

УДК 577.591.481.1.543.865

## СУБКЛЕТОЧНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АМИДНЫХ ГРУПП БЕЛКОВ МОЗГА ПРИ СТАРЕНИИ

АПРИКЯН Г. В., МКРТЧЯН Г. А., ПАРОНЯН Ж. А.

Изучено распределение амидных групп белков и их фракций в надосадочной, очищенной митохондриальной, синаптической, миелиновой фракциях головного мозга, а также надосадочной и митохондриальной фракциях печени белых крыс при старении. Установлено, что содержание трудногидролизуемых фракций белков не подвергается изменению. Легкогидролизуемые амидные группы как в очищенной митохондриальной и миелиновой фракциях мозга, так и в надосадочной и митохондриальной фракциях печени значительно уменьшаются у старых животных. Легкогидролизуемые фракции амидных групп надосадочной и синаптической фракций мозга не подвергаются выраженным возрастным сдвигам.

Обмен белков в мозгу и других органах претерпевает значительные сдвиги при старении организма. Наиболее существенными моментами следует считать изменение синтеза и деградации белков, их атакуемости со стороны тканевых протеолитических ферментов, появление поперечных сшивок между белковыми молекулами и другие изменения, способствующие образованию долгоживущих белковых комплексов [1]. Существенным сдвигам подвергаются и функциональные группы белков, в том числе амидные группы. Амидные группы белков мозга реагируют на различные функциональные состояния ЦНС [2—5]. Они играют определенную роль в образовании и устранении аммиака, содержание которого в старости значительно увеличивается [6—8]. Исследованиями последних лет показано, что возрастное увеличение содержания преформированного аммиака в мозгу не обусловлено процессами его образования. Аммиакообразование из аминокислот, обусловленное в основном глутаматдегидрогеназной реакцией [9, 10] и пурину-нуклеотидным циклом [11, 12], в мозговой ткани выражено снижается [13]. Имеющиеся литературные [6] и полученные нами [10, 13, 14] данные свидетельствуют о том, что увеличение содержания аммиака в мозгу и других органах происходит вследствие ослабления процессов его устрaнения.

Количество амидных групп белков мозга и печени в старости заметно уменьшается. Сдвиги в содержании амидных групп имеют место как в белках целого мозга [15], так и его митохондриальной фракции [16]. С возрастом количество амидных групп белков снижается в во-

дорастворимых и водонерастворимых белках [17, 18]. Имеются данные, указывающие на важную роль дезамидирования белков при старении [18]. Нами были предприняты исследования для выяснения состояния амидированности белков в очищенной митохондриальной, синаптической и миелиновой фракциях головного мозга белых крыс в старческом возрасте. В литературе отсутствовали сведения по этому вопросу. Параллельно проводились исследования на надосадочных фракциях головного мозга и печени, а также митохондриальной фракции печени старых животных.

### Материалы и методы

Опыты проводились на белых крысах двух возрастных групп: молодых (4—6-месячных) и старых (24-месячных).

Животных обезглавливали, извлекали большие полушария мозга и печень, помещали в 0,154 М раствор KCl. Мозг освобождали от кровеносных сосудов и оболочек и готовили 10% гомогенат на 0,32 М растворе сахарозы, содержащей 1 мМ ЭДТА, pH 7,4. Гомогенизацию проводили при движении пестика 12 раз со скоростью 840 об/мин.

Получение надосадочной и неочищенной митохондриальной фракций, дальнейшее разделение последней на очищенную митохондриальную, синаптическую и миелиновую фракции проводили по Whittaker с некоторыми изменениями [19—21].

Печень животного измельчали и гомогенизировали так же, как и мозг. Из гомогената (10%) печени выделяли надосадочную с микросомами и митохондриальную фракции [22].

Для определения амидных групп белки фракции мозга и печени предварительно очищали от азотсодержащих примесей небелковой природы. С этой целью препараты сначала обрабатывали трихлоруксусной кислотой, затем их последовательно промывали органическими растворителями. Полученный сухой препарат использовали для опыта [17].

Амидные группы определяли по количеству аммиака [23], выделившегося при гидролизе 5 мг белка в 2,5 мл 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> при 100° в течение 2 ч [24]. В белках определяли количество суммарных амидных групп (САГ) и их двух фракций: легкогидролизуемых (ЛАГ) и трудногидролизуемых (ТАГ).

### Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что из всех исследованных фракций мозга—надосадочной, очищенной митохондриальной, синаптической и миелиновой—наименьшим содержанием суммарных амидных групп характеризуются белки надосадочной фракции—48,79 мккатом амидоазота на 100 мг белка (табл. 1, 2). В белках остальных фракций содержание САГ примерно одинаковое—55—57 мккатом амидоазо-

та на 100 мг белка, наименьшее содержание ЛАГ (19 мкатом) обнаружено в белках надосадочной фракции, затем в синаптосомной—23,19, очищенной митохондриальной—27,15 и миелиновой—29,32 мкатом. Наименьшее количество ТАГ обнаружено в белках миелиновой фракции—25,99 мкатом, в белках других фракций их содержание близко—29,79—32,18 мкатом. Исходя из имеющихся литературных данных о том, что наибольшей лабильностью обладают ЛАГ, представляет определенный интерес тот факт, что их максимальное содержание было обнаружено в очищенной митохондриальной и миелиновой фракциях.

Таблица 1

Распределение амидных групп белков (мкатом амидо N/100 мг белка) в надосадочной и очищенной митохондриальной фракциях мозга при старении

Надосадочная фракция			Очищенная митохондриальная фракция		
ЛАГ	ТАГ	САГ	ЛАГ	ТАГ	САГ
Молодые крысы					
19,0±0,7 (8)	29,79±1,23 (9)	48,79±0,84 (9)	27,15±2,47 (6)	30,68±1,83 (8)	57,83±4,54 (8)
Старые крысы					
19,09±0,96 (8) p* > 0,5	31,42±1,55 (9) p > 0,4	50,51±2,26 (8) p > 0,2	20,86±0,81 (9) p < 0,05	30,79±1,22 (7) p > 0,5	51,65±0,62 (7) p > 0,2

\* по сравнению с предыдущим возрастом

Таблица 2

Распределение амидных групп белков (мкатом амидо N/100 мг белка) в синаптосомной и миелиновой фракциях мозга при старении

Синаптосомная фракция			Миелиновая фракция		
ЛАГ	ТАГ	САГ	ЛАГ	ТАГ	САГ
Молодые крысы					
23,19±2,06 (6)	32,18±1,63 (8)	55,37±5,02 (8)	29,32±2,07 (7)	25,99±0,69 (9)	55,31±2,70 (9)
Старые крысы					
24,28±2,14 (7) p > 0,5	30,06±0,89 (9) p > 0,2	54,34±4,04 (7) p > 0,2	21,49±2,21 (7) p < 0,025	22,61±2,01 (7) p > 0,1	44,1±1,8 (7) p < 0,01

Результаты опытов показывают, что из-за неравномерных сдвигов амидных групп белков различных фракций мозга при старении наименьшим содержанием САГ характеризуется миелиновая фракция старых животных—44,1 мкатом, а в остальных фракциях количество

САГ примерно одинаковое—50,51—54,34 мкатом. Данные табл. 1, 2 дают представление о том, что уровень ТАГ с возрастом не меняется, вследствие чего их количественное распределение в различных фракциях не претерпевает выраженных изменений при старении. Примечательно, что в отличие от ТАГ количество ЛАГ подвергается значительным изменениям в старости, хотя не во всех изученных фракциях. Так, в надосадочной и синаптической фракциях существенные возрастные сдвиги в ЛАГ обнаружены не были. Представляет несомненный интерес тот факт, что содержание ЛАГ в очищенной митохондриальной и миелиновой фракциях в старости значительно снижается—соответственно на 23,2 и 26,7%. Приведенные данные свидетельствуют о том, что снижение амидных групп белков при старении, ранее установленное на уровне неочищенной митохондриальной фракции [16], происходит в очищенной митохондриальной и миелиновой фракциях, и чем выше уровень ЛАГ, тем больше он подвержен возрастным изменениям. Наши результаты о большей подверженности возрастным сдвигам ЛАГ согласуются с литературными сведениями о том, что при старении количество ЛАГ водорастворимых и водонерастворимых белков мозга снижается [17, 18]. Полученные данные свидетельствуют о том, что снижение ЛАГ характерно в основном для белков очищенной митохондриальной и миелиновой фракций, поэтому изучение амидированности индивидуальных белков мозга, имеющее непосредственное отношение к функциональной деятельности ЦНС, представляет существенный интерес.

Амидные группы белков синаптической фракции не подвергаются особым возрастным сдвигам, что созвучно с полученными ранее результатами относительно меньшей подверженности синаптическим возрастным изменениям. Это касается эффективности различных субстратов в качестве источников энергии для синапсов в старческом возрасте [25, 26].

Содержание ЛАГ белков надосадочной и митохондриальной фракций печени в старческом возрасте снижается соответственно на 30,0 и 29,6% (табл. 3). Однако имеются сведения о том, что количество суммарных амидных групп белков печени в старости не меняется [27]. Наши опыты подтвердили литературные данные, свидетельствующие об уменьшении содержания ЛАГ водорастворимых и водонерастворимых белков печени в старческом возрасте [17]. Таким образом, в отличие от субклеточных фракций мозговой ткани во всех изученных фракциях печени содержание ЛАГ претерпевает возрастные сдвиги.

Ряд исследователей показал, что белки подвергаются посттрансляционному неферментативному дезамидированию. Установлено также, что при старении уменьшение количества амидных групп белков становится причиной увеличения их атактогенности протеолитическими ферментами [17, 18]. В связи с этим можно заключить, что снижение в старческом возрасте ЛАГ в очищенной митохондриальной и миелиновой фракциях мозга и во фракциях печени приводит к усилению ата-

Распределение амидных групп белков (мкатом амидо N/100 мг белка) во фракциях печени при старении

Надосадоочная фракция			Митохондриальная фракция		
ЛАГ	ТАГ	САГ	ЛАГ	ТАГ	САГ
Молодые крысы					
12,61±0,29 (15)	32,52±0,59 (15)	45,13±0,28 (15)	14,26±0,36 (15)	34,68±0,44 (15)	48,94±0,40 (15)
Старые крысы					
8,81±0,18 (13) p<0,001	34,84±0,68 (12) p<0,025	43,65±0,63 (12) p<0,05	10,03±0,13 (12) p<0,001	37,79±1,27 (12) p<0,05	47,82±1,47 (12) p>0,2

куемости белков, а в синапсосомной и надосадоочной фракциях белки сохраняют свою относительную стабильность к действию протеолитических ферментов. Для окончательного выяснения этого вопроса необходимы более детальные исследования на уровне индивидуальных белков субклеточных частиц мозга.

## SUBCELLULAR DISTRIBUTION OF PROTEIN AMIDE NITROGEN OF BRAIN IN SENESCENCE

APRIKIAN G. V., MKRTCHIAN G. A., PARONIAN J. A.

Institute of Biochemistry, Armenian SSR Academy of Sciences, Yerevan

The distribution of amide groups of proteins in different subcellular fractions of brain and liver of aging rats was studied. The experiments were carried out with the supernatant, purified mitochondrial, synaptosomal, myelin fractions of brain and supernatant and mitochondrial fraction, of liver.

It is stated that the content of hardly hydrolysing fractions of proteins were unchanged. Easily hydrolysing amide groups are significantly decreased in purified mitochondrial and myelin fractions of brain and in liver supernatant and mitochondrial fraction of senile animals, while in brain supernatant and synaptosomal fraction no age related changes were detected.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Парина Е. В.—В кн.: Возраст и обмен белков, Харьков, Изд-во ХГУ, 1967.
2. Врба Р. Успехи совр. биол., 41, 321—352, 1956.
3. Гершенович Э. С., Кричевская А. А., Лукаш А. И., Ходыкина Н. А.—В кн.: 3-я Всес. конф. по биохимии нервной системы (под ред. А. В. Палладина и Г. Х. Буянтына), Ереван, Изд-во АН АрмССР, с. 91—101, 1963.
4. Арутюнян А. В., Микаелян Э. М. Вопросы биохимии мозга, Изд-во АН АрмССР, 1, 113—116, 1964.

5. Мартинсон Э. Э., Тяхепылд Л. Я. Рефераты 5 Междунар. биох. конгр., М., 1, 51, 1961.
6. Гордиенко Э. А. Ж. эвол. биохим. и физиол., 3, 314—320, 1967.
7. Бунятыан Г. Х., Априкян Г. В., Мкртчян Г. А. Вопросы биохимии мозга, Изд-во АН АрмССР, 6, 87—108, 1970.
8. Kirzinger S. S., Fonda M. L. Exp. Geront., 13, 255—257, 1978.
9. Браунштейн А. Е., Азарх Р. М. Биохимия, 9, 337, 1944.
10. Априкян Г. В., Шагинян В. А. Вопросы биохимии мозга, Изд-во АН АрмССР, 8, 91—105, 1973.
11. Setlow B., Burger R., Lowenstein G. M. J. Biol. Chem., 241, 1244—1245, 1966.
12. Бунятыан Г. Х., Арутюнян А. В. Вопросы биохимии мозга, Изд-во АН АрмССР, 4, 29—39, 1968.
13. Мкртчян Г. А., Априкян Г. В., Паронян Ж. А. Ж. эвол. биохим. и физиол., 17, 176—181, 1981.
14. Шагинян В. А., Бунятыан Г. Г., Априкян Г. В. ДАН АрмССР, 62, 178—183, 1976.
15. Гордиенко Э. А. 1-й Всес. биохим. съезд, тез. докл., М.—Л., Изд-во АН СССР, 2, с. 124, 1963.
16. Гордиенко Э. А. Ж. эвол. биохим. и физиол., 3, 35—39, 1967.
17. Кричевская А. А., Лукаш А. И., Пушкина Н. В., Шерстнев К. Б., Менджерцицкий А. М., Вовченко И. Б. Вопросы биохимии мозга, Изд-во АН АрмССР, 13, 127—137, 1978.
18. Кричевская А. А., Лукаш А. И., Пушкина Н. В., Шепотиновская И. В., Кизельштейн А. Л. Всесоюз симп. «Молекулярные и клеточные механизмы старения», тез. докл., Киев, с. 93—95, 1981.
19. Gray E. A., Whittaker V. P. J. Anat. (London), 96, 79—88, 1962.
20. Bradford H. F., Bennet J. M., Thomas A. J. J. Neurochem., 21, 495—505, 1973.
21. Априкян Г. В., Паронян Ж. А., Мкртчян Г. А., Мусаелян С. С. ДАН АрмССР, 62, 50—53, 1976.
22. Априкян Г. В., Мкртчян Г. А., Бунятыан Г. Х. Ж. эвол. биохим. и физиол., 7, 467—472, 1971.
23. Силакова А. И., Труш Г. П., Являкова А. Вопросы мед. химии, 8, 538—544, 1962.
24. Vrba R., Kothary K. J. Neurochem., 8, 65—71, 1961.
25. Априкян Г. В., Шагинян В. А., Паронян Ж. А., Мкртчян Г. А., Адунц Э. Г., Ахвердян Э. С., Меликян А. М. 4-й Всесоюз. биохим. съезд, тез. научн. сообщ., Л., Наука, 2, 144—145, 1979.
26. Априкян Г. В., Паронян Ж. А., Мкртчян Г. А., Адунц Э. Г. Всесоюз. симп. «Молекулярные и клеточные механизмы старения», тез. докл., Киев, с. 13—14, 1981.
27. Гордиенко Э. А.—В сб.: Молекулярная биология старения, Киев, Наукова думка, с. 74—78, 1969.

Институт биохимии АН Армянской ССР,  
Ереван

Поступила 22. III 1982