

ОКИСЛЕНИЕ ЯНТАРНОЙ И α -КЕТОГЛУТАРОВОЙ КИСЛОТ В НЕКОТОРЫХ ЧАСТЯХ И СУБКЛЕТОЧНЫХ ЧАСТИЦАХ МОЗГА ПРИ СТАРЕНИИ

Ж. А. ПАРОНЯН, Э. Г. АДМИЦ, Г. В. АПРИКЯН, Э. С. АХВЕРДЯН

Институт биохимии АН Армянской ССР, Ереван

Аннотация — Показано, что по мере фракционирования мозговой ткани усиливается окисление янтарной кислоты, достигающее максимума в очищенной митохондриальной фракции. Наблюдаемое в гомогенатах (особенно ствола мозга) снижение интенсивности окисления янтарной кислоты при старении не улавливается во фракциях мозга и печени. Янтарная кислота по сравнению с α -кетоглутаровой является более эффективным субстратом окисления. В синапсомной фракции окисление α -кетоглутаровой кислоты при старении заметно усиливается, а в очищенной митохондриальной изменении выражены слабо.

Անոտացիա — Համեմատական ուսումնասիրությունը պարզել է, որ ուղեղից ստացված ֆրակցիաների զտմանը զուգընթաց ավելանում է ՍԲ օքսիդացման աստիճանը, Համազենատներում, եւ, հատկապես, ցողունի հոմոգենատում ՍԲ-ի օքսիդացման հասակային թուլացում չի նկատվում ուղեղի և լյարդի զտված ֆրակցիաներում: Հետազոտված բոլոր ֆրակցիաներում ՍԲ-ի α -ԿԳ-ի հետ համեմատած օքսիդացման դերադասելի հիմնանրթ է:

α -ԿԳ-ն խթանում է հատուկ և մեր կենդանիների ուղեղի զտված միտոքոնդրիալ ֆրակցիայի նյութությունը, մեր կենդանիների դեպքում՝ որոշ շափով պակաս: Մեր կենդանիների ուղեղի նյարդային վերույթների ֆրակցիայում α -ԿԳ-ն ավելի լավ է օքսիդանում, քան երիտասարդների:

Abstract — The rate of succinate oxidation increased in the course of purification of rat brain subcellular particles.

The intensity of succinate oxidation in the cerebral cortex and especially in the brain stem homogenates decreased significantly, while in brain crude and purified mitochondrial and synaptosomal fractions and in liver mitochondrial fraction it did not change during ageing.

Oxidation of α -ketoglutarate in synaptosomal fraction was enhanced, while in mitochondrial fraction the changes with age were negligible.

Ключевые слова: мозг, старение, янтарная, α -кетоглутаровая кислоты

Глюкоза является основным источником энергии, необходимой для функционирования мозга. Однако в процессе старения ослабляется продукция энергии за счет глюкозы как в целом мозге [9], так и в его субклеточных частях [2], снижается уровень макроэргов [9] и полумакроэргов [5]. Дыхание мозга обеспечивается также окислением конечных продуктов гликолиза [12]. Из субстратов окисления, добавленных к очищенной митохондриальной фракции мозга (ОМФ), максимальное поглощение кислорода вызывает пировиноградная кислота (ПВ) — основной конечный продукт гликолиза. Сопоставимое с ПВ поглощение кислорода дает янтарная кислота (ЯК) [12], которой отводится особая роль в регулировании энергетических процессов организма. Она в значительной степени покрывает энергетические потребности миокарда при

старении, сердечной недостаточности [11]. Однако до сих пор остается не полностью выясненной роль ЯК в энергетическом обеспечении мозга, в особенности его субклеточных частиц, при старении. Цель нашего исследования состояла в выяснении возрастных изменений в интенсивности окисления ЯК и теснейшим образом связанной с нею в обменных процессах α -кетоглутаровой кислоты (α -КГ) в мозге и в некоторых субклеточных частицах его.

Материал и методика. Опыты были поставлены на белых крысах линии Вистар двух возрастных групп: половозрелых (5—6-месячных) и старых (24-месячных).

Животных обезглавливали, извлеченные большие полушария мозга помещали в 0,154 М раствор KCl. Мозг очищали от оболочек и кровеносных сосудов, отделяли кору и ствол мозга и готовили 20%-ный гомогенат на 0,32 М растворе сахарозы. На каждую пробу брали 1 мл гомогената коры или ствола мозга, что соответствовало 200 мг свежего веса. Все процедуры проводили при температуре, близкой к 0°.

Для получения митохондриальной (очищенной и неочищенной) и синапсомной фракций (СФ) из мозга готовили 10%-ный гомогенат на 0,32 М растворе сахарозы, содержащем 1 ммоль ЭДТА, pH 7,4. Неочищенную, очищенную и синапсомную фракции получали из целого мозга (без мозжечка) по ранее описанному методу [6, 11, 13]. На пробу брали 1 мл суспензии, приготовленной на 0,32 М растворе сахарозы, соответствующей 2,6—3,6 мг белка фракции.

Окисление ЯК при старении изучали и в митохондриальной фракции печени, которую выделяли по уже описанной нами методике [4]. На пробу брали 1 мл митохондриальной суспензии, соответствующей 500 мг свежего веса печени. Объем ликубативной смеси во всех случаях доводили до двух мл К-фосфатным буфером, pH 7,4 [3].

Пробы ликубировали в течение 40 мин при 37°. Дыхание определяли манометрическим методом Варбурга, белок—по Лоури [14]. В качестве субстратов окисления использованы ЯК и α -КГ (Sigma, США) в конечных концентрациях 10 ммоль.

Результаты и обсуждение. Полученные результаты свидетельствуют о том, что во всех исследованных нами фракциях, независимо от возраста животных, ЯК является эффективным субстратом окисления (табл. 1, 2). Однако в различных тканевых препаратах ЯК окисляется

Таблица 1. Интенсивность окисления янтарной кислоты в гомогенатах коры и ствола головного мозга белых крыс при старении (мкмоль O_2 /г свежей ткани/30 мин)

Возраст животных	Контроль	Янтарная кислота	
		количество	разница
К о р а м о з г а			
Половозрелые	28.94±0.69 (9)	55.82±0.71 (11)	26.88
Старые	29.0±0.89 (9) P>0.5	49.81±0.49 (12) P<0.001	20.81
С т в о л м о з г а			
Половозрелые	27.19±0.66 (6)	51.76±0.51 (9)	24.57
Старые	21.58±1.44 (6) P<0.005	36.69±0.79 (9) P<0.001	15.11

с разной интенсивностью. Так, если в гомогенатах коры и ствола мозга поглощение кислорода в присутствии ЯК усиливается приблизительно в два раза (табл. 1), в неочищенной митохондриальной фракции мозга—более чем в два раза, в СФ—почти в три раза (2,81 и 2,99), то в ОМФ—7,2 и 8,2 (табл. 2), а в митохондриальной фракции печени—в 9,08 и 9,5 раза (табл. 3) соответственно у половозрелых и старых животных. Сопоставление приведенных данных показывает, что по мере возрастания степени очищенности препаратов повышается интенсивность окисления ЯК, достигая максимума в чистых митохондриальных фракциях.

Таблица 2. Интенсивность окисления янтарной кислоты во фракциях головного мозга белых крыс при старении (экмоль O_2 /100 мг белка/30 мин)

Возраст животных	Контроль	Янтарная кислота	
		количество	разница
Неочищенная митохондриальная фракция			
Половозрелые	30.78±0.64 (9)	62.54±1.03 (9)	38.76
Старые	28.17±0.49 (9) P<0.005	73.39±2.05 (9) P>0.1	45.22
Очищенная митохондриальная фракция			
Половозрелые	22.51±1.38 (8)	162.34±3.65 (9)	139.80
Старые	18.79±0.63 (9) P<0.025	154.96±5.23 (9) P>0.2	136.17
Синапсомная фракция			
Половозрелые	42.77±2.33 (8)	120.36±3.95 (9)	77.59
Старые	37.29±3.29 (6) P>0.1	111.5±5.48 (9) P>0.2	74.21

Возрастные сдвиги в интенсивности окисления ЯК отчетливо выражены в гомогенатах коры и ствола мозга. По сравнению с половозрелыми в гомогенатах коры мозга старых животных окисление ЯК снижается на 22,6%, а в гомогенатах ствола—на 38,5%. Как и в случае с ГК [1], возрастное снижение интенсивности окисления ЯК отчетливо в стволе—более древнем отделе мозга. В остальных исследованных нами фракциях возрастная разница в степени окисления ЯК незначительна. Так, в неочищенной митохондриальной фракции старых животных намечается тенденция к усилению его (16,66%), а в ОМФ и СФ, наоборот, выявлено статистически недостоверное ослабление этого процесса ($P>0,2$ и $P>0,2$) (табл. 2).

В митохондриальной фракции печени ЯК усиленно окисляется как у молодых, так и у старых животных (табл. 3). У старых животных окисление ЯК протекает несколько интенсивнее ($P>0,05$).

Таблица 3. Окисление янтарной кислоты в митохондриальной фракции печени крыс при старении (мкмоль O_2 /100 мг белка/30 мин)

Возраст животных	Контроль	Янтарная кислота	
		количество	разница
Половозрелые	6.6±0.24 (23)	59.98±1.35 (25)	53.38
Старые	6.67±0.38 (18) $P > 0.5$	63.75±1.23 (21) $P > 0.05$	57.08

α -КГ по сравнению с ЯК является менее эффективным субстратом окисления, хотя хорошо окисляется в ОМФ и СФ мозга (табл. 2, 4). У животных обеих возрастных групп α -КГ стимулирует дыхание ОМФ мозга более чем в два раза. Окисление α -КГ у старых животных снижается на 15,06% (табл. 4).

Таблица 4. Интенсивность окисления α -КГ в очищенной митохондриальной и синапсомной фракциях головного мозга крыс при старении (мкмоль O_2 /100 мг белка/30 мин)

Возраст животных	Контроль	α -Кетоглутаровая кислота	
		количество	разница
Очищенная митохондриальная фракция			
Половозрелые	21.16 $\pm$ 0.63 (6)	46.43 $\pm$ 0.52 (8)	25.77
Старые	18.32 $\pm$ 2.04 (5) P $\geq$ 0.2	40.21 $\pm$ 1.33 (6) P $\leq$ 0.01	21.89
Синапсомная фракция			
Половозрелые	36.77 $\pm$ 1.21 (12)	49.51 $\pm$ 1.27 (8)	12.74
Старые	30.75 $\pm$ 0.86 (11) P $\leq$ 0.01	57.35 $\pm$ 1.05 (7) P $\leq$ 0.01	26.6

Как видно из данных, приведенных в табл. 4, эндогенное дыхание СФ мозга при старении снижается на 16,4%. При добавлении α -КГ в инкубационную среду поглощение кислорода стимулируется в зависимости от возраста в разной степени: у молодых дыхание СФ стимулируется на 34,65%, у старых — на 86,5%, т. е. у старых окисление α -КГ протекает значительно интенсивнее. Таким образом, в СФ в отличие от ОМФ к старости окисление α -КГ не только не снижается, а, наоборот, усиливается. Подобные данные о возрастном повышении интенсивности окисления глюкозы получены и в отношении миокарда [7].

Свободные и синапсомные митохондрии не только гетерогенны [15], но и при инкубировании находятся в разных условиях функцио-

пирования [11], что, по-видимому, и составляет основу разнонаправленных изменений в интенсивности окисления α -КГ в ОМФ и СФ при старении. Усиление окисления α -КГ и сравнительно небольшие изменения в эндогенном дыхании свидетельствуют о сохранности функции инкла трикарбоновых кислот СФ в старости. Усиление окисления α -КГ, возможно, имеет и компенсаторное значение. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что α -КГ по сравнению с ЯК является менее эффективным субстратом окисления (табл. 2 и 4), что совпадает с литературными данными [12].

Проведенные исследования заметных возрастных изменений в окислении ЯК на уровне ОМФ и СФ не выявили. Возрастные сдвиги отчетливее выражены в гомогенатах, и в особенности в гомогенатах ствола, что совпадает с полученными ранее результатами опытов с глутаминовой кислотой [1]. Данные о степени возрастных изменений в процессе окисления ЯК и α -КГ позволяют допустить, что при старении появляются ингибиторы изученных процессов, которые по мере фракционирования мозга удаляются, вследствие чего в очищенных фракциях не удастся выявить возрастных сдвигов. О существовании ингибиторов метаболических процессов имеются литературные данные [8].

ЛИТЕРАТУРА

1. Адуни Э. Г., Паронян Ж. А., Априкян Г. В. Биол. ж. Армения, 22, 110—115, 1979.
2. Адуни Э. Г., Паронян Ж. А., Априкян Г. В., Ахвердиан Э. С. Нейрохимия, 4, 428—431, 1985.
3. Априкян Г. В., Шагинян В. А. Вopr биохим. мозга, 5, 17—26, Ереван, 1969.
4. Априкян Г. В., Мкртчян Г. А., Бунятыян Г. Х. Ж. эвол. биохим. и физиол., 7, 5, 467—473, 1971.
5. Априкян Г. В., Паронян Ж. А., Мкртчян Г. А. Нейрохимия, 1, 243—248, 1982.
6. Априкян Г. В., Паронян Ж. А., Мкртчян Г. А., Адуни Э. Г., Мусагян С. С. ДАН АрмССР, 62, 50—53, 1976.
7. Богацкая Л. Н., Вержиковская Н. В. В кн.: Кровообращение и старость, 121—125, Киев, 1965.
8. Дамбинова С. А., Городицкий А. И. Биохимия, 49, 67—74, 1984.
9. Потапенко Р. И. 9-й междунар. конгр. геронт. Тезисы докл., 3, 375, 1972.
10. Фролькис В. В. В кн.: Старение и биологические возможности организма, 116—185, М., 1975.
11. Bradford H. F. J. Neurochem., 16, 675—684, 1969.
12. Clark J. B., Nicklas W. J. J. Biol. Chem., 245, 4724—4731, 1970.
13. Gray E. G., Whitaker V. P. J. Anat. (London), 96, 79—88, 1962.
14. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 265—275, 1951.
15. Neldle A., Van Den Berg C. J., Grinbaum Q. A. J. Neurochem., 16, 225—234, 1969.

Поступило 23.I 1986 г.