

Т. А. ГОРЮХИНА

**УРОКАНИНОВАЯ КИСЛОТА КАК ПРОМЕЖУТОЧНЫЙ ПРОДУКТ
РАСПАДА ГИСТИДИНА В ОРГАНИЗМЕ НОРМАЛЬНЫХ
И ПОРАЖЕННЫХ ОПУХОЛЯМИ ЖИВОТНЫХ**

(Представлено академиком К. М. Быковым 25 IX 1952)

Уроканиновая кислота впервые была обнаружена в моче собаки, чем и объясняется ее название (1). Однако биогенез этого соединения долгое время оставался невыясненным. Только после того как удалось установить, что уроканиновая кислота является по своей структуре β -имидазолилакриловой кислотой, предположение об образовании ее из гистидина сделалось весьма вероятным. Поэтому обнаружение уроканиновой кислоты в числе продуктов биологического распада гистидина под влиянием бактерий колитифозной группы не явилось неожиданностью. Вскоре образование уроканиновой кислоты из гистидина было найдено и в животном организме, причем выяснилось, что этот процесс происходит в печени. Последующие работы показали, что уроканиновая кислота в свою очередь подвергается в животном организме дальнейшему расщеплению при действии особого фермента печени — уроканиназы. Казалось бы, все приведенные исследования устраняли всякие сомнения в отношении промежуточного образования уроканиновой кислоты при биологическом расщеплении молекулы гистидина. Тем не менее этот вопрос оставался спорным до самого последнего времени.

При скармливании или подкожном введении даже значительных доз гистидина различным животным, в частности собакам, в моче удавалось обнаружить очень малое количество уроканиновой кислоты. Некоторые авторы вообще не смогли подтвердить выделение с мочей уроканиновой кислоты или ее образование при инкубации гистидина с экстрактами печени (2). Некоторым исследователям удавалось наблюдать появление в моче уроканиновой кислоты лишь при скармливании животным большого количества гистидина, но не при подкожном его введении (3). Наконец, слабая активность уроканиназы в опытах *in vitro*, выделение уроканиновой кислоты большей частью в неизменном виде с мочей при подкожном ее введении животным (2), отсутствие ясности в отношении механизма образования этого соединения (4) — заставляли признать, что если уроканиновая кислота и образуется при ферментативных превращениях гистидина, то этот путь является не главным, а побочным процессом.

Лишь благодаря исследованиям А. Н. Паршина (5), наблюдавшего количественный переход гистидина в уроканиновую кислоту под влиянием своеобразного фермента — α -дезаминазы с оптимумом действия при рН 7,8, обнаруженный этим автором в экстрактах печени, стало совершенно очевидным, что уроканиновая кислота является первым и главным этапом ферментативных превращений гистидина в животном организме. Одновременно с опытами А. Н. Паршина было доказано, что так

называемая «гистидаза» Эдльбахера (2) представляет собой не что иное, как смесь двух ферментов: α -дезаминазы гистидина и уроканиназы.

Цель настоящей работы — привести дополнительные данные в пользу образования уроканиновой кислоты как нормального продукта обмена гистидина в животном организме. Попутно мы попытались в своих опытах использовать эту реакцию для обнаружения биохимических особенностей раковой ткани. Поэтому наши опыты были проведены не только на нормальных животных (кошки и крысы), но и на пораженных злокачественными новообразованиями — крысы с перевиваемыми рабдомиобластомами (МОП).

Методика. Опыты *in vitro* проводились с кашицами печени и почек нормальных и опухолевых животных. Сосудики аппарата Варбурга содержали 1,1 мл раствора Рингера — Кребса (рН 7,4—7,8), 400 мг кашицы печени или почек. В боковую реторточку наливался 1 мл раствора буфера, содержащий 4 мг нейтрализованной уроканиновой кислоты. В контрольные пробы уроканиновая кислота не добавлялась. Опыт продолжался 3 часа. Белки осаждались 1 мл 14% трихлоруксусной кислоты.

Кроме микроопытов, ставились также макроопыты, когда в отдельный опыт бралось 16 мг уроканиновой кислоты. Опыты производились в атмосфере кислорода и азота. Аммиак определялся по Фолину при вытеснении содой и едким натром, аминный азот — по Ван-Сляйку в тех же пробах после предварительного отгона аммиака. Уроканиновая кислота учитывалась колориметрически диазореакцией в видеизменении Мешковой и ферментативным путем по количеству отщепляемого аммиака.

В опытах на животных уроканиновая кислота вводилась подкожно в виде нейтрализованного раствора в количестве 25—50 мг. Вес опытных крыс подбирался от 90 до 100 г. За 2 дня до введения уроканиновой кислоты и в течение 2 дней после введения подопытные животные находились на овощной диете (морковь, турнепс, репа). Крысы для собирания мочи помещались в стеклянные воронки. Моча собиралась количественно в течение суток, антисептиком служил хлороформ.

В суточной моче исследовалось содержание общего азота, мочевины уреазным методом, аммиака по Фолину при вытеснении содой и щелочью, аминокислот по Ван-Сляйку и уроканиновой кислоты диазореакцией. Уроканиновая кислота синтезирована по методу Эдльбахера (6).

Таблица 1

Кашица печени	Взято уроканин, к-ты в мг	Найдено в мг				Поглощено O ₂ в величинах Q _{O₂}			Расщепление уроканин, к-ты по диазореакции, в %
		λ-NH ₂		N-NH ₂		контр.	опыт	разность	
		Na ₂ CO ₃	NaOH	Na ₂ CO ₃	NaOH				
Кошка	4	0	0,30	0	0,25	2,22	2,38	+ 0,16	97
"	4	0	0,33	0	0,23	2,16	2,30	+ 0,14	98
Крыса	4	0	0,32			2,60	2,78	+ 0,18	78
"	4	0	0,35			2,85	2,66	- 0,19	85
Крыса с опухолью (МОП)	4	0	0,38			3,00	2,82	- 0,18	100
То же	4	0	0,34			3,81	4,00	+ 0,19	99

В атмосфере азота

Кошка	4	0	0,38						
"	4	0	0,36						

Из табл. 1 видно, что в кашицах печени нормальных и пораженных опухолью животных происходит интенсивное расщепление уроканиновой кислоты, протекающее без поглощения кислорода. Во время этого процесса уроканиновая кислота превращается в промежуточное соединение невыясненной пока структуры, которое только при действии NaOH отщепляет одну молекулу аммиака и переходит при этом в какую-то аминокислоту. Как известно, совершенно аналогичные результаты получаются при инкубации гистидина с экстрактами печени. Различие заключается лишь в том, что при ферментативном распаде гистидина в экстрактах печени образуется не одна, а две молекулы аммиака, из которых одна находится в свободном виде и поэтому легко вытесняется даже содой, другая, как и в экспериментах с уроканиновой кислотой, отщепляется лишь при действии едкого натра. Сопоставление этих данных, наряду с количественным переходом гистидина в уроканиновую кислоту под влиянием специфической дезаминазы, как установлено А. Н. Паршиным, является существенным доказательством в пользу промежуточного образования уроканиновой кислоты при обмене гистидина в животном организме.

Важным подтверждением этого положения являются и следующие опыты. Согласно нашим прежним исследованиям (7), продукт распада гистидина, образующийся в результате действия двух ферментов печени —

гистидиндезаминазы и уроканиназы, подвергается в организме дальнейшему распаду под влиянием энзимов почек. Последняя реакция протекает с поглощением кислорода, и одновременно происходит отщепление аммиака и образование аминокислоты. В связи с этим представлялось весьма заманчивым и вполне логичным поставить аналогичные эксперименты с продуктом распада уроканиновой кислоты. Указанные опыты производились нами таким образом.

Предварительно уроканиновая кислота расщеплялась полностью экстрактами печени при стоянии в термостате в течение 20 час. После этого содержимое колбочек центрифугировалось, и в боковую реторточку сосудика Варбурга помещалось 1,5 мл центрифугата, что соответствовало 3 мг распавшейся уроканиновой кислоты. В главный резервуар сосудика Варбурга помещалось 400 мг кашицы почек кошки и 0,6 мл раствора Рингера — Кребса (pH 7,4—7,8). Контрольные эксперименты ставились таким же образом, но в боковые реторточки сосудиков Варбурга добавлялись экстракты печени, инкубированные в термостате в течение 20 час. в отсутствие уроканиновой кислоты. Результаты этой серии опытов, представленные в табл. 2, полностью совпадают с нашими данными, полученными при изучении ферментативного распада гистидина, а именно — продукт превращения уроканиновой кислоты, образующийся в печени, также расщепляется ферментами почек с поглощением кислорода, отщеплением аммиака и образованием аминокислоты.

Опыты на нормальных и опухолевых крысах (табл. 3) равным образом убеждают в том, что уроканиновая кислота является нормальным продуктом энзиматического распада гистидина в животном организме. В самом деле, при подкожном введении уроканиновой кислоты указанным животным она распадается в организме, и ее азот выводится преимущественно в форме мочевины. Как и в опытах с гистидином, наблюдается одновременно повышение количества аминокислоты в моче. Только

Таблица 2

Найдено в мг				Поглощено O ₂ в величинах Q _{O₂}		
N-NH ₃		N-NH ₂		контр.	опыт	разность
Na ₂ CO ₃		Na ₂ CO ₃	NaOH			
0,13	0,31		0,26	5,67	6,77	+1,10
0,10	0,32		0,30	7,63	8,41	+0,78
				5,80	7,44	+1,64

Таблица 3

Число введенных уроканин. к-ты	Общий азот в мг	Азот мочевины в мг	Найдено в мг				Выведено неизмен. уроканин. к-ты в мг	Расщепление уроканин. к-ты по диазореакции в %
			N-NH ₂		N-NH ₂			
			Na ₂ CO ₃	NaOH	Na ₂ CO ₃	NaOH		

Крыса

0	73	35	6,3	6,2	—	6,4		
50	112	81	7,0	6,7		8,5	18,4	63
0	97	64	1,5	1,5		1,1		
50	109	76	1,9	2,0		2,6	10,6	80
0	55	32	2,7	2,8	4,0	4,0		
25	64	41	3,8	3,8	6,6	6,6	6,2	75

Крыса с опухолью (МОП)

0	83	37	6,0	6,0	6,3	6,3		
25	94	59	6,1	6,1	12	12	5,7	77
0	53	28	3,2	3,3	5,3	6,1		
25	88	65	4,7	4,4	10,1	10,1	8,7	65

незначительная часть введенной подкожно уроканиновой кислоты выводится с мочой в неизмененном виде.

В то же время мы должны отметить, что при развитии злокачественных новообразований в организме крысы не наблюдается каких-либо заметных нарушений в обмене уроканиновой кислоты. Сообщенные в настоящей работе результаты, как нам думается, представляют убедительные доводы в пользу того, что главный путь распада гистидина в животном организме осуществляется через уроканиновую кислоту.

Институт онкологии
Академии медицинских наук СССР

Поступило
24 VI 1952

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. Е. Браунштейн, Биохимия аминокислотного обмена, М., 1949.
² S. Edlbacher, *Ergebn. d. Enzymforsch.*, **9**, 131 (1943). ³ W. I. Darby, H. B. Lewis, *J. Biol. Chem.*, **146**, 225 (1942). ⁴ J. Kotake, *Z. physiol. Chem.*, **270**, 38 (1941). ⁵ А. Н. Паршин, *ДАН*, **58**, 1419 (1947). ⁶ S. Edlbacher, H. Bidder, *Z. physiol. Chem.*, **276**, 126 (1942). ⁷ А. Н. Паршин, Т. А. Горюхина, *Биохимия*, **15**, 499 (1950).