

УДК 577.157.072

БИОХИМИЯ

А. Н. ПАРШИН, С. Б. ЛЕБЕДЕВА

КАРНОЗИН-АНСЕРИН-СИНТЕТАЗА ПЕЧЕНИ И ГЕПАТОМЫ

(Представлено академиком Е. М. Крепом 10 XII 1970)

Было установлено участие печени в образовании карнозина и ансерина в опытах на кроликах с опухолью Броуна — Пирс (¹, ²). В печени таких животных резко повышается активность гистидиндезаминазы и урокаиназы, что ведет к уменьшению содержания обоих дипептидов в мышцах благодаря усиленному распаду гистидина. Если же опухолевым кроликам подкожно вводить гистидин, количество карнозина и ансерина в их мускулатуре становится нормальным. Роль печени в биосинтезе этих соединений еще с большей очевидностью подтвердилась в экспериментах на собаках с фистулой Экка — Павлова (³, ⁴). В мышцах собак, в результате выключения печени из тока кровообращения, наблюдалось значительное снижение их содержания, активность же ферментов — гистидиндезаминазы и урокаиназы не изменялась.

В дальнейшем, перфузируя изолированные печень и мышцы задних конечностей лягушки раствором, содержавшим *d*, *l*-гистидин-1-С¹⁴, удалось получить прямое доказательство образования карнозина в этих органах (⁵). Одновременно выяснилось, что в печени лягушки он синтезируется в среднем в 22 раза интенсивнее, чем в мышцах. Позднее биосинтез не только карнозина, но и ансерина был обнаружен аналогичным путем также в кашпцах и изолированной печени крыс и мышей (⁶, ⁷).

Данные нашей лаборатории об образовании карнозина и ансерина в печени нашли полное подтверждение в опытах японских авторов на крысах, которым внутривенно вводилась оротовая кислота-6-С¹⁴ (⁸). Установление биосинтеза обоих дипептидов в печени не оставляло сомнений о наличии в этом органе энзима карнозин-ансерин-синтетазы (β -аланил-*l*-гистидин-лигазы). Это предположение, как показали наши предварительные наблюдения, оправдалось (⁹). Поскольку изучение ферментов имеет существенное значение в выяснении биохимических особенностей нормальной и опухолевой клетки, мы произвели в настоящей работе выделение и частичную очистку карнозин-ансерин-синтетазы (КАС) печени и гепатомы 22А мышей.

Это удалось осуществить, применяя разработанный ранее рядом авторов способ получения этого фермента из мускулатуры различных животных (¹⁰⁻¹⁶). Его сущность заключается в экстрагировании гомогенатов исследуемых тканей раствором, состоявшим из 3 частей NaHCO₃ и 1 части 0,04 *M* трис-буфера (pH 7,4), содержавшего 10⁻³ версена, предварительном удалении части белков центрифугата при добавлении 20% абсолютного спирта, осаждении энзима при дальнейшей обработке спиртом (60%), растворении этого осадка в 0,04 *M* трис-буфере и последующего осаждения энзима ацетоном (29%). Нерастворившиеся в трис-буфере денатурированные белки ацетонового осадка отцентрифугируются, в полученном центрифугате КАС адсорбируется на геле кальций фосфата и элюируется потом 0,01 *M* раствором фосфата калия (pH 7,4). Процедура выделения фермента должна производиться в холодной комнате (0—4°). В опыт бралось 25—50 г печени или гепатомы.

Исследование биосинтеза карнозина производилось следующим образом: в отдельную пробу отмеривалось 0,8 мл раствора фермента, 0,2 мл трис-буфера (рН 7,4), содержавшего 2 μ моля β -аланина, 2 μ моля гистидина-1- C^{14} (удельная активность 28 μ C/г), 1,5 μ моля АТФ и 1,5 μ моля $MgSO_4$. Инкубация продолжалась 1 час при 37°. Препарат *d*, *l*-гистидина-1- C^{14} предварительно очищали методом хроматографии на бумаге.

После инкубации белки осаждали 1 мл 5% трихлоруксусной кислоты. Свободный гистидин в этих фильтратах разрушался нингидрином. Трихлоруксусную кислоту и избыток нингидрина экстрагировали бутанолом. Раствор образовавшегося карнозина- C^{14} выпаривали на алюминиевых тарелочках под лампой и определяли его активность на установке Б-2 со счетчиком Т-25 БФЛ. Об активности КАС судили по величине радиоактивности синтезированного карнозина в течение 1 часа при 37° на 1 мг белка.

Идентификацию карнозина и гистидина осуществляли путем восходящей хроматографии на бумаге ватман № 3 в системе водонасыщенного фенола и соляной кислоты в течение 18–20 час. при комнатной температуре. С хроматограмм снимали радиоавтографы на рентгеновскую пленку.

Чтобы еще более убедиться в образовании карнозина- C^{14} при действии КАС печени и гепатомы, мы производили одновременно гидролиз экстрактов его пятен с хроматограмм 6 *N* HCl в течение 18 час. и идентификацию освободившегося при этом гистидина- C^{14} . С этой целью сконцентрированные гидролизаты хроматографировали, с хроматограмм снимали радиоавтографы.

Результаты наших опытов представлены на рис. 1 и табл. 1. На радиоавтограммах (рис. 1) до гидролиза карнозина- C^{14} соляной кислотой видны два четких пятна, соответствующие по коэффициенту распределения (R_f) этому дипептиду и гистидину. После же гидролиза на радиоавтограммах сохраняется лишь пятно гистидина-1- C^{14} . Эти данные показывают, что при действии КАС как печени (рис. 1А), так и гепатомы (рис. 1Б) происходит образование карнозина из β -аланина и гистидина. Судя по радиоактивно-

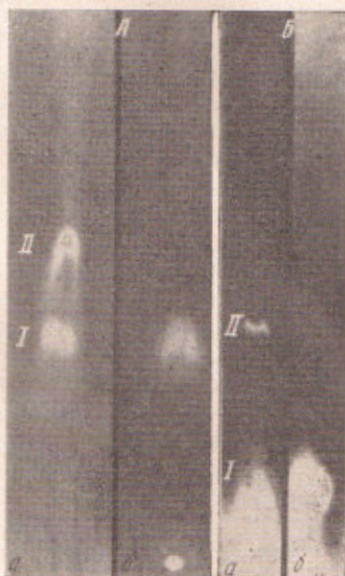


Рис. 1. Радиоавтограмма карнозина- C^{14} , образовавшегося под влиянием КАС печени (Аа), и его гидролизата (Аб) и образовавшегося под влиянием КАС гепатомы (Ба) и его гидролизата (Бб). I — гистидин- C^{14} , II — карнозин- C^{14}

Таблица 1

Радиоактивность карнозина, образовавшегося при действии карнозин-ансерин-синтетазы из β -аланина и *d*, *l*-гистидина-1- C^{14} (имп/мин на 1 мг белка)

№№ п.п.	Печень		Гепатома 22А мышей	№№ п.п.	Печень		Гепатома 22А мышей
	здоровых мышей	опухолевых мышей			здоровых мышей	опухолевых мышей	
1	1200	1000	1300	7	1060	1000	1400
2	1040	1120	1270	8	1670	1000	—
3	1250	1220	1120	9	1260	1120	—
4	1400	1000	1220	<i>M</i>	1260	1080	1210
5	1340	1110	1120	$\pm m$	61	26	62
6	1110	1220	900	<i>P</i>	—	> 0,05	> 0,5

сти синтезированного карнозина (табл. 1), активность КАС печени и гепатомы одинакова.

Каков механизм биосинтеза карнозина и его гомологов и аналогов, пока еще не выяснено. Найдено лишь, что их образование при действии КАС мышц происходит только в присутствии АТФ и ионов магния (¹⁰⁻¹⁶). По данным одних авторов, промежуточным продуктом в синтезе карнозина и апсериона является β -аланил-аденилат (¹⁴⁻¹⁶). Другие же исследователи полагают, что первой стадией этой реакции служит образование комплекса энзима — β -аланина — АМФ (¹²⁻¹³).

Необходимо отметить и то обстоятельство, что КАС мышц не обладает строгой специфичностью, так как она катализировать образование многих дипептидов β -аланина, γ -аминомасляной кислоты, гистидина и его метилпроизводных, лизина (^{11, 16}). Интересно, что целый ряд гомологов карнозина, синтезированных впервые таким путем, был позднее найден в различных тканях животных и человека. К ним относятся изоансерин (¹⁷), гомокарнозин (¹⁸), гомоансерин (¹⁹), N, α - β -аланил-лизин и N, α - γ -аминобутирил-лизин (²⁰). При действии КАС мышц удалось получить даже фтор-карнозин (²¹). По всей вероятности, саркофагин- β -аланил-*l*-тирозин, найденный в личинках мясной мухи (²²), синтезируется, равным образом, под влиянием этого фермента. Согласно опытам с гистидином-2- C^{14} , образование карнозина и гомокарнозина происходит также в головном мозгу лягушки (²³). По наблюдениям других авторов, биосинтез карнозина и апсериона имеет место почти во всех органах крыс (²⁴). Эти результаты указывают на наличие КАС в различных животных тканях. По нашим данным, карнозин и апсерин наиболее интенсивно образуются в печени (⁵⁻⁷), откуда они с током крови попадают в мышечную ткань, где задерживается их значительная часть благодаря образованию лабильного соединения, по-видимому, с белками актомиозинового комплекса.

Нахождение и биосинтез карнозина и его гомологов, помимо мышц, в других тканях не позволяют в настоящее время относить их к группе специфических веществ мускулатуры. Эти дипептиды, вероятно, имеют большое физиологическое значение, поскольку они широко распространены в животном мире и образуются в результате конденсации очень важных в биологическом отношении аминокислот. Известно, что гистидин принадлежит к числу незаменимых аминокислот, входит в состав активных центров многих ферментов, из него образуются два медиатора — гистамин и мурексин-уроканилхолин. Функции гемоглобина, миоглобина, цитохромов, геминных энзимов, миозина А, гормонов инсулина и глюкогона в значительной степени обуславливаются наличием имидазольного кольца гистидина. β -Аланин является составной частью пантотеновой кислоты и коэнзима А. γ -Аминомасляной кислоте придается важное значение в деятельности нервной системы. По-видимому, карнозин и его гомологи служат в организме животных и человека запасным депо входящих в них аминокислот, которое используется для самых различных отравлений живой клетки.

Сравнительное изучение процессов биосинтеза различных дипептидов под влиянием соответствующих синтетаз отдельных тканей здоровых и опухолевых животных, а также человека, имеет большое значение в выяснении биохимических особенностей нормальной и бластоматозной клетки.

Научно-исследовательский институт онкологии
им. Н. Н. Петрова
Ленинград

Поступило
21 XI 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. Н. Паршин, Т. А. Горюхина, ДАН, 77, 665 (1951). ² Т. А. Горюхина, ДАН, 88, 347 (1953). ³ А. Н. Паршин, Т. А. Горюхина, ДАН, 88, 113 (1953). ⁴ Т. А. Горюхина, Вопросы биохимии мышц, Киев, 1954, стр. 207.

⁵ А. Н. Паршин, Т. А. Горюхина и др., ДАН, 141, 233 (1961). ⁶ С. Б. Лебедев, А. Н. Паршин, ДАН, 167, 699 (1966). ⁷ С. Б. Лебедева, А. Н. Паршин, Обмен аминокислот, Тбилиси, 1967, стр. 62. ⁸ S. Aonuma, T. Noma et al., J. Biochemistry, 66, 123 (1969). ⁹ А. Н. Паршин, С. Б. Лебедева, Тез. докл. II Всесоюзн. биохим. съезда, секция 3, 142 (1969). ¹⁰ T. Winnik, R. E. Winnik, Biochim. et biophys. acta, 31, 47 (1959). ¹¹ R. E. Winnik, T. Winnik, Bull. Soc. Chim. Biol., 40, 1727 (1958). ¹² R. E. Winnik, T. Winnik, Biochim. et biophys. acta, 37, 214 (1960). ¹³ J. J. Stenesh, T. Winnik, Biochem. J., 77, 575 (1960). ¹⁴ G. D. Kalyankar, A. Meister, Federat. Proc., 18, 256 (1959). ¹⁵ G. D. Kalyankar, A. Meister, J. Am. Chem. Soc., 81, 1515 (1959). ¹⁶ G. D. Kalyankar, A. Meister, J. Biol. Chem., 234, 3210 (1959). ¹⁷ E. Müller, Zs. physiol. Chem., 317, 190 (1960). ¹⁸ J. J. Pisano, J. D. Wilson et al., J. Biol. Chem., 236, 499 (1961). ¹⁹ T. Nakayima, F. Wolfgram, W. G. Clarck, J. Neurochem., 14, 1107 (1967). ²⁰ A. Kumon, Y. Matsuoka et al., Biochim. et biophys. acta, 200, 170 (1970). ²¹ T. Winnik, R. E. Winnik, E. D. Bergman, Biochim. et biophys. acta, 69, 48 (1963). ²² L. Levenbook, R. P. Bodnaryk, T. F. Spande, Biochem. J., 113, 837 (1969). ²³ W. C. Yokey, F. D. Marshall, Biochem. J., 114, 585 (1969). ²⁴ S. Aonuma, T. Mayumi et al., Radioisotopes, 14, 400 (1965).