ÜBER DAS CARNOSIN UND SEINE METHYLVERBINDUNGEN IN DEN MUSKELN VON GIFTSCHLANGEN *TRIMERESURUS* *FLAVOVIRIDIS FLAVOVIRIDIS* ("HABU") SOWIE ÜBER IHRE PHARMAKOLOGISCHEN WIRKUNGEN*

SHIGERU TSUNOO, KAZUYOSHI HORISAKA, YUKIO MIYASHITA,
JUNICHI TAKEDA UND NAOHIKO TAKATAMA

Pharmakologisches Institut der Medizinischen Fakultät der Showa Universität, Shinagawa-ku, Tokyo

Eingegangenen am 13. April 1964

Seit langem nimmt man im allgemeinen an, dass Carnosin (β -Alanylhistidin) und seine Methylverbindungen, Anserin (β -Alanyl-1-N-methylhistidin) und Ophidin (β -Alanyl-2-C-methylhistidin), nur in den Muskelextrakten der Wirbeltiere als charakteristische Substanzen enthalten sind (1-3). Die interessanten Ergebnisse über die Verteilung dieser Dipeptide und ihren Gehalt (4-6) in Muskeln der verschiedenen Tiere wurden schon gewonnen, während vieles ihrer physiologischen und pharmakologischen Wirkungen (7-10) jedoch noch unbekannt bleibt. Es ist vor allem sehr interessant, dass Ophidin, welches bis jetzt nur aus den Schlangemuskel (3, 11-13) abgetrennt wurde, auch aus anderen Geweben ausser Muskeln isoliert wurde. Neulich trennten Tsunoo und andere weisse, nadelförmige Kristalle aus gefrorenem Walpankreas (14) und Walmuskel (15) ab, welche aus der Elementaranalyse nach den Salzbildungen, Spaltungsversuchen durch HBr und IR-Spektrum von ihren Pikrolonaten als Ophidin identifiziert wurden. Aus den oben erwähnten Tatsachen seien eingehende Untersuchungen über Verteilung dieser Dipeptide und ihren Gehalt in Muskel und in anderen Geweben der verschiedenen Tierarten ein wertvoller Helfer, um ihre physiologischen und pharmakologischen Wirkungen zur Klarheit zu kommen.

In vorliegenden versuchen haben wir das Vorkommen dieser Dipeptide in der Muskulatur der Giftschlange "Habu" und ihre pharmakologischen Wirkungen untersucht.

VERSUCHSTEILE

1. Die Isolierung und Identifizierung des Carnosins und des Ophidins aus der Muskulatur der Giftschlange "Habu"

Material: 17 Stück "Habu" (12 kg), an Okinawa Insel gefangen, wurden zur Untersuchung herangezogen. Die Rumpfteile von "Habu" wurden nach der Entfernung der Haut und Eingeweiden einige Tage lang in 80 %igem Alkohol eingetaucht. Dann

角尾 滋・堀坂 和敬・宮下 幸夫・武田 順一・高木 尚彦

* Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Tokyo Biochemischen Forschungsgemeinschaft ermöglicht.

wurden die Rumpfteile so lange mit heissem Wasser behandelt, bis die Ablösung der Muskeln von den Skeletten möglich war. Die Gewichts Differenz vor und nach der Wasserextraktion entsprach der Menge der verwendeten Muskeln. Sodann wurden 3 kg Muskeln von "Habu" in der Tat gebraucht.

Fraktionierung der freien Aminosäuren: Man brachte den Wasserextrakt mit Alkohol-extrakt zusammen. Der vereinigte Extrakt wurde nach dem in Tab. 1 gezeigten Ver-fahren fraktioniert. Nach der Enteiweissung durch Tannin-Blei-Methode wurde das Filtrat vom Blei beseitigt und durch eine Säule mit Dowex 50 (H^+) geschickt, um alle Aminosäuren und Peptide zu adsorbieren. Anschliessend wurde die Säule mit Wasser gespült. Die adsorbierten Aminosäuren wurden 2 N NH_3 -Lösung eluiert. Das Eluat wurde im Vak. unter der Hinfügung des Wassers mehrmals eingeeengt, um überschüssiges NH_3 zu entfernen. Diese wässrige Lösung wurde mit Amberlite IRC-50, zu pH 7.0 und 4.8 kontrolliert, säulenchromatographisch behandelt. Dadurch wurde die Histidin-Frak-

TABELLE 1. Fraktionierungsverfahren der Extrakte von Schlangemuskeln.

tion als Adsorbat von Lysin- und Arginin-Fraktion sowie derselben der neutralen und sauren Aminosäuren getrennt. Diese Histidin-Fraktion wurde durch 0.1 N HCl-Lösung eluiert. Das Eluat wurde mit Dowex 50 (H^+) behandelt. Die adsorbierten Stoffe wurden nach Wasserspülung durch 2 N NH_3 -Lösung eluiert. Man engte das Eluat im Vak. ein, bis freie Kristalle sich ausschieden.

Lösungsmittel für Papierchromatographie: n-Butanol: Essigsäure: Wasser (Abkürzung, Bu/Ac) 80:20:20, Pyridin: Wasser (Py) 65:35, Pyridin: n-Butanol: Wasser (Py/Bu) 80:20:20, Phenol (Phen), gesättigt mit einer wässrigen Lösung von 6.3 %igem Na-citrat und 3.7 %igem KH_2PO_4 .

Papier, Toyo Nr. 51.

Nachweis von Dipeptiden durch 0.2 %ige Ninhydrinlösung in Butanol. Carnosin durch Paulyse Diazoreaktion.

In dieser Histidin-Fraktion wurden zwei Ninhydrin-positive Substanzen papierchromatographisch betrachtet. Für die Trennung dieser Substanzen verwendeten wir HgSO_4 (in 5 %iger H_2SO_4).

A-Fraktion (HgSO_4 -Fällung): Nach der Zerlegung durch H_2S wurde das Schwefelquecksilber abfiltriert. Das Filtrat wurde nach der Entfernung des Schwefelwasserstoffs durch Dowex 50 (H^+) behandelt. Anschliessend wurde die Säule mit Wasser gespült, das Adsorbat mit 2 N NH_3 -Lösung eluiert. Diese Eluat-Fraktion wurde im Vak. eingeeengt. Man bekam weisse, nadelförmige Kristalle, die einen Schmelzpunkt von 252° (unter Zers.) besitzen. Ausbeute 2.2 g.

Die Analysen ergaben folgendes:

Ber. C 47.78 H 6.24 N 24.77

Gef. 47.90 6.57 24.41

Diese Substanz zeigt eine Paulyse Diazoreaktion. Zieht man nun die erwähnten Tatsachen und die folgende Papierchromatographie in Betracht, so wird diese Substanz für Carnosin angesehen (Tab. 2).

TABELLE 2. Rf-Wert.

	Bu/Ac	Py	Py/Bu	Phen
Isolierte Substanz	0.13	0.52	0.08	0.78
Carnosin	0.13	0.52	0.08	0.78

B-Fraktion (HgSO_4 -Filtrat): Das Filtrat wurde mit H_2S zerlegt. Die von Schwefelquecksilber abfiltrierte Lösung wurde durch Dowex 50 (H^+) behandelt. Das

Adsorbat wurde nach der Wasserspülung mit 2 N NH_3 -Lösung eluiert. Das Eluat wurde im Vak. unter der Hinfügung des Wassers mehrmals eingeeengt, um überschüssiges NH_3 zu entfernen. Diese basische wässrige Lösung wurde mit alkoholischer Pikrolonsäurelösung bis zu neutraler Reaktion versetzt. Dabei schieden sich 3.0 g gelbe, tafelförmige Kristalle, die bei 208° (unter Zers.) schmolzen und zeigten folgende Analysenwerte.

Ber. C 45.97 H 5.01 N 21.45

Gef. 45.98 5.19 21.52

Paulyse Diazoreaktion dieser freien Substanz ist negativ. Sie besitzt einen Schmelzpunkt von 245°C (unter Zers.) und folgende Analysenwerte.

Ber. C 46.50 H 7.02 N 21.69

Gef. 46.54 6.93 22.07

46.31 7.15

TABELLE 3. Rf-Wert.

	Bu/Ac	Py	Py/Bu	Phen
Isolierte Substanz	0.14	0.65	0.10	0.93
Ophidin	0.14	0.65	0.10	0.93

Auch bei der Ergebnissen der papierchromatographischen Untersuchungen erwies sich sie als identisch mit Ophidin (Tab. 3).

II. Einflüsse des Carnosins, Anserins und Ophidins auf die Herztätigkeit, den Blutdruck und die Atmung

Material und Methodik: Die zu prüfenden Dipeptide, Carnosin, Anserin und Ophidin, wurden aus der Natur dargestellt und isoliert. Die chemischen Konstitutionen dieser Substanzen sind aus der folgenden Tabelle 4 ersichtlich.

TABELLE 4. Carnosin und seine Derivate.

Wir verwendeten für die Versuche über die Einflüsse der oben angegebenen Substanzen auf den Kreislauf und die Atmung Kaninchen im Gewicht von ungefähr 2 kg. Kaninchen wurden mit 1.0–1.2 g Urethan/kg s.c. narkotisiert, dann in Rückenlage gebracht. Die Atmung wurde mit einer Marey-Kapsel, der Blutdruck mit einem Hg-Manometer sowie Karotiskatheter, und der Herzschlag *in situ* durch direkte Aufhängung der Herzspitze unter Benutzung des Fadens gleichzeitig registriert. Die Dipeptide, in 0.1 ml von physiologischer Kochsalzlösung gelöst, wurden intravenös injiziert. Die Registrierung der Bewegung des isolierten Kaninchenherzens wurde durch Langendorff-Gunnsche Methode ermittelt. Als die Durchströmungsflüssigkeit wurde die mit Sauerstoff gesättigte Locke-Ringersche Lösung gebracht. Die Dipeptide, in der verschiedenen Konzentrationen in 0.1 ml Wasser gelöst, wurden in den Gummischlauch, welcher an die Herzkanüle angeschlossen wurde, zur Vermeidung von der Druckveränderung der ernährenden Flüssigkeit sehr langsam injiziert.

Experimente in situ (Abb. 1A.B.C., 2A.B.C.): Der Blutdruck wurde durch intravenöse Injektion dieser drei Dipeptide unter 5 mg/kg nicht verändert. Erst in Dosen von 20 mg/kg machte sich eine leichte Steigerung des Blutdrucks bemerkbar, welche nach 3

Minuten wieder auf die Norm gebracht wurde. In Dosen von 40 mg/kg trat eine anhaltende Blutdrucksteigerung ein, deren Normalisierung ziemlich viele Zeit in Anspruch nahm.

ABB. 2A. Blutdruck, Atmung und Herzbewegung.

In allgemeinen riefen diese Substanzen keine wesentliche Änderung in der Atmung hervor. Aber in Dosen 40 mg/kg wurde eine leichte Hemmung der Atmung beobachtet.

Während die Schlagzahl des Herzens fast keine Beeinflussung hervorrief, wurde leichte Verkleinerung der Amplitude in Dosen von 40 mg/kg beobachtet.

Untersuchungen an isoliertem Kaninchenherzen (Abb. 3A.B.C.): Drei Dipeptide riefen in Dosen von 0.01–0.1 mg auf das isolierte Kaninchenherz leichte Hemmung hervor. In Dosen von 1 mg wurde Hemmung nach vorübergehender Stimulierung beobachtet. Leichte Verengung der Koronargefäße stellte sich von Dosen von 0.01 mg ein, und zwar geht die Verengungsgrad zur Vergrößerung der applizierten Mengen der Dipeptide fast in proportionaler Beziehung.

↑ Anserin 5 mg/kg Kaninchen 2.7 kg ♂

↑ Anserin 20 mg/kg Kaninchen 2.6 kg ♂

↑ Anserin 40 mg/kg Kaninchen 2.6 kg ♂

ABB. 2B. Blutdruck, Atmung und Herzbewegung.

ABB. 2C. Blutdruck, Atmung
und Herzbewegung.

↑ Ophidin 5 mg/kg Kaninchen 2.7 kg ♂

↑ Ophidin 20 mg/kg Kaninchen 2.7 kg ♂

↑ Ophidin 40 mg/kg Kaninchen 2.7 kg ♂

ABB. 3A. Untersuchungen an isoliertem Kaninchenherzen.

ABB. 3B. Untersuchungen an isoliertem Kaninchenherzen.

ABB. 3C. Untersuchungen an isoliertem
Kaninchenherzen.

DISKUSSION

Seit das Ophidin aus den Muskeln der giftigen und ungiftigen Schlangen in Formosa (3) entdeckt wurde, fand sich es auch in den Muskeln von japanischen Giftschlange *Agkistrodon Blomhoffi* (11) neben Histidin bekanntlich. Aus den Muskeln von *Natrix tigrina tigrina* (12) wurden Ophidin und Carnosin kristallinisch dargestellt, während Carnosin aus denselben von Seeschlangen *Laticauda semifasciata* und *laticaudata* (13) nicht isoliert wurde, sondern nur Histidin und 2-C-Methylhistidin wurden ausser Ophidin papierchromatographisch nachgewiesen. Dazu kam, dass Carnosin an dem Gehalt Ophidin überlegen war. Ausser den oben genannten Schlangemuskeln wurden Ophidin und 2-Methylhistidin aus Walpankreas (14, 16), und Carnosin wurde neben Ophidin aus Walmuskel (15) dargestellt.

Was die physiologischen und pharmakologischen Wirkungen dieser Dipeptide, Carnosin, Anserin und Ophidin, anbetrifft, so lässt sich zunächst an die Entfaltung ihrer Wirkungen in Muskeln mit der Begründung denken, dass sie in etwas grösserer Anreicherung in Muskeln anzutreffen sind (7-10). Durch das Vorkommen dieser Dipeptide im Hirn (17, 18) und Auge (19, 20) ist das Interesse für ihre Wirkungen in steigendem Masse in den Vordergrund gerückt. Vor kurzem wurde nach Ichihara und anderen (21) untersucht, wie diese Dipeptide die Muskelkontraktion beeinflussen. Diese Versuche wurden am isolierten Uterus und Eileiter des Huhns, der Ratte und des Meerschweinchens vorgenommen. Es stellte sich heraus, dass sich ihre Wirkungen je nach Rasse der Tiere und bei verschiedenen Sorten dieser Dipeptide sehr unterschiedlich beeinflussen liessen. Im Jahre 1936 beobachteten du Vigneaud und anderer (22) eine Senkung des Blutdrucks nach der Applikation des *l*-Carnosins an der Katze und dem Kaninchen,

mit Amytal und Luminal narkotisiert. Weiter zeigten sie, dass beim *dl*-Carnosin die Blutdrucksenkung nur halb so stark war, und beim enantiomorphen *d*-Carnosin fehlte. Aber unsere geschilderten Versuche zeigten, dass die Blutdrucksenkung durch die Dipeptide, Carnosin, Anserin und Ophidin, am Kaninchen fehlte, vielmehr die Blutdrucksteigerung sich als alle gemeinsame Wirkung dieser Dipeptide entfalten liess.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Aus den Muskeln von "Habu" wurden Ophidin (3.0 g als Pikrolonat) und Carnosin (2.2 g) kristallinisch dargestellt, und sie wurden durch Analyse und Papierchromatographie identifiziert.

2. Die Wirkungen des Carnosins und seiner Methylverbindungen, Anserins und Ophidins, auf die Herztätigkeit, den Blutdruck und die Atmung *in situ* sowie auf das isoliertes Herz wurden am Kaninchen untersucht. Kein Unterschied der Wirkungen bestand in drei Dipeptiden, indem sie die Blutdrucksteigerung als gemeinsame Wirkung zeigten.

Anerkennung: Die zu den Versuchen benötigten Giftschlangen "Habu" wurden von Herrn T. Ire in Okinawa und von den Studienreise nach Okinawa angetretenen Studenten, Herrn Y. Ban, H. Yoshida und K. Inoue freundlicherweise zur Verfügung gestellt, wofür wir an dieser Stelle danken.

LITERATUR

- 1) GULEWITSCH, W. UND AMIRADZIBI, S.: *Ber. dtsch. chem. Ges.* **33**, 1902 (1900)
- 2) ACKERMANN, D., TIMPE, O. UND POLLER, K.: *Z. phys. Chem.* **183**, 1 (1929)
- 3) IMAMURA, H.: *J. Biochem., Tokyo* **30**, 479 (1939)
- 4) WOLFF, W.A. UND WILSON, W.: *J. biol. Chem.* **109**, 565 (1935)
- 5) LUKTON, A. UND OLCOTT, H.S.: *Food Res.* **23**, 611 (1958)
- 6) DAVEY, C.L.: *Arch. Biochem. Biophys.* **89**, 303 (1950)
- 7) BATE SMITH, E.C.: *J. Physiol.* **92**, 336 (1938)
- 8) DAVEY, C.L.: *Arch. Biochem. Biophys.* **89**, 296 (1960)
- 9) QURESHI, Y. UND WOOD, T.: *Biochem. biophys. acta* **60**, 190 (1962)
- 10) BROWN, D.E.S., CAREW, E.B. UND BAUER, R.S.: *Arch. Biochem. Biophys.* **100**, 45 (1963)
- 11) TOMITA, T.: *Z. phys. Chem.* **304**, 72 (1956)
- 12) TSUNOO, SH. UND TAKEDA, J.: *Folia pharmacol. japon.* **58**, 31§ (1962)
- 13) TSUNOO, SH., HORISAKA, K., MOTONISHI, K. UND TAKEDA, J.: *J. Biochem., Tokyo* **56**, 603 (1954)
- 14) TSUNOO, SH., MUSASHI, A. UND HORISAKA, K.: *Proc. Japan Acad.* **35**, 485 (1959)
- 15) HORISAKA, K. UND MUSASHI, A.: *J. Biochem., Tokyo* **53**, 271 (1963)
- 16) MUSASHI, A.: *Showa Med. J.* **20**, 887 (1960)
- 17) HOSEIN, E.A. UND SMART, M.: *Canad. J. Biochem. Physiol.* **38**, 569 (1969)
- 18) TSUNOO, SH., HORISAKA, K., KAWASUMI, M., ASO, K. UND TOKUE, SH.: *J. Biochem., Tokyo* **54**, 355 (1963)
- 19) LONG, C.: *Biochemists' Handbook* S. 705, E. & F. N. Spon Ltd., London (1961)
- 20) TSUNOO, SH., HORISAKA, K., SASAKI, SH., ASO, K. UND TOKUE, SH.: *J. Biochem., Tokyo* **54**, 363 (1953)
- 21) ICHIHARA, K., MIMURA, T., SUMITA, S. UND MATSUMURA, Y.: *Seikagaku* **31**, 518 (1952)
- 22) DU VIGNEAUD, V. UND HUNT, M.: *J. biol. Chem.* **115**, 93 (1935)