

УДК 577.117/597.4

СОДЕРЖАНИЕ КАРНОЗИНА В МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ ОСЕТРОВЫХ И ИХ ГИБРИДОВ

© 2020 г. М. В. Михайлова¹, В. Н. Прозоровский¹, К. В. Золотарёв¹*,
О. М. Ипатова¹, А. Н. Михайлов¹, Е. Н. Харенко², А. В. Артёмов²

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, 119121 Россия

²Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии, Москва, 107140 Россия

*e-mail: fireaxe@mail.ru

Поступила в редакцию 20.11.2019 г.

После доработки 16.12.2019 г.

Принята к публикации 23.12.2019 г.

В работе описан и апробирован новый чувствительный метод масс-спектрометрического определения карнозина в мышечной ткани рыб, с помощью которого впервые получены значения содержания карнозина в мышцах нескольких видов рыб семейства осетровые: русский осетр, сибирский осётр, стерлядь, а также гибридов стерляди и калуги, сибирского осетра и калуги. Гибриды стерляди и калуги, вне зависимости от пола, содержали в 3.33 раза больше карнозина ($p < 0.01$), чем стерлядь. Ткани самок гибрида сибирского осетра и калуги содержали в 1.50 раза меньше карнозина ($p < 0.1$), чем самки сибирского осетра. Поскольку потребление карнозина важно для биосинтеза собственного карнозина в мышцах человека, то по пищевой ценности гибридизация стерляди с калугой целесообразно по сравнению с исходными видами, а скрещивание сибирского осетра с калугой менее эффективно. Измерение содержания карнозина в мышечной ткани важно для оценки их пищевой ценности.

Ключевые слова: карнозин, метод определения, русский осетр, сибирский осетр, стерлядь, калуга, гибриды осетровых

DOI: 10.31857/S0555109920030083

Карнозин (β -аланил-L-гистидин) – дипептид, состоящий из аминокислот β -аланина и гистидина, соединенных пептидной связью, вместе с производными (анзерин, баленин, гомокарнозин) образует семейство дипептидов, выполняющих одинаковые функции и представленных в скелетных мышцах и нервной системе позвоночных. Содержание данных дипептидов в других тканях пренебрежимо мало [1, 2]. В мышечной ткани основная роль карнозина и его аналогов – поддержание рН внутри клеток (буферная функция), что особенно важно при интенсивной мышечной работе, приводящей в условиях недостатка кислорода к накоплению молочной кислоты и закислению среды. Кроме буферного действия, карнозин и его аналоги являются антиоксидантами (защищают мышечную ткань при окислительном стрессе) прямого и косвенного действия. Прямое действие состоит во взаимодействии с биологическими окислителями в качестве восстановителя, косвенное – в предотвращении протонирования иона O_2^- с образованием ОН-радикала (сильный окислитель) за счет буферного свойства дипептида. Карнозин также способен связывать ионы тяжелых металлов за счет образо-

вания донорно-акцепторных связей, продукты перекисного окисления липидов, является источником гистидина (предшественника гистамина). В нервной ткани карнозин является частью защитного механизма от некроза, вызываемого гомоцистеиновой кислотой [3].

Для большинства пептидаз карнозин, благодаря тому, что включает в себя остаток β -аминокислоты, недоступен. Разложение карнозина, поступающего с пищей, происходит в печени и крови, а также внутри клеток с помощью специальных ферментов – карнозинов [3]. В клетках мышечной и нервной ткани происходит биосинтез карнозина из продуктов его разложения. Таким образом, основной источник карнозина в организме – карнозин, поступающий с пищей. Изучение свойств карнозина показало, что он полезен в качестве компонента пищевого рациона, а его содержание в мясных и рыбных продуктах может характеризовать их пищевую ценность. Данные о содержании карнозина в мышечной ткани представляют научную и практическую значимость при разработке продукции функционального и специализированного назначения.

В настоящее время в мировой литературе накоплены данные по значительному количеству видов рыб [1, 2]. Однако, что касается осетровых (*Acipenseridae*), то в литературе есть только устаревшие данные о содержании карнозина в мышцах осетра без указания конкретного вида рыбы и методики определения [4].

Цель работы – получение новых данных о содержании карнозина в мышцах рыб различных видов семейства осетровых и их гибридов.

МЕТОДИКА

В данной работе исследовали следующие виды семейства осетровые: русский осетр (*Acipenser gueldenstaedtii*), сибирский осётр ленокской популяции (*Acipenser baerii*), стерлядь (*Acipenser ruthenus*), а также полученных в искусственных условиях гибриды стерляди и калуги (*Huso dauricus*) (обозначение Ст × К), гибрида сибирского осетра ленокской популяции и калуги (ЛО × К).

Все особи исследуемых видов и гибридов выращивались в садках в естественном водоеме (Вологодская обл., р. Суда, Россия). Образцы мышечной ткани отбирали на анализ в июле. Для получения гибридов использовали икру половозрелых самок стерляди и сперму калуги, икру самок сибирского осетра и сперму калуги. Икру получали путем подрезания яйцеводов с сохранением жизни производителям. Оплодотворение проводили полусухим способом. После обесклеивания икру инкубировали в специализированных аппаратах. Молодь подращивали в стандартных пластиковых бассейнах. Подрощенную рыбу пересаживали в садки для дальнейшего выращивания.

Для анализа отбирали взрослых здоровых особей в количестве по 5 самцов и самок каждого исследуемого вида и гибрида. После изъятия рыбы из воды ее подвергали анестезии на льду. Образцы мышечной ткани (~1.0 г) отбирали со спинной и хвостовой части рыбы, замораживали до температуры -18°C и хранили в замороженном виде вплоть до определения карнозина.

Для анализа взвешивали 0.1 г замороженной ткани от каждого образца, помещали в микропробирку (эппендорф), заливали для экстракции 1.0 мл 0.1%-ного водного раствора муравьиной кислоты. Пробирки закрывали и помещали в водяную баню в пластиковом стакане для гомогенизации ультразвуком в гомогенизаторе “Bandelin Sonopuls HD 2200” (“Bandelin Electronic” GmbH & Co. KG, Германия) при мощности 95% в течение 10 мин. Из полученных гомогенатов отбирали по 0.1 мл и добавляли по 0.9 мл метанола, интенсивно встряхивали в течение 1 мин для осаждения белков, затем центрифугировали 10 мин при 6600 g. Отбирали по 0.1 мл надосадочной жидко-

сти и добавляли по 0.9 мл 0.1%-ного водного раствора муравьиной кислоты.

Определение содержания карнозина проводили на жидкостном хроматографе “Agilent 6130” (Agilent Technologies, США) с квадрупольным масс-спектрометрическим детектором. Для этого на колонку (неподвижная фаза – радикал C_{18} с полярной функциональной группой) вводилось по 10 мкл образца. Хроматографическое разделение образцов выполняли в изократическом режиме: подвижная фаза – раствор 10%-ного ацетонитрила и 0.09%-ной муравьиной кислоты в воде. Скорость элюирования 0.5 мл/мин. Карнозину соответствовал пик с отношением массы к заряду 227.3 в положительном режиме ионизации. Калибровку проводили, используя растворы карнозина с концентрацией в интервале 0.2–4.0 мг/л, содержащие 0.1% муравьиной кислоты.

Статистическую обработку полученных данных: вычисление среднего арифметического, среднеквадратичного отклонения, уровня значимости по распределению Стьюдента проводили с помощью программы Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение использованного метода определения карнозина (см. раздел Методика) с описанными ранее в литературе по интервалам концентраций карнозина, в которых наблюдалась хорошая линейность зависимости интенсивности сигнала от концентрации, показало, что метод наиболее чувствителен среди использующих масс-спектрометрический детектор и один из наиболее чувствительных методов среди описанных (табл. 1).

Хроматографические системы с масс-спектрометрическим детектором наиболее распространены в современной аналитической химии. Популярность данного типа систем вызвана несколькими факторами: прежде всего, многозадачность аппаратуры (любое соединение имеет массу и может ими определяться), а также относительно невысокая стоимость. В любой лаборатории хроматографическая система устанавливается не только для определения карнозина; параллельно с ним можно определять, например, аминокислоты и другие пептиды в рамках одного измерения. В связи с этим мы считаем целесообразным как сравнение данного метода с другими, где использовался масс-спектрометрический детектор, так и со всеми остальными.

Карнозин – гидрофильное соединение, поэтому в ряде опубликованных методов проводилась его дериватизация – химическая модификация вещества с целью удлинения углеродного скелета и увеличения гидрофобности, обеспечивающее большее сродство с материалами носителей или сорбентов хроматографических колонок с высокой разде-

Таблица 1. Сравнение методов определения карнозина в тканях рыб с использованием жидкостной хроматографии, опубликованных ранее и использованных в работе

Тип детектора	Пределы линейности сигнала, мг/л	Реактив для дериватизации	Источник
Масс-спектрометрический УФ(диодная матрица)	0.2–4.0 32.4–388.0	Нет 2,5-диметил-1-Н-пиррол-3,4-дикарбальдегид	Данная статья [6]
УФ	10–100	Нет	[7]
УФ (диодная матрица)	14–24	2,4-Динитрофторбензол	[8]
УФ (диодная матрица)	0.007–3.12	Дансилхлорид	[9]
УФ (диодная матрица)	30–110	2,4-Динитрофторбензол	[10]
Масс-спектрометрический	1–200	Нет	[11]
УФ	9.8–98	Нет	[12]
УФ (диодная матрица)	13–416	Нет	[13]
Масс-спектрометрический	2.3–56.5	Дабсилхлорид	[14]
Импульсный амперометрический	0.023–22.6	Нет	[15]

Таблица 2. Содержание карнозина в мышечной ткани осетровых и их гибридов*

Объект	Пол	Содержание карнозина, мг/г ткани	Источник
Гибрид Ст × К	♂	1.716 ± 0.305	Данная статья
Гибрид Ст × К	♀	1.416 ± 0.224	
Гибрид Ст × К (среднее по всем особям)	Смесь	1.566 ± 0.290	
Стерлядь	Смесь	0.470 ± 0.103	
Гибрид ЛО × К	♂	2.358 ± 0.359	
Гибрид ЛО × К	♀	1.454 ± 0.282	
Сибирский осетр	♀	2.176 ± 0.185	
Русский осетр	♀	2.012 ± 0.251	
Гибрид К × Ст	Нет данных	1.56	[5]
Осетр (без уточнения вида)	Нет данных	2.50	[4]

* Результаты представлены как среднее арифметическое ± среднеквадратичное отклонение.

лительной способностью. В работе использовали колонку с полярной функциональной группой, что позволяло исключить дериватизацию и упростить метод. Кроме того использование такого носителя даёт возможность одновременно измерять концентрации и других соединений сходного строения в образце, например, других дипептидов и свободных аминокислот.

Результаты определения содержания карнозина в исследуемых образцах приведены в табл. 2. Статистическая обработка данных дает возможность сделать следующие заключения.

– Не обнаружено значимых различий по содержанию карнозина в мышцах особей гибрида стерляди и калуги разного пола (интервалы значений перекрываются). Для сравнения со стерля-

дью было целесообразно использовать среднее значений разных особей данного гибрида (третья строка табл. 2).

– Сравнение содержания карнозина в мышечной ткани гибрида Ст × К и стерляди показало, что в мышцах гибрида содержалось в 3.33 раза больше карнозина (при уровне значимости $p < 0.01$ согласно распределению Стьюдента).

– Выявлены существенные различия по содержанию карнозина между особями разного пола (самцами и самками) гибрида ЛО × К: мышцы самцов содержали в 1.62 раза больше карнозина ($p < 0.05$).

– При сравнении содержания карнозина в мышцах самки гибрида ЛО × К с самкой сибирского осетра можно заключить, что в мышцах ги-

брида содержалось в 1.50 раза меньше карнозина ($p < 0.1$).

– Не было обнаружено значимых различий в содержании карнозина в тканях самок близкородственных видов осетра – русский осетр и сибирский осетр ленской популяции (интервалы значений перекрываются).

В табл. 2 также представлены опубликованные ранее данные по другим видам и гибридам осетровых. В частности, гибрид, при получении которого использовалась икра калуги и сперма стерляди (К × Ст), содержал примерно столько же карнозина, как и рассмотренный в данной работе гибрид Ст × К, однако авторы [5] приводят данные только по одной особи гибрида К × Ст.

Если рассматривать содержание карнозина как существенный фактор пищевой ценности, то можно заключить, что гибридизация стерляди с калугой целесообразнее по сравнению с чистым родительским видом (стерлядь) по пищевой ценности мышечной ткани, а использование гибрида сибирского осетра с калугой по сравнению с осетром в технологическом аспекте является менее эффективным.

Работа выполнена в рамках “Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 гг.”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Abe H.* Histidine-related ipeptides: Distribution, Metabolism, and Physiological Function // *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, V. 4. / Eds. Hochach-

ka and Mommsen. Amsterdam: Elsevier Science B.V., 1995. P. 309–333.

2. *Boldyrev A.A., Aldini G., Derave W.* // *Physiol Rev.* 2013. V. 93. Issue 4. P. 1803–1845.

3. *Болдырев А.А.* // *Биохимия.* 2012. Т. 77. № 4. С. 403–418.

4. *Boldyrev A.A., Severin S.E.* // *Adv. Enzyme Regul.* 1990. V. 30. P. 175–188.

5. *Давлетшина Т.А., Шульгина Л.В.* // *Рыбпром.* 2010. № 1. С. 47–50.

6. *Gatti R.* // *Chromatographia.* 2015. V. 78. Issue 15–16. P. 1095–1099.

7. *Abdelkader H., Swinden J., Pierscionek B.K., Alany R.G.* // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2015. V. 114. P. 241–246.

8. *Khalikova M.A., Satinsky D., Solich P., Zinchenko A.A., Zhilyakova E.T., Novikov O.O.* // *Anal. Methods.* 2014. V. 6. Issue 5. P. 1475–1481.

9. *Szterk A., Roszko M.* // *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* 2014. V. 37. Issue 5. P. 664–680.

10. *Gatti R., Andreatta P., Boschetti S.* // *J Chromatogr A.* 2013. V. 1298. P. 95–102.

11. *Peiretti P.G., Medana C., Visentin S., Giancotti V., Zunino V., Meineri G.* // *Food Chem.* 2011. V. 126. Issue 4. P. 1939–1947.

12. *Han M.-N., Chen X.-H., Qi Q.-G., Ji X.-Y., Bi K.-S.* // *Chinese Pharmaceutical Journal.* 2009. V. 44. Issue 14. P. 1111–1113.

13. *Tian Y., Xie M., Wang W., Wu H., Fu Z., Lin L.* // *Eur Food Res Technol.* 2007. V. 226. Issue 1–2. P. 311–314.

14. *Chen Y.-H., Lin Y.-P., Liou S.-E., Chen C.-C.* // *Int. J. Food Sci. Technol.* 2007. V. 42. Issue 5. P. 593–600.

15. *Nardiello D., Cataldi T.R.I.* // *J. Chromatogr. A.* 2004. V. 1035. Issue 2. P. 285–289.

Carnosine Levels in the Muscle Tissues of Sturgeons and Their Hybrids

**M. V. Mikhailova^a, V. N. Prozorovskiy^a, K. V. Zolotarev^{a,*}, O. M. Ipatova^a,
A. N. Mikhailov^a, E. N. Kharenko^b, and A. V. Artemov^b**

^a*Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, 119121 Russia Россия*

^b*Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography, Moscow, 107140 Russia*

*e-mail: fireaxe@mail.ru

Carnosine level determination in fish muscle tissues is helpful for the purposes of general biology and comparative muscle physiology of various fish species; it may be also useful for estimating the nutritional value of fish products. A method of mass-spectrometric determination of carnosine in muscle tissues has been improved and tested in this work. The carnosine levels in the muscles of Russian sturgeon, Siberian sturgeon, sterlet, sterlet and kaluga hybrid, Siberian sturgeon and kaluga hybrid have been firstly determined using that method. The sterlet and kaluga hybrid regardless of its sex contains 3.33-fold more carnosine than the sterlet does ($p < 0.01$). The female Siberian sturgeon and kaluga hybrid contains 1.50-fold less carnosine than the female Siberian sturgeon does ($p < 0.1$). Considering the nutritional value, since carnosine consumption is important for the biosynthesis of own carnosine in human muscles, hybridization of sterlet with kaluga is more efficient than pure sterlet breeding, and the hybridization of Siberian sturgeon with kaluga is less effective when than sturgeon breeding.

Keywords: carnosine, determination method, Russian sturgeon, Siberian sturgeon, sterlet, kaluga, hybrids of sturgeons