

## КИСЛАЯ ФОСФАТАЗА ГОМОГЕНАТОВ И ЯДЕРНЫХ ФРАКЦИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ СТАРЕНИИ

Г. Г. БУНЯТЯН, А. М. МЕЛИҚЯՆ

Исследованы возрастные особенности кислой фосфатазы в гомогенатах, грубой ядерной фракции мозга и ее субфракциях, выделенных путем дифференциального центрифугирования на сахарозном градиенте при 35000 g. В гомогенатах и грубой ядерной фракции мозга возрастных сдвигов не обнаруживается, тогда как в тяжелых субфракциях (Г и Д) грубой ядерной фракции активность кислой фосфатазы выражено снижается.

*Ключевые слова:* мозг, старение, кислая фосфатаза.

Кислая фосфатаза (КФ), помимо лизосом, обнаруживается и в других субклеточных компонентах [3, 8, 9]. Она интересна не только как маркер лизосом, но и как соединение, активно реагирующее на различные патологические состояния [2, 7].

Изучение возрастной динамики КФ в основном проведено на субклеточных фракциях печени [3]. Исследования, проведенные на супернатантах гомогенатов коры мозга мышей, с 40 до 500 дня особых возрастных сдвигов в активности КФ не обнаружили [11]. По данным Кона и Рихтера [5], активность фермента в коре мозга и таламусе годовалых крыс по сравнению со зрелыми не меняется.

В литературе отсутствуют данные относительно возрастных изменений активности КФ в различных субклеточных фракциях мозга. Исследования в указанном направлении мы начали с изучения фермента в ядерной фракции мозга. Имеющиеся литературные данные свидетельствуют о том, что активность КФ в ядерной фракции печени с возрастом не подвергается выраженным изменениям [3].

*Материал и методика.* Исследования проводились на гомогенатах (после удаления крупных обрывков тканей и целых клеток), грубой ядерной фракции и ее отдельных субфракциях (полученных дифференциальным центрифугированием при 35000 g) мозга 6-месячных (зрелых) и 24-месячных (старых) белых крыс. После декапитации животных и извлечения головного мозга готовили 10%-ный гомогенат на 0,32 М сахарозе в гомогенизаторе Поттера-Эльвегейма при 1400 об/мин. Для удаления обрывков тканей гомогенат центрифугировали при 70 g. Осадок удаляли, а супернатант центрифугировали в течение 20 минут при 1000 g. Полученный осадок суспендировали в 0,32 М сахарозе и рэцентрифугировали при 1000 g в течение 20 минут. Супернатант удаляли, а осадок (грубая ядерная фракция) суспендировали в 0,32 М сахарозе в объеме, равном массе свежей ткани. Для очистки от легких субклеточных фракций грубую ядерную фракцию субфракционировали путем дифференциального

центрифугирования на сахарозном градиенте. Градиент готовили в 37-миллилитровых пробирках путем наслаивания по 7,5 мл 1,4; 1,2; 1,0 и 0,8 М растворов сахарозы. На слой 0,8 М сахарозы наслаивали 5 мл суспензии грубой ядерной фракции, приготовленной на 0,32 М сахарозе. Центрифугирование проводили при 35000 г в течение 2 ч в горизонтальном роторе центрифуги VAC-601. Были получены 5 отчетливых фракций. Фракция А между слоями 0,32 и 0,8 М сахарозы, фракция Б—0,8 и 1,0 М сахарозы, фракция В—1,0 и 1,2 М сахарозы, фракция Г—1,2—1,4 М сахарозы и фракция Д—осадок. Исследования проводили на 2-х последних фракциях (Г и Д)—тяжелых ядерных фракциях. Осадок используемых фракций суспендировали в 0,32 М сахарозе. Белок определяли по методу Лоури и сотр. в модификации Хесс и Левина [6, 10]. Активность КФ определяли по методу Лизмана и сотр. [9]. В качестве субстрата использовали 0,1 М раствор  $\beta$ -глицерофосфата. Неорганический фосфат определяли по методу Чена и сотр. [4], в модификации Венкстерна и Баева [1]. Интенсивность окраски конечного продукта реакции—восстановленного фосфомолибдена—проверяли на спектрофотометре Бекман М-26 при длине волны 820 нм.

*Результаты и обсуждение.* Данные об активности КФ обобщены в табл. 1. Исследования, проведенные на гомогенатах мозга, выявили некоторое снижение количества эндогенного фосфата (на 12,7%) у старых крыс. Фосфат, выделившийся из  $\beta$ -глицерофосфата, у 6- и 24-месячных животных составляет соответственно 11,64 и 11,38  $\gamma$  Фн/мг белка, т. е. не подвергается особым возрастным сдвигам.

Таблица 1

Возрастные сдвиги в активности КФ ( $\gamma$  неорганического фосфора/мг белка 30 мин) в гомогенатах, грубой ядерной фракции и фракциях Г и Д (полученных дифференциальным центрифугированием при фракционировании грубой ядерной фракции при 35000 г) мозга крыс при старении

Фракции	Зрелые			Старые		
	без субстрата	с субстратом	разница	без субстрата	с субстратом	разница
Гомогенат	5,71±0,1 (3)	17,35±0,19 (35)	11,64	5,02±0,1 (30)	16,4±0,21 (25)	11,38
Грубая ядерная фракция	1,02±0,01 (27)	3,93±0,03 (28)	2,91	1,3±0,01 (33)	4,44±0,05 (34)	3,14
Фракция Г	0,99±0,04 (15)	9,26±0,12 (15)	8,27	0,9±0,05 (10)	6,7±0,2 (15) *P < 0,001	5,8
Фракция Д	0,76±0,06 (10)	7,76±0,21 (15)	7,0	0,84±0,04 (15)	5,51±0,12 (15) P < 0,001	4,67

\* P — по сравнению с предыдущим возрастом.

В грубой ядерной фракции по сравнению с гомогенатами наблюдается резкое снижение уровня эндогенного фосфата и активности КФ при использовании  $\beta$ -глицерофосфата (почти в 4 раза). Разница в количестве фосфата, высвобожденного из эндогенных источников и в присутствии  $\beta$ -глицерофосфата, у зрелых животных составляет 2,91  $\gamma$  Фн/мг белка, а у старых—3,14  $\gamma$  Фн/мг белка. Таким образом, как в гомогенатах, так и в грубой ядерной фракции мозга на первый план выступает

стертость возрастных сдвигов в промежутке от 6 до 24 месяцев. Эта закономерность подтверждается данными ряда авторов, проводивших исследования на супернатантах гомогенатов различных частей мозга крыс и мышей с 1-го до 500-го дня жизни [5, 11].

Уровень эндогенного фосфата во фракции Д по сравнению с фракцией Г несколько снижается, что наблюдается также и в показателях активности КФ. Последняя во фракции Г в процессе старения снижается с 8,27 до 5,8  $\gamma$  Фн/мг белка, а во фракции Д — с 7,0 до 5,51  $\gamma$  Фн/мг белка, что составляет в среднем 30%. Уровень эндогенного фосфата в этих фракциях не подвергается возрастным сдвигам. Исследования показали, что выход белка (табл. 2) на единицу свежей ткани как во фракции Г, так и Д в процессе старения не меняется.

Таблица 2  
Выход белка в субфракциях Г и Д грубой ядерной фракции мозга зрелых и старых крыс, мг белка/г свежей ткани

Фракция	Возраст		
	6 месяцев	24 месяца	
Фракция Г	0,805±0,03 (4)	0,895±0,03 (3) P<0,01	0,09
Фракция Д	1,17±0,11 (6)	1,3±0,21 (3) P<0,1	0,13

Как и следовало ожидать, активность КФ в грубой ядерной фракции по сравнению с гомогенатом резко снижается. Интерес представляет относительная стабильность ее в гомогенатах и грубой ядерной фракции наряду с выраженным снижением во фракциях Г и Д при старении. Способность мозга старых животных компенсировать указанный возрастной сдвиг уже на уровне грубой ядерной фракции может быть обусловлена миграцией фермента в другие части клетки, где необходимость в нем в процессе старения возрастает. Для выяснения указанного вопроса необходимо изучение возрастных сдвигов активности КФ и в других субклеточных фракциях головного мозга.

Институт биохимии АН Армянской ССР

Поступило 15.VII 1981 г.

**ԹԹՎԱՅԻՆ ՖՈՍՖԱՏԱԶՁԱՆ ՈՒՂԵՂԻ ՀՈՄՈԳԵՆԱՏՆԵՐՈՒՄ  
ԵՎ ԿՈՐԻՉԱՅԻՆ ՖՐԱԿՏԻԱՅՈՒՄ ԾԵՐԱՅՄԱՆ ԺԱՄԱՆԱԿ**

Գ. Զ. ԲՈՒՆԻԱԹՅԱՆ, Ա. Մ. ՄԵԼԻՔՅԱՆ

*Ուսումնասիրվել է թթվային ֆոսֆատազայի ակտիվությունը հասուն և ծեր առնետների ուղեղի հոմոգենատներում, կոպիտ կորիզային ֆրակցիայում և նրա ծանր սուբֆրակցիաներում:*

Պարզվել է, որ ծեր հասակում հոմոգենատներում և կոպիտ կորիզային ֆրակցիայում ֆերմենտի ակտիվությունը առանձնապես չի փոխվում: Մանր կորիզային սուբֆրակցիաներում թթվային ֆոսֆատազայի ակտիվությունը ծեր կենդանիների մոտ զգալի պակասում է:

## ACID PHOSPHATASE IN HOMOGENATES AND NUCLEAR FRACTIONS OF RAT BRAIN UNDER SENESCENCE

G. H. BUNIATIAN, A. M. MELIKIAN

The activity of acid phosphatase in brain homogenates, crude nuclear fraction and its subfractions of mature and senile rats has been investigated. It is shown that no age dependent changes in the activity of acid phosphatase appear in homogenates and crude nuclear fraction. The enzyme activity declines within 30% in the heavy subfractions of crude nuclear fraction of senile rats.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Венкстерн Т. В., Баев А. А. Биохимия, 22, 1049, 1957.
2. Кондакова А. Е., Тиглиев Г. С. Тез. докл. 2-го Всесоюзн. симп. Структура и функция лизосом, 88, Новосибирск, 1980.
3. Тютельян В. А. Мат-лы конф. по проблеме: питание здорового и больного человека. 4, М., 1968.
4. Chen P. S., Toribara T. Y., Warner H. Analytical Chemistry, 28, 1756, 1956.
5. Cohn P., Richter D. J. J. Neurochemistry, 1, 166, 1956.
6. Hoss H. H., Lewin E. J. Neurochemistry, 12, 205, 1965.
7. Koenig H. In: Lissosomes in biology and pathology. 2 (ed. Dingle J. T. and Honors B. Fell), 6, 111, 1969. •
8. Koenig H., Genes D., McDonald T., Gray R., Scott J. J. Neurochemistry, 11, 729, 1964.
9. Lisman J. J., De Haan J., Overdijk B. O. Biochemical J., 178, 79, 1979.
10. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biological Chemistry 193, 265, 1951.
11. Verity M. A., Brown W. J. J. Neurochemistry, 15, 69, 1968.