

А. С. КОНИКОВА, В. Н. ОРЕХОВИЧ, М. Г. КРИЦМАН, С. Я. ДАВЫДОВА,  
А. С. ХОХЛОВ, М. Г. КУКАВАДЗЕ, Б. В. ОТТЕСЕН, М. И. МЕНШИКОВ  
и Л. Л. ГОЛЬДИН

### ИССЛЕДОВАНИЕ ОБНОВЛЕНИЯ ДИКАРБОНОВЫХ АМИНОКИСЛОТ В ПЕЧЕНИ С ПОМОЩЬЮ $C^{13}$

(Представлено академиком А. И. Опариным 26 I 1949)

Применение изотопов биогенных элементов для исследования обмена белка и аминокислот дало возможность установить ряд существенных закономерностей, которые не могли быть вскрыты другими методами. Методом изотопной метки была доказана динамичность белковых молекул в живом организме, а также обновление белков в переживающих тканях животных.

В настоящей работе с помощью  $C^{13}$  было исследовано обновление аминокислот белков в нормальной и регенерированной печени, а также в участках печени, прилежащих к регенерату и отдаленных от него. Кроме того, была исследована интенсивность включения  $C^{13}$  в свободные аминокислоты срезов вышеуказанных тканей.

Экспериментальная часть. Подопытными животными служили крысы весом 80—120 г, у которых предварительно удалялась часть печени. У животных вскрывалась брюшная полость и печень извлекалась пинцетом наружу. На одну из долей печени накладывалась шелковая лигатура, перетягивающая ткань печени и кровеносные сосуды у корня доли. Участок печени, отделенный лигатурой, срезался и брюшная полость зашивалась. Благодаря наложению лигатуры, несмотря на большой размер ампутационной поверхности печени, кровотечения не было. У всех подопытных крыс, числом 18, удалялась левая доля печени. К 12-му дню в печени крыс, у которых был удален участок ткани, над лигатурой образовалась новая печеночная ткань.

Для исследования процесса обновления дикарбонных аминокислот брались срезы из регенерирующего участка печени, а также из участков печени, прилегающих к регенерату и отдаленных от него. Для приготовления срезов была использована печень всех оперированных крыс.

Каждая проба содержала 1 г срезов. Контролем служили срезы печени, взятые у трех нормальных крыс. После взвешивания срезы помещались в газовые колбочки, содержавшие бикарбонатный буфер по Кребсу, в котором NaCl был заменен соответствующим количеством  $NaHC^{13}O_3$ .

После окончания инкубации колбочки погружались в кипящую баню на несколько минут. Срезы вынимались, тщательно растирались, полученная кашица снова помещалась в колбочки, в которые затем добавлялась трихлоруксусная кислота для осаждения белков. Пробу отфуго-

вывали и из фугата осаждали свободные аминокислоты  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  и спиртом по методу Форемана. Белковый осадок отмывали 5% трихлоруксусной кислотой, затем спиртом и эфиром и высушивали на воздухе. Высушенный белок подвергался 36-часовому гидролизу с 6*N*  $\text{HCl}$  в автоклаве (давление 1,5 атм.).

Гидролизат обесцвечивался, после чего в вакууме из него удалялась соляная кислота. Из обработанного таким образом гидролизата осаждалась дикарбоновая фракция аминокислот по тому же способу, что и из трихлоруксусного фильтрата. Из полученных осадков аминокислот по методу Ван-Слайка вытеснялась углекислота. Выделившийся углекислый газ собирался в специальные ампулы. Изотопный состав собранных проб газа измерялся на масс-спектрометре с секторным магнитом, построенным специально для изотопного анализа веществ с молекулярным весом от 20 до 50. Стеклообразная трубка масс-спектрометра не имела шлифов. Перед промером проб трубка прогревалась в течение нескольких часов до 300—350° и откачивалась с помощью ртутных диффузионных насосов до давления не выше  $5 \cdot 10^{-7}$  мм ртутн. Промеры проб исследуемого газа контролировались по  $\text{CO}_2$  из баллона и из карбоксила аминокислот, содержавших природную концентрацию  $\text{C}^{13}$  и  $\text{C}^{12}$ .

Промеры обеспечили измерение относительных количеств  $\text{C}^{13}$  и  $\text{C}^{12}$  с точностью до 1%. Полученные данные приведены в табл. 1.

Таблица 1

Избыток  $\text{C}^{13}$  в свободных и выделенных из белков печени аминокислотных кислотах (в ат. %)

1 г срезов печени крысы, 8 мл бикарбонатного буфера, содержащего 200 мг  $\text{NaHC}^{13}\text{O}_3$  5,5 ат. % обогащения. Добавки: в микромолях: аланин 70,  $\alpha$ -кетоглутаровая кислота 70, фумаровая кислота 10 и хлористый аммоний конечная концентрация 0,02 *M*. Общий объем пробы 12 мл. время опыта 4 часа, температура 37—38°, атмосфера кислорода

Исследованные ткани печени	Аминокислотные кислоты печени	
	Ат. % избытка $\text{C}^{13}$	
	свободные	в белках
Нормальная . . . . .	0,13	0,04
Регенерирующая . . . . .	0,11	0,03
Прилежащая к регенерату . .	0,03	—
	0,04	
Отдаленная от регенерата . .	0,03	0,02
Контроль . . . . .	$0,00 \pm 0,01$	—

Из приведенных в табл. 1 данных видно, что свободные аминокислотные кислоты регенерирующей и нормальной тканей печени практически одинаково обогащены  $\text{C}^{13}$ . В дикарбоновой фракции, полученной из белкового фильтрата прилежащей к регенерату и отдаленной от него тканей печени, атомный процент избытка  $\text{C}^{13}$  ниже, чем в нормальной и регенерирующей тканях. Различие в числе атомных процентов избытка  $\text{C}^{13}$  в аминокислотной фракции белков нормальной и регенерирующей тканей печени не превосходит вероятной ошибки измерения. Таким образом, интенсивность внедрения  $\text{C}^{13}$  в аминокислотные кислоты, как в свободные, так и во включенные в белковую молекулу, для нормальной и для регенерирующей тканей печени практически одинакова.

Обсуждение результатов. Внедрение  $C^{13}$  в аминокислоты белков срезов печени при наличии в среде  $NaHC^{13}$ ,  $\alpha$ -кетокислот и аммония является следствием комплекса реакций. Повидимому, включению в белок аминокислот, содержащих  $C^{13}$ , должно предшествовать новообразование их и обновление углерода карбоксила в результате процессов фиксации углекислоты, удлинения углеродной цепи кетокислот, превращения ряда субстратов по циклу трикарбоновых кислот и присоединения аммиака.

При наличии в среде  $NaHC^{13}O_3$  интенсивность включения аминокислот, обогащенных  $C^{13}$ , в белок определяется интенсивностью реакций, ведущих к образованию меченых  $C^{13}$  свободных аминокислот. Таким образом, количество  $C^{13}$  в аминокислотной фракции белков зависит в значительной мере от интенсивности внедрения обогащенной  $C^{13}$  углекислоты в свободные аминокислоты. Избыток  $C^{13}$  в свободных аминокислотах в наших опытах отражает скорость образования аминокислот и обновления в них углерода.

Количество  $C^{13}$  аминокислотной фракции белка зависит как от интенсивности включения аминокислот в белковую цепочку, так и от скорости указанных реакций.

Наши экспериментальные данные показывают одинаковую интенсивность процесса образования свободных аминокислот и обновления углерода в нормальной и регенерирующих тканях, однако, во всех других (кроме регенерата) участках оперированной печени этот процесс заторможен. Включение аминокислот в белки срезов регенерирующей и нормальной тканей печени, по нашим данным, происходит с одинаковой скоростью. До недавнего времени считалось, что синтез белка в регенерирующей ткани происходит интенсивнее, чем в нормальной ткани. Это представление базировалось на умозрительных заключениях и косвенных данных по определению активности дыхания и действия ферментных систем белкового обмена. В 1946 г. Риттенбергом <sup>(1)</sup>, на основании неопубликованных данных, было высказано предположение, что скорость синтеза белка в регенерирующей и в нормальной тканях одинакова и что различие в превращении их белков следует искать в скорости распада.

Попытка Фридберга и др. <sup>(2)</sup> опровергнуть это представление на основании данных о повышенной скорости обновления белка в гомогенатах печени молодых крыс мало убедительна.

Мы считали, что для правильного решения этого вопроса необходимо провести сравнительные исследования скорости обновления белка в регенерирующей и в нормальной тканях печени.

По полученным данным, белковый обмен в регенерирующей ткани не характеризуется ни повышенной, по сравнению с обменом в нормальной ткани, скоростью образования карбоновых аминокислот, ни более интенсивным включением их в белок. Однако надо иметь в виду, что включение новых аминокислот в белок ткани может быть результатом двух процессов: обновления аминокислот в белковой цепочке и синтеза новых белковых молекул. Не исключена вероятность, что количественное соотношение между этими процессами в нормальной и регенерирующей печени различно.

Институт биологической и медицинской химии  
Академии медицинских наук СССР

Поступило  
25 I 1949

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> D. Rittenberg, D. Shemin, in D. Green, Currents in Biochem. Research, N. Y., 1946, p. 272. <sup>2</sup> F. Friedberg, M. P. Schulman and D. M. Greenberg, J. Biol. Chem., 173, 437 (1948).