

DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DEI DIPEPTIDI ISTIDINICI NEL CERVELLO BOVINO MEDIANTE METODICA HPLC

QUANTITATIVE DETECTION OF HISTIDINE DIPEPTIDES IN BOVINE BRAIN BY AN HPLC METHOD

MICHELE DUCCI ⁽¹⁾, ALBERTO NICCOLINI ⁽²⁾, SARA PACCHINI ⁽³⁾,
ANGELO GAZZANO ⁽¹⁾, CLAUDIO SIGHIERI ⁽¹⁾, FRANCO MARTELLI ⁽¹⁾

RIASSUNTO

La Carnosina (β -Alanil-L-Istidina) e i dipeptidi ad essa correlati (Omocarnosina e Anserina) sono molecole largamente distribuite nei tessuti degli organismi vertebrati, soprattutto in quelli eccitabili come il tessuto muscolare e il sistema nervoso. Nel tessuto nervoso dei vertebrati inferiori (osteitti, anfibi e rettili) sono presenti soprattutto l'Omocarnosina e in misura minore la Carnosina.

Scopo della presente ricerca è stato quello di determinare mediante metodica HPLC le concentrazioni dei dipeptidi istidinici e loro componenti nella corteccia cerebrale e nel cervelletto di 15 bovini (10-12 mesi di età) di ambo i sessi. I dati ottenuti dimostrano che l'Omocarnosina risulta più concentrata (nmoli/g di campione \pm E.S.) nella corteccia ($3506,33 \pm 447,45$) rispetto alla Carnosina ($102,82 \pm 16,18$) ed alla L-Istidina ($2616,93 \pm 116,07$). È stata inoltre osservata una correlazione positiva tra Carnosina ed Omocarnosina ($r = 0,57$, $p < 0,02$) e correlazioni negative tra la Carnosina e la L-Istidina ($r = 0,484$, $p < 0,05$) e tra la Omocarnosina e la L-Istidina ($r = 0,61$, $p < 0,01$). La loro distribuzione % nella corteccia cerebrale è risultata la seguente: 2% Carnosina, 42% L-Istidina e 56% Omocarnosina. Nel cervelletto la presenza di Carnosina è stata dimostrata solamente nel 25% degli animali presi in esame mentre l'Omocarnosina ($517,17 \pm 55,10$) e la L-Istidina ($2093,96 \pm 281,43$) sono state determinate in concentrazioni minori rispetto a quelle osservate nella corteccia cerebrale. Nel cervelletto sono state osservate correlazioni negative tra le concentrazioni di Omocarnosina e L-Istidina ($r = 0,676$; $p < 0,01$) e tra le concentrazioni di L-Istidina presenti nella corteccia e nel cervelletto ($0,64$; $p < 0,01$). La distribuzione % di queste due molecole nel cervelletto era: 20% Omocarnosina e 80% L-Istidina. Infine i livelli di Omocarnosina rilevati nella corteccia e nel cervelletto risultavano essere inversamente correlati ($r = 0,486$; $p < 0,05$).

Nessuna differenza significativa era osservata tra maschi e femmine; con questa metodica di analisi in HPLC, è stato possibile determinare le concentrazioni di questi dipeptidi e della L-Istidina in animali giovani di ambo i sessi appartenenti alla specie bovina.

I dati ottenuti, in questi giovani soggetti, mostrano come l'Omocarnosina sia presente in concentrazioni maggiori nella corteccia rispetto al cervelletto dove è presente in concentra-

⁽¹⁾ Dipartimento di Anatomia, Biochimica e Fisiologia Veterinaria, Direttore Prof. Franco Martelli.

⁽²⁾ Libero professionista.

⁽³⁾ Dottorando in Medicina Veterinaria, Anno 2006.

Si ringrazia la Famiglia Spisni che ha reso possibile la realizzazione di tale lavoro attraverso il contributo erogato in memoria dell'Emerito Professor Dino Spisni.

zione minore di circa sette volte. La Carnosina risulta invece praticamente assente nel cervello mentre la concentrazione di L-Istidina in questo compartimento si riduce di appena il 20%. Questa distribuzione è in accordo con studi effettuati sul ratto (De Marchis et al., 2000) dove è stata osservata mediante metodica di immunoreattività una localizzazione della Carnosina nel cervello dipendente dall'età del soggetto, probabilmente a causa di una evoluzione dell'attività metabolico enzimatica delle cellule gliali e dei neuroni.

In conclusione la determinazione quantitativa in HPLC di questi Dipeptidi nel bovino associata a metodiche immuno istochimiche in giovani e vecchi animali potrebbero essere utili per meglio comprendere la distribuzione quantitativa e il ruolo che questi Dipeptidi hanno in relazione allo sviluppo del sistema nervoso.

Parole chiave: dipeptidi istidinici; sistema nervoso centrale; bovino; HPLC.

SUMMARY

Carnosine (β -Alanyl-L-Histidine) and other related dipeptides, such as Anserine and Homocarnosine are widely distributed in tissues of vertebrate organisms particularly in muscle and nervous tissue. As to cellular localisation of Carnosine related dipeptides in central nervous system of reptiles and amphibians, studies show high concentrations of Homocarnosine and lower concentrations of Carnosine.

The aim of this research was to evaluate by HPLC method the concentrations of Histidinic Dipeptides and their components in 15 samples of bovine's cerebral cortex and cerebellum (male and female, 10-12 months of age). Our data show that in cerebral cortex the concentration (nmol/g of sample \pm E.S.) of Homocarnosine (3506.33 ± 447.45) is higher respect to Carnosine (102.82 ± 16.18) and to L-Histidine (2616.93 ± 116.07). In addition, a positive correlation has been founded between Carnosine and Homocarnosine ($r = 0.57$; $p < 0.02$) and negative correlations between Carnosine and L-Histidine ($r = 0.484$; $p < 0.05$) and between Homocarnosine and L-Histidine ($r = 0.61$ $p < 0.01$). The distribution of these dipeptides and their components in cerebral cortex is: 2% Carnosine, 42% L-Histidine and 56% Homocarnosine.

The presence of Carnosine in cerebellum has been detected only in 25% of all animals and the concentrations of L-Histidine (2093.96 ± 281.43) and Homocarnosine (517.17 ± 55.10) are lower respect to cerebral cortex. The % distribution of these components in cerebellum was: 80% L-Histidine and 20% Homocarnosine. Our data show that in cerebellum a negative correlation exists between Homocarnosine and L-Histidine ($r = 0.676$; $p < 0.01$).

In addition a negative correlations were observed between Homocarnosine concentrations in cerebellum and cerebral cortex ($r = 0.486$; $p < 0.05$). This negative correlation was relieved also for L-Histidine distribution between these compartments (0.64 ; $p < 0.01$).

No significative gender related differences have been founded.

From this study has been possible to find the Histidinic Dipeptides and L-Histidine concentrations by a very simple and rapid HPLC method in young bovine animals.

Our data show clearly that Homocarnosine concentration was higher respect to Carnosine levels in cortex and that Carnosine was practically absent in cerebellum.

In cerebellum Homocarnosine concentrations in all subjects were reduced respect to cerebral cortex (about 7 times less) and also in cerebellum L-Histidine levels were reduced about 20 % respect to cerebral cortex.

These differences of Histidinic Dipeptides distribution could be do probably at the progressive metabolic activity of glial cells and neurones that has been reported in rat brain study

(De Marchis et al., 2000). In this research it has been demonstrated by immunohistochemical method that the brain's concentration of Carnosine increases with age.

In conclusion a quantitative HPLC detection of these Dipeptides in bovine, associated with immunohistochemical methods, in old and young animals could be useful to understand the quantitative distribution and role of these dipeptides in relation to nervous system development.

Key words: Histidinic Dipeptides; Central Nervous System; Bovine; HPLC.

INTRODUZIONE

Dalla scoperta della Carnosina e dei dipeptidi correlati quali Anserina e Omocarnosina sono stati effettuati numerosi studi biochimici in molti vertebrati incluso l'uomo che hanno dimostrato la loro presenza nel sistema nervoso centrale e in vari sistemi sensoriali come il sistema olfattivo e visivo.

La presenza e distribuzione dei diversi dipeptidi è molto variabile tra le diverse classi di vertebrati. Analisi biochimiche effettuate su vertebrati inferiori (osteitti, anfibi e rettili) hanno rilevato primariamente la Omocarnosina e in misura minore la Carnosina (Margolis & Grillo, 1984; Artero et al., 1991).

Nel sistema nervoso degli uccelli sono presenti sia l'Anserina che la Carnosina; il primo è associato alle cellule gliali nel cervello e il secondo ai neuroni dei recettori olfattivi (Biffo et al., 1990); inoltre livelli molto alti di Anserina sono stati riportati essere presenti nella retina degli uccelli (Margolis & Grillo, 1984).

L'Anserina è assente nel SNC dei mammiferi che contiene solamente Omocarnosina e Carnosina (Biffo et al., 1990; Margolis & Grillo, 1984; Nadi & Margolis, 1978; Wideman et al., 1978). Studi effettuati su diverse specie di mammiferi hanno stabilito che la Carnosina è altamente concentrata nel bulbo olfattivo, mentre basse concentrazioni di Carnosina e Omocarnosina sono state rilevate nel cervello e nel midollo spinale (Pisano et al., 1961; Abraham et al., 1962; Cairns et al., 1988). Bassi livelli di Omocarnosina sono inoltre presenti nella retina dei mammiferi (Margolis & Grillo, 1984). La localizzazione della Carnosina e dei dipeptidi correlati nel SNC dei mammiferi coinvolge sia i neuroni che le cellule gliali (Biffo et al., 1990). Recenti studi sulla presenza e funzione di questi dipeptidi nel SNC di mammifero mostra un quadro più dettagliato della loro distribuzione in vivo e forniscono ipotesi sulla loro localizzazione, sintesi, captazione e un loro potenziale ruolo in vitro e in vivo.

Studi sulla distribuzione e localizzazione cellulare della Carnosina e Omocarnosina nel SNC dei mammiferi hanno mostrato l'esistenza di un modello complesso di distribuzione che coinvolge differenti tipi di cellule. La sintesi dei due dipeptidi è ottenuta con la carnosina sintetasi (Kalyankar & Meister, 1959; Skaper et al., 1973; Horinishi et al., 1978) che è stato dimostrato essere presente sia nei neuroni (Harding & Margolis, 1976; Ng et al., 1977; Burd et al., 1982) che nelle cellule gliali (Bauer et al., 1979; Bauer et al., 1982; Hoffmann et al., 1996). Comunque sono state osservate grandi differenze tra questi due tipi di cellule contenenti Carnosina

e/o Omocarnosina relativamente alla loro distribuzione ed alla relativa abbondanza di questi dipeptidi.

Scopo della presente ricerca è stato quello di determinare i dipeptidi istidinici e loro componenti nella corteccia cerebrale e nel cervelletto di bovino con età compresa tra 10 e 12 mesi.

MATERIALI E METODI

Raccolta campioni e processo di estrazione

Per la presente ricerca sono stati utilizzati 15 campioni di cervelletto e di corteccia cerebrale (lobo parietale) prelevati da 15 bovini da carne (9 maschi e 6 femmine di età compresa tra i 10 e i 12 mesi). Il prelievo del campione (resezione con bisturi) è avvenuto direttamente al macello (Stabilimento "Lunigiana Carni", Sarzana, Spezia) 10 minuti dopo la iugulazione dell'animale.

I campioni prelevati erano trasferiti in provette Eppendorf con tappo a vite e conservati in azoto liquido fino al momento dell'analisi. L'estrazione e la solubilizzazione dei dipeptidi istidinici era effettuata su (1g) di campione addizionato con 1 ml di Acido 5-solfosalicilico al 5% (p/v) che era sottoposto a omogeneizzazione con Ultra-Turax T25. L'omogenato era quindi centrifugato a 10700 rpm per 20 minuti, il sovrantante risultante era prelevato, filtrato (diametro di 0,45 μ), diluito 1:4 con 5% di Acido 5-solfosalicilico al 5% e messo in frigo per 15 minuti. Dopo una ulteriore centrifugazione a 12000 rpm per 3 minuti 20 μ l di sovrantante erano iniettati in HPLC.

Strumentazioni e condizioni di sistema

Pompa per HPLC Jasko modello 1580.

Rivelatore a fluorescenza (Jasko modello FP 920) settato sulle lunghezze d'onda di: $\lambda_{ex} = 340$, $\lambda_{ecc} = 445$.

Volume di iniezione = 20 μ l.

Bagno termostatico modello W82 (KW apparecchi scientifici).

Colonna: Xpertek SP-SCX 5 μ (Cobert Associates, Inc).

Fase mobile: 60% di una soluzione costituita da: 5% Acetonitrile - 95% soluzione 6 mM HCl + 0,48 Moli/litro di NaCl; 40% di Metanolo (v/v).

Flusso della fase mobile = 1ml/min.

Derivatizzazione post-colonna con Ortoftaladeide (OPA) alla temperatura di 50 °C ed al flusso di 0,5 ml/min.

Preparazione della soluzione derivatizzante: 15,5 grammi di Acido Borico e 13 grammi di Idrossido di Potassio sono stati disciolti in 500 ml di acqua distillata. Sono stati poi aggiunti 1,5 ml di Brij al 30% (v/v) e 1,5 ml di mercaptoetanolo. A tale soluzioni sono stati aggiunti 100 mg di OPA disciolti in 2,5 ml di metanolo.

Allestimento della curva di taratura

Per tale scopo sono state preparate (tramite diluizioni sequenziali) soluzioni

standard con concentrazioni scalari (125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,9 ng/20 ml) di ciascun Dipeptide.

Reagenti utilizzati

Carnosina, Anserina, Homocarnosina, L-Istidina, 3-metil-L-Istidina, Acido 5-solfo-salicilico (Sigma); Cloruro di Sodio (Fluka); Acido Borico (Sigma); Idrossido di Potassio (C. Erba reagenti), Brij 35, 2-Mercaptoetanololo (Sigma), Metanolo per HPLC (Merck).

RISULTATI

Nella Tab. I sono riportati i singoli valori della Carnosina, Omocarnosina, e L-Istidina nella corteccia cerebrale.

Le concentrazioni medie di queste molecole mostrano una presenza di Omocarnosina molto superiore (circa 40 volte) a quella della Carnosina ed anche alla L-Istidina (circa 1/3). Sono state inoltre osservate una correlazione positiva tra Carnosina ed Omocarnosina ($r = 0,57$; $p < 0,02$) (Fig. 1) e correlazioni negative tra Carnosina verso L-Istidina ($r = 0,484$; $p < 0,05$) e tra Omocarnosina e L-Istidina ($r = 0,61$; $p < 0,01$).

La distribuzione percentuale di queste molecole risultava essere così ripartita: 2% Carnosina, 42% L-Istidina e 56% Omocarnosina.

Nella Tab. II sono riportati i singoli valori della Carnosina, Omocarnosina, e L-Istidina presenti nel cervelletto.

Per quanto riguarda la Carnosina, questa era rilevata solamente in 4 campioni mentre le altre due molecole erano presenti in concentrazioni minori rispetto a quelle osservate nella corteccia ed inoltre la L-Istidina era più concentrata (quattro volte) della Omocarnosina. Nel cervelletto erano osservate correlazioni negative tra le concentrazioni di Omocarnosina e L-Istidina ($r = 0,676$; $p < 0,01$) e tra le concentrazioni di L-Istidina presenti nella corteccia e nel cervelletto (0.64; $p < 0.01$)

Anche i livelli di Omocarnosina rilevati nella corteccia e nel cervelletto risultavano essere inversamente correlati ($r = 0,486$; $p < 0,05$) (Fig. 2).

DISCUSSIONE

Con questa metodica di analisi in HPLC è stato possibile determinare le concentrazioni di questi dipeptidi e della L-Istidina nel tessuto cerebrale di animali giovani di ambo i sessi appartenenti alla specie bovina.

Questi dati mostrano una maggiore presenza di Omocarnosina rispetto alla Carnosina sia nella corteccia che nel cervelletto dove in quest'ultimo la Carnosina risulta pressoché assente. Ciò è in accordo con studi effettuati sul ratto (De Marchis et al., 2000) dove è stata osservata mediante metodica di immuno istochimica una localizzazione della Carnosina nel cervelletto che aumentava con l'età del soggetto,

Tab. I. Singole concentrazioni (nmoli/g) di Carnosina (Carn), Omocarnosina (Homocarn) e L-Istidina (L.Hist) nella corteccia cerebrale di giovane bovino. *Single concentrations of Carnosine (Carn), Homocarnosine (Homocarn) and L-Histidine (L-Hist) in young bovine's cerebral cortex.*

Corteccia Cortex	L-Hist (nmoli/g)	Carn (nmoli/g)	Homocarn (nmoli/g)
1	2662,70	106,12	4779,07
2	2205,14	103,16	3874,67
3	2496,18	137,02	4291,66
4	2469,35	146,75	5672,70
5	2363,83	200,25	4857,28
6	1913,03	64,80	3257,26
7	2288,48	157,13	3850,40
8	2475,26	100,79	5094,61
9	2470,68	227,18	4268,68
10	2400,17	43,08	4182,68
11	2840,16	56,17	4490,92
12	3023,93	48,09	908,34
13	3713,78	28,40	1500,24
14	3045,37	38,17	764,29
15	2885,95	85,15	802,14
Valore Medio Mean Value	2616,93	102,82	3506,33
E.S. / S.E.	116,07	16,18	447,45

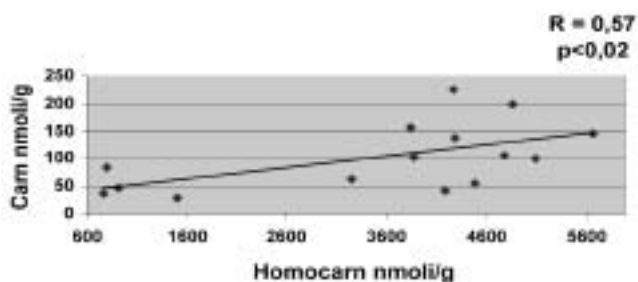


Fig. 1. Retta di correlazione tra le concentrazioni di Carnosina (Carn) e Omocarnosina (Homocarn) nella corteccia. *Regression line between Carnosine (Carn) and Homocarnosine (Homocarn) concentrations in cortex.*

Tab. II. Singole concentrazioni (nmoli/g) di Omocarnosina (Homocarn) e L-Istidina (L. Hist) nel cervelletto di giovane bovino. *Single concentrations of Homocarnosine (Homocarn) and L-Histidine (L-Hist) in young bovine's cerebellum.*

Cervelletto Cerebellum	L-Hist (nmol/g)	Homocarn (nmol/g)
1	3176,12	436,50
2	3453,42	372,19
3	3383,08	297,76
4	3202,67	302,50
5	3202,27	448,19
6	2874,80	512,04
7	2820,28	262,57
8	1549,68	653,80
9	1308,69	448,36
10	1190,99	534,93
11	1020,62	669,15
12	1211,32	912,04
13	946,08	919,44
14	1115,16	357,17
15	954,23	630,89
Valore Medio/ Mean Value	2093,96	2093,96
E.S. / S.E.	281,43	55,10

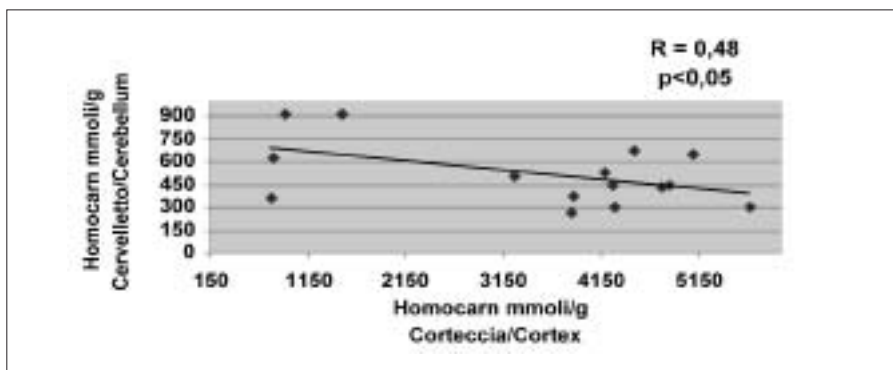


Fig. 2. Retta di correlazione tra le concentrazioni di Omocarnosina nella corteccia e nel cervelletto. / Correlation line between Homocarnosine concentrations in cortex vs cerebellum.

dovuto probabilmente ad una evoluzione della attività metabolico enzimatica delle cellule gliali e dei neuroni.

La presenza dei dipeptidi istidinici in queste zone del sistema nervoso centrale può essere correlata con le attività funzionali del cervello che a loro volta possono essere correlate con il livello della loro attività metabolica e del conseguente stress ossidativo (De Marchis et al., 2000). Inoltre la elevata concentrazione di Omocarnosina nella corteccia cerebrale insieme alla Carnosina, presente in quantità notevolmente inferiore, suggerisce un loro maggiore coinvolgimento in questo comparto rispetto al cervelletto dove molto probabilmente l'attività metabolica aumenta con la maturità del soggetto e nel caso specifico i vitelli utilizzati in questo studio sono da considerarsi giovani.

Inoltre la presenza di dipeptidi istidinici è stata dimostrata (Peretto et al., 1998) nello strato sub-ependimale di topi adulti, una zona, dove la neurogenesi continua durante l'età adulta deponendo a favore di una continua sintesi di queste molecole nelle cellule gliali.

In conclusione la determinazione quantitativa in HPLC di questi Dipeptidi associata a metodiche immuno istochimiche in giovani e vecchi animali potrebbero essere utili per meglio comprendere la distribuzione quantitativa e il ruolo che questi Dipeptidi hanno in relazione allo sviluppo del sistema nervoso nella specie bovina.

BIBLIOGRAFIA

- ABRAHAM D., PISANO J.J., UDENFRIEND S. (1962). The distribution of omocarnosine in mammals. *Arch. Biochem. Biophys.*, 99: 210-213.
- ARTERO C., MARTI E., BIFFO S., MULATERO B., ANDREONE C., MARGOLIS F. L., FASOLO A. (1991). Carnosine in the brain and olfactory system of amphibia and reptilia: a comparative study using immunocytochemical and biochemical methods. *Neurosci. Lett.*, 130: 182-186.
- BAUER K., SALNIKOW J., DEVITRY F., TIXIER-VIDAL A., KLEINKAUF H. (1979). Characterisation and biosynthesis of o-aminoacyl amino acids from rat brain and the C-6 glioma cell line. *J. Biol. Chem.*, 254: 6402-6407.
- BAUER K., HALLERMAYER K., SALNIKOW J., KLEINKAUF H., HAMPRECHT B. (1982). Biosynthesis of carnosine and related peptides by glial cells in primary culture. *J. Biol. Chem.*, 257: 3593-3597.
- BIFFO S., GRILLO M., MARGOLIS F.L. (1990). Cellular localization of Carnosine-like and Anserine-like immuno reactivities in rodent and avian central nervous system. *Neurosci.*, 35: 637-651.
- BURD G.D., DAVIS B.J., MACRIDES F., GRILLO M., MARGOLIS F.L. (1982). Carnosine in primary olfactory system: an autoradiographic and biochemical study. *J. Neurosci.*, 2: 244-255.
- CAIRNS M.T., MILLER D.J., O'DOWD J.J. (1988). Detection and estimation of Carnosine, omocarnosine, N-acetyl Histidine and its 1-methyl derivative in rat brain by analytical HPLC. *J. Physiol.*, 407: 51.
- DE MARCHIS S., MODENA C., PERETTO P., MIGHELI A., MARGORIS F.L., FASOLO A. (2000). Carnosine-related dipeptides in neurons and glia. *Biochemistry (Moscow)*, 65: 824-833.

- HARDING J.W., MARGOLIS F.L. (1976). Denervation in the primary olfactory pathway of mice. III. Effect of enzymes of Carnosine metabolism. *Brain Res.*, 110: 351-360.
- HOFFMANN A.M., BAKARDJIEV A., BAUER K. (1996). Carnosine-synthesis in cultures of rat glial cells is restricted to oligodendrocytes and Carnosine uptake to astrocytes. *Neurosci Lett.*, 215: 29-32.
- HORINISHI H., GRILLO M., MARGOLIS F.L. (1978). Purification and characterisation of Carnosine-synthetase from mouse olfactory bulbs. *J. Neurochem.*, 31: 909-919.
- KALYANKAR G., MEISTER A. (1959). Enzymatic synthesis of Carnosine and related β -alanyl and γ -aminobutyryl peptides. *J. Biol. Chem.*, 234: 3210-3218.
- MARGOLIS F.L., GRILLO M. (1984). Carnosine, Omocarnosine and Anserine in vertebrate retinas. *Neurochem. Int.*, 6: 207-209.
- NG R.H., MARSHALL F.O., HENN F.A., SELSTROM A. (1977). Metabolism of Carnosine and omocarnosine subcellular fractions and neuronal and glial cell-enriched fractions of rabbit brain. *J. Neurochem.*, 28: 449-452.
- PERETTO P., BONFANTI L., MERIGHI A., FASOLO A. (1998). Carnosine-like immunoreactivity in astrocytes of the glial tubes and in newly-generated cells within the tangential part of the rostral migratory stream of rodent. *Neurosci.*, 82: 527-543.
- PISANO J.J., WILSON J.D., COHEN L., ABRAHAM D., UDENFRIEND J. (1961). Isolation of γ -aminobutyryl-Histidine (omocarnosine) from brain. *J. Biol. Chem.*, 236: 499-502.
- SKAPER S.D., DAS S., MARSHALL, F.D. (1973). Some properties of a omocarnosine-Carnosine synthetase isolated from rat brain. *J. Neurochem.*, 21: 1429-1445.