

Действительный член Академии медицинских наук СССР С. Е. СЕВЕРИН
и В. Н. ФЕДОРОВА

СОДЕРЖАНИЕ КАРНОЗИНА, АНСЕРИНА, ГИСТИДИНА И β -АЛАНИНА В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ КУР В ПЕРИОД ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

В ряде работ (1-6) было показано, что карнозин и ансерин не являются первичными составными частями мышечной ткани. Их появление в онтогенезе совпадает, повидимому, со временем формирования мышечной функции (1, 3). Более позднее появление ансерина по сравнению с карнозином в составе мышц кроликов позволяет предполагать, что ансерин характеризует более высокую степень развития мышц.

Предшественником карнозина и ансерина в мышцах кроликов можно считать β -аланин. Количество этой аминокислоты, значительное в первые дни жизни кроликов, заметно падает к 5—6-му дню после рождения и практически отсутствует в мышцах взрослых кроликов. Время отчетливо выраженной убыли β -аланина совпадает с периодом продолжающегося нарастания карнозина и появления в составе мышц кроликов ансерина. Введение гистидина в мышцу только что родившегося кролика приводит к уменьшению содержания β -аланина и увеличению количества карнозина (2, 3). Данные этих опытов позволили Н. А. Юдаеву высказать предположение о биосинтезе карнозина в мышцах из β -аланина и гистидина (3).

Задачей настоящей работы являлось исследование времени и последовательности появления, а также количественного содержания карнозина, ансерина, гистидина и β -аланина в составе мышц цыплят в процессе их эмбрионального развития.

Определение карнозина, ансерина, гистидина и β -аланина велось с помощью метода восходящей распределительной хроматографии на бумаге (2, 6, 8-10). Хроматографический метод был использован нами как чувствительный и достаточно специфический метод для определения аминокислот и дипептидов, позволяющий пользоваться небольшими количествами исследуемого материала.

Для работы брались ножные мышцы, полученные от 5 и более (до 30) эмбрионов, в зависимости от их возраста. Часть измельченных на холоду мышц экстрагировалась 5 объемами 3% трихлоруксусной кислоты в течение 15 мин. Затем белки отделялись центрифугированием, а центрифугат использовался для хроматографических определений.

Другая часть экстрагировалась 2 объемами воды 2 раза по 1 часу при температуре 50—60°. Частишки ткани отделялись центрифугированием. Центрифугаты сливались вместе, реакция среды добавлением серной или соляной кислоты доводилась до pH 5; затем белки свертывались кипячением в течение 3—5 мин. После удаления осадка белка в полученном центрифугате осаждался гликоген добавлением равного

объема 96% этилового спирта. Далее определение проводилось двумя способами.

При первом способе после удаления гликогена и спирта карнозин и гистидин осаждались ртутным реактивом (10% раствор HgSO_4 в 5% растворе H_2SO_4). Если осадок не выпадал, добавлялось небольшое количество этилового спирта. Через 12—20 час. осадок отделялся, промылся смесью воды и ртутного реактива в отношении 2:1. Затем осадок разлагался H_2S в течение 1 часа. При пропускании сероводорода добавлялся $\text{Ba}(\text{OH})_2$ в таком количестве, чтобы реакция среды все время оставалась слабо кислой и чтобы образующийся осадок сернистой ртути состоял из более крупных частиц. Осадок HgS отфильтровывался, а фильтрат освобождался от сероводорода нагреванием на водяной бане. Оставшиеся в фильтрате ионы SO_4 удалялись добавлением $\text{Ba}(\text{OH})_2$; осадок BaSO_4 отфильтровывался, а фильтрат упаривался до объема, соответствовавшего обычно содержанию 4 г мышечной ткани в 1 мл. В этом растворе проводилось определение карнозина и гистидина.

Для определения ансерина использовался второй способ. Фильтрат после удаления гликогена обрабатывался ртутным реактивом в присутствии 5-кратного объема этилового или метилового спирта. Далее обработка велась так же, как и в первом случае.

Карнозин и гистидин более успешно определялись при первом способе обработки, так как большое количество органических веществ, осаждающихся ртутным реактивом в присутствии спирта, несколько меняло их распределение на фильтровальной бумаге и, кроме того, они давали расплывчатые пятна при хроматографировании.

Для хроматографии использовалась ватманская бумага №№ 1 и 2. В качестве растворителей служили: фенол, насыщенный водой с добавкой 2—3 капель концентрированного аммиака, фенол в присутствии паров соляной кислоты (соляная кислота бралась в концентрации 3:1) и пиридин в соотношении 3 части пиридина и 2 части воды.

При постановке хроматограмм с использованием трихлоруксусного фильтрата трихлоруксусная кислота удалялась нагреванием до 105—110°. Для этого бумагу, на которой уже были нанесены капли трихлоруксусного фильтрата, помещали в сушильный шкаф при температуре 105—110° на 30—40 мин.

Для определения карнозина и гистидина использовалось проявление хроматограмм с помощью диазореакции (¹¹, ¹²). Диазореактив применялся в концентрации, употребляемой для колориметрического определения гистидина. Для освобождения бумаги от фенола, который мешает диазореакции, применялась экстракция хроматограмм ацетоном в аппарате Сокслета. Экстрагированная таким образом и высушенная хроматограмма обрабатывалась диазореактивом; при наличии карнозина или гистидина немедленно появлялись оранжево-красные пятна на желтом фоне. Нингидрин не мешает этой реакции. Пользуясь диазореакцией, удается определять очень малые количества гистидина и карнозина и количественно их учитывать. Чувствительность этого метода составляет около 0,4 γ карнозина в нанесенной на бумагу пробе.

Количественные определения производились путем сравнения интенсивности окраски набора пятен стандартов с пятнами исследуемого раствора. Ошибка при этом не превышала 10%. Такое определение можно проводить после обработки как диазореактивом, так и нингидрином.

Ансерин определялся с помощью 2-ступенчатой хроматографии. Принцип этого метода таков: исследуемый раствор хроматографируется в одном растворителе, в котором он занимает одно из самых верхних положений, затем нижняя часть бумаги отрезается, а верхняя помещается после высушивания в другой растворитель, причем движение продолжается в том же направлении, что и раньше. В феноле в присутствии HCl ансерин занимает верхнее положение, но его определению мешают

метионин и некоторые другие аминокислоты. В пиридине же эти аминокислоты занимают опять верхнее положение, а ансерин располагается значительно ниже. Димерная хроматография не применялась ввиду того, что в данном случае она для количественного определения неудобна, так как стандарт и исследуемое вещество проходят различные пути. Проявление ансерина проводилось 0,2% раствором нингидрина (6).

Реакция нингидрина с β -аланином менее чувствительна, чем с рядом других аминокислот. Так как и содержание β -аланина в мышцах цыплят незначительно, то определения этой аминокислоты проводились следующим образом: капли исследуемого раствора хроматографировались в пиридине, затем участок хроматограммы, соответствующий расположению β -аланина, вырезался и экстрагировался водой. Полученный после экстракции бумаги раствор выпаривался до небольшого объема и исследовался хроматографически в феноле в присутствии HCl.

В результате работы было найдено, что карнозин, не обнаруживавшийся на 13-й день развития, появляется на 14-й день, а ансерин, который не удавалось определить на 16-й день, можно было установить в заметных количествах на 17-й день эмбрионального развития цыпленка. Гистидин содержится в мышцах уже на ранних стадиях. Нами он был определен на 10-й день в количествах, соответствующих 2 мг% влажного веса мышц. β -аланин был определен во все исследованные сроки, начиная с 10-го дня до дня вывода, в количествах около 1—2 мг% на влажный вес мышц. Данные о дальнейших изменениях в содержании исследованных аминокислот и дипептидов в мышцах цыплят в процессе эмбрионального развития приведены в табл. 1 и на рис. 1.

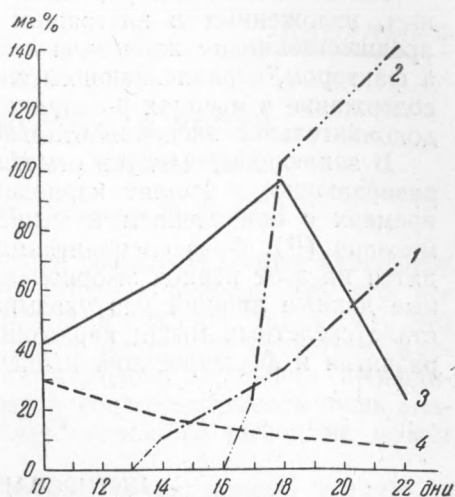


Рис. 1. Содержание карнозина (1), ансерина (2), гистидина (3) и β -аланина (4) в мг% на сухой вес ткани в скелетной мускулатуре в различные периоды эмбрионального развития кур

Таблица 1

Содержание карнозина, ансерина, гистидина и β -аланина в мг% на влажный (I) и сухой (II) вес мышц в различные периоды эмбрионального развития цыплят

Вещество	Дни инкубации								День вывода	
	10		14		17		18		I	II
	I	II	I	II	I	II	I	II		
β -аланин . . .	1,5—2	21—28,5	1,5—2	14—18	—	—	1,5—2	9—11	1—1,5	5—7
Гистидин . . .	3	42	6—7	55—64	—	—	17	97	5	24
Карнозин . . .	нет	—	0,2—1	1,8—9,1	—	—	6	34	15	71
Ансерин . . .	"	—	нет	—	3,5	22,5	18	103	30	142
Сухой остаток (в %)	7,1	100	10,9	100	15,5	100	17,6	100	21,1	100

Гистидин и β -аланин, как это видно из таблицы и рисунка, обнаруживаются в мышцах до появления карнозина и ансерина. Далее количество свободного гистидина сильно возрастает (14—18-й день), количество же свободного β -аланина остается незначительным*. Ко дню вывода содержание гистидина заметно падает. В это время количества карнозина и ансерина быстро нарастают.

На основании цитированных выше работ и экспериментальных данных, изложенных в настоящем сообщении, можно предположить, что предшественником карнозина в мышечной ткани кур является гистидин, а фактором, ограничивающим синтез карнозина, является недостаточное содержание в мышцах β -аланина. Последнее положение требует, однако, дополнительной экспериментальной проверки и подтверждения.

В заключение следует отметить, что быстрое накопление в мышцах развивающихся цыплят карнозина и особенно ансерина совпадает во времени с накоплением в мышцах сократительных белков — актина и миозина (13). Фаза специализации рефлекторных реакций также приходится на этот период эмбрионального развития цыплят (14). Приведенные данные лишней раз указывают на связь между появлением в составе скелетных мышц карнозина и ансерина и другими показателями развития и формирования мышечной функции.

Поступило
28 XI 1951

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ С. Е. Северин и Н. А. Юдаев, ДАН, 68, 353 (1949). ² Н. А. Юдаев, ДАН, 71, 717 (1950). ³ Н. А. Юдаев, Усп. совр. биол., 30, 176 (1950). ⁴ В. Н. Тюнина, ДАН, 72, 1095 (1950). ⁵ А. Н. Паршин и Т. А. Горюхина, ДАН, 73, 531 (1950). ⁶ Н. А. Юдаев, ДАН, 68, 119 (1949). ⁷ R. Connsden, A. H. Gordon and A. I. P. Martin, Biochem. Journ., 38, 224 (1944). ⁸ Хроматография, Сборн. № 1, 1949, стр. 1—25, 135—158. ⁹ Н. А. Фукс, Усп. хим., 17, 45 (1948). ¹⁰ В. В. Рачинский, там же, 19, 445 (1950). ¹¹ Н. П. Мешкова, Физиол. журн. СССР, 20, 896 (1936). ¹² S. E. Dent, Biochem. Journ., 43, 169 (1948). ¹³ Б. С. Касавина, Диссертация, АМН СССР, 1951. ¹⁴ А. А. Волохов, Закономерности онтогенеза нервной деятельности в свете эволюционного учения, изд. АН СССР, 1951, гл. IV.

* При пересчете на сухой вес мышц количество β -аланина в процессе эмбрионального развития уменьшается.