β -аланина основывалась на



Рис. 1. 1 — эмбрионы кролика 23 дней, 2 — молодой кролик 3 дней, 3 — молодой кролик 5 дней, 4 — взрослый кролик. Во всех 4 случаях наносился спиртовый экстракт из мышц в количестве, соответствующем 20 мг ткани. 5 — аминокислоты: II — глицин, III — α -аланин, IV — β -аланин; 6 — экстракт из мышц 5-дневного кролика + 8 μ г глутаминовой кислоты (I), 7 — то же без глутаминовой кислоты

β -аланин не содержится в заметных количествах в мышечной ткани* (^{8, 9}), мы сочли нужным привести дополнительные доказательства в пользу идентичности обнаруженной аминокислоты и β -аланина. С этой целью мы отделили β -аланин от других аминокислот, содержащихся в мышечном экстракте, и подвергли его хроматографическому изучению в относительно чистом виде. Для выделения β -аланина мы воспользовались

нескольких признаках этой аминокислоты: а) β -аланин дает с нингидрином на хроматограмме пятна с характерной синеватой окраской; б) эти пятна при использовании в качестве растворителя фенола занимают на хроматограмме положение над пятнами α -аланина; в) в присутствии высокой концентрации паров HCl β -аланин меняет свое положение на хроматограмме, располагаясь несколько ниже α -аланина; г) при разделении в пиколине β -аланин резко меняет свое положение, располагаясь непосредственно над глицином; д) β -аланин слабее других аминокислот реагирует с нингидрином, поэтому, если обработать хроматограмму этим реактивом и оставить при комнатной температуре, то через 3—4 часа проявятся α -аминокислоты, тогда как стандарт β -аланина и аминокислота, принимаемая нами за β -аланин, проявляются при нагревании.

Так как в настоящее время принято считать, что свободный

* Нам известно одно исследование (¹⁰), в котором сообщается о содержании значительных количеств β -аланина в мышечной ткани угря.

следующим простым приемом: на лист фильтровальной бумаги 30×50 см, по широкой его стороне с интервалом в 1,5 см наносился фильтрат по 3—4 капли (капля соответствовала 5 μ л) в каждую точку. Из бумаги делался цилиндр и опускался в сосуд с фенолом. После разделения и проявления двух крайних и одной средней точек вырезалась полоса бумаги на уровне, соответствующем β -аланину. Бумага экстрагировалась 5—6 раз горячей дистиллированной водой. Фильтрат упаривался и подвергался изучению. Полученные результаты демонстрируются приведенной фотографией хроматограммы (см. рис. 2). Выделенная аминокислота хроматографировалась после разделения в феноле, насыщенном хлористым натрием* (I), в феноле в присутствии соляной кислоты (II) и в α -пиколине, насыщенном хлористым натрием (III). Во всех трех случаях обнаруженная нами аминокислота вела себя совершенно аналогично стандарту β -аланина. Что касается второй составной части карнозина, т. е. гистидина, то нам не удалось его обнаружить в заметных количествах; очевидно, содержание этой аминокислоты не превышает нескольких мг%.

Доказав таким образом наличие

значительных количеств β -аланина в мышцах эмбрионов и молодых кроликов, мы подвергли изучению экстрактивные вещества мышц рыб, имея в виду филогенетическую древность и многообразие форм этого класса. Проведенные исследования показали, что β -аланин присутствует в весьма больших количествах в мышцах представителей тресковых, хрящевых ганоидов и некоторых других отрядов. Подробнее другие исследована стерлядь, для мышц которой характерны колебания в содержании β -аланина от 73 до 100 мг%.

Приведенная фотография хроматограммы экстракта из мышц стерляди (см. рис. 3, 4) показывает, что β -аланин представлен в количестве значительно большем, чем любая из свободных аминокислот, входящих

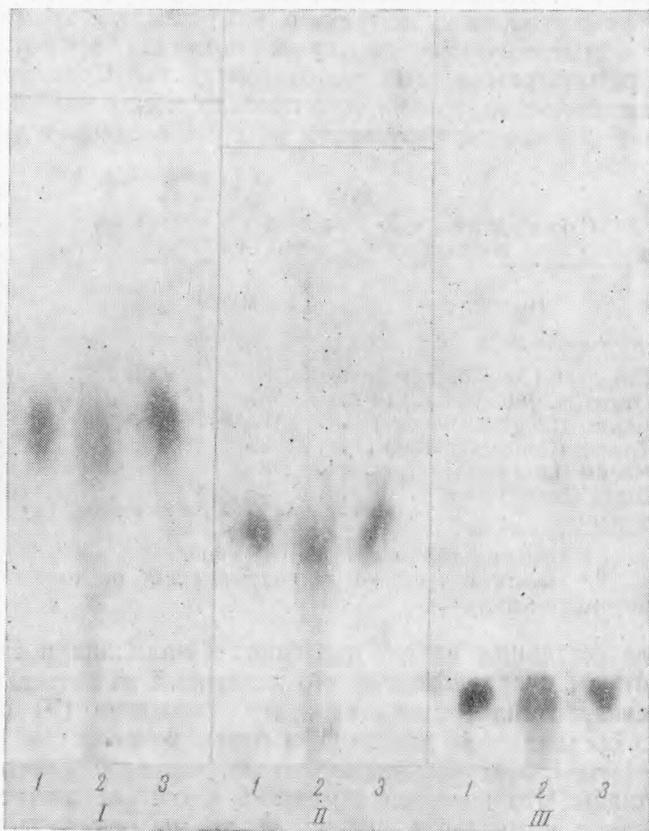


Рис. 2. 1 и 3 — β -аланин по 8 μ г, 2 — водный экстракт из участка хроматограммы, соответствующего месту расположения β -аланина. I — в феноле, II — в феноле в присутствии HCl, III — в α -пиколине

* Указанный фильтрат из бумаги был, повидимому, загрязнен солями, и, чтобы устранить их влияние на скорость движения аминокислоты, растворители насыщались солевыми растворами.

в состав мышц этой рыбы. На той же фотографии представлена хроматограмма экстракта из печени стерляди (рис. 3, 3). Ткань печени не содержит карнозина и, как видно из хроматограммы, β -аланин или вовсе отсутствует в ней, или его количества столь ничтожны, что при данных условиях опыта лежат за пределами чувствительности метода. Следовательно, большие количества β -аланина, подобно карнозину, свойственны мышечной ткани, которая в этих случаях не содержит свободного гистидина. При наличии гистидина в мышечной ткани в ней нет β -аланина (11). Желая выяснить, не образуется ли β -аланин в процессе получения мышечных экстрактов, мы подвергли хроматографическому анализу мышечную сыворотку и получили хроматограмму, аналогичную хроматограмме мышечного экстракта. Сравнивая пятна β -аланина с пятнами-стандартами, мы провели несколько количественных определений β -аланина, результаты которых сведены в табл. 1.

Таблица 1

Содержание β -аланина в мышцах некоторых рыб (в мг %)

Название рыб	β -аланин	Наличие дипептидов
Стерлядь (<i>Acipenser ruthenus</i>)	84*	Карнозин
Осетр (<i>A. güldenstädti</i>) (6 мес.)	37	"
Навага (<i>Eleginus navaga</i>) . .	175**	Ансерин
Треска (<i>Gadus callarias</i>) . . .	20**	"
Налим (<i>Lota lota</i>)	25	"
Щука (<i>Esox lucius</i>)	25	"

* Средняя величина из 5 образцов.

** Навага и треска были получены для опыта в мороженом виде.

де составных частей карнозина (β -аланина и гистидина) делает вероятным предположение, что названный дипептид возник не в результате декарбоксилирования аспарагил-гистидина (12), существование которого в организме не доказано, а путем конденсации β -аланина и гистидина. Местом образования карнозина, вероятнее всего, является мышечная ткань. Что касается изменений в составе азотистых экстрактивных веществ в мышце в онтогенезе, то мы отмечаем уменьшение свободных аминокислот* с одновременным появлением и нарастанием специфических для мышц дипептидов — карнозина и ансерина.

Приношу глубокую благодарность проф. С. Е. Северину за постоянное внимание и ценные советы в работе.

Академия медицинских наук СССР

Поступило
27 I 1950

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ С. Е. Северин и Н. А. Юдаев, ДАН, 68, 353 (1949). ² С. Е. Северин и Е. Ф. Георгиевская, Биохимия, 3, 148 (1938). ³ П. Г. Гаркави, Биохимия, 3, 133 (1938). ⁴ В. С. Гулевич, ЖРФХО, 58, 610 (1926). ⁵ А. Н. Паршин, Биохимия, 4, 555 (1939). ⁶ Н. А. Юдаев, ДАН, 68, 119 (1949). ⁷ R. Williams and H. Kirby, Science, 107, 481 (1948). ⁸ А. Е. Браунштейн, Биохимия аминокислотного обмена (1949). ⁹ N. Nielsen, V. Hartelius u. V. Schmidt, Naturwissensch., 31, 55 (1943). ¹⁰ N. Nielsen, V. Hartelius et G. Johansen, C. R. trav. lab. Carlsberg, sér. phys., 24, 97 (1944). ¹¹ Н. А. Юдаев, ДАН, 70, № 2 (1950). ¹² В. С. Гулевич, Zs. physiol. Chem., 73, 434 (1911). ¹³ G. Buglia u. A. Costantino, ibid., 81, 155 (1912).

* Еще в 1912 г. (13) было показано, что количество свободных аминокислот в онтогенезе убывает при расчете на сухой вес ткани и остается неизменным при расчете на влажную ткань. Однако авторы не учитывали происходящее при этом нарастание дипептидов, которые титровались подобно аминокислотам и маскировали убыль последних.

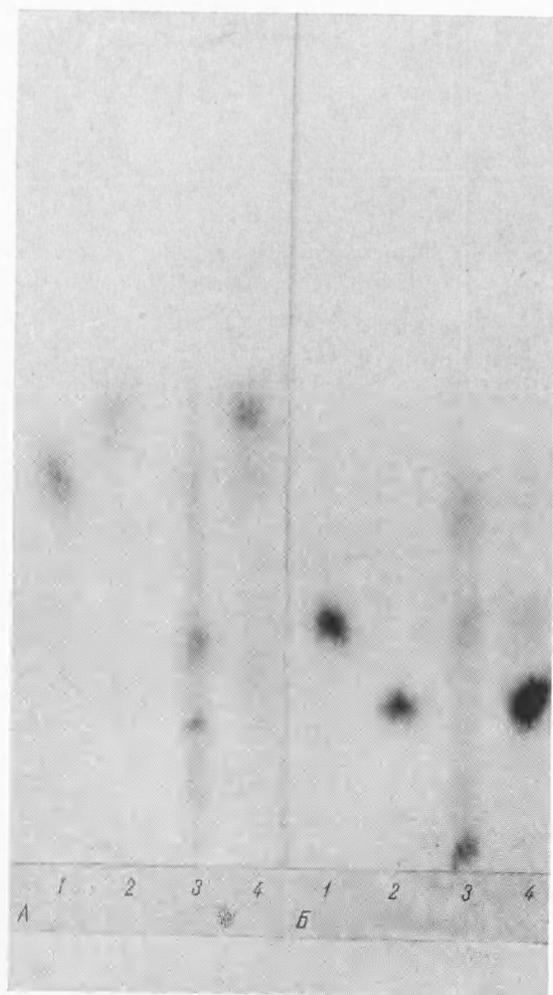


Рис. 3. 1 — α -аланин 8 μ г, 2 — β -аланин 8 μ г, 3 — экстракт из печени стерляди в количестве, соответствующем 8 мг сырой ткани, 4 — то же из мышцы стерляди, А — в феноле, Б — в α -пикколине