

БИОХИМИЯ

УДК 577.7:611.36.612.015.33

Г. В. Априкян, Г. А. Мкртчян

Дыхание, содержание дикарбоновых аминокислот, глутаминна  
 и образование аммиака в митохондриях печени белых крыс  
 в зависимости от возраста

(Представлено академиком АН Армянской ССР Г. Х. Бунятыном 16/XII 1970)

В раннем постнатальном онтогенезе происходит заметное усиление окислительных процессов в печени (1-3). По нашим данным, при использовании в качестве субстрата окисления глутаминовой кислоты (ГК) интенсивность дыхания митохондрий печени возрастает в основном до 10-дневного возраста. Имеются данные, что интенсивность дыхания гомогенатов и митохондрий печени при использовании различных субстратов, в том числе и ГК, при старении не претерпевает заметных изменений (4-6). Однако наши исследования показали, что у старых животных окисление ГК заметно усиливается. АДФ у всех возрастных групп значительно стимулирует окисление ГК, этот эффект АДФ при старении проявляется в меньшей степени, что выражается в заметном снижении величины коэффициента регуляции дыхания.

Содержание дикарбоновых аминокислот в печени в течение первой недели жизни не изучено, имеется лишь указание, что в период от 10-15-дневного возраста до половой зрелости их количество не претерпевает заметных изменений (7-9). По данным Париной и Мышченко, уровень дикарбоновых аминокислот в целой печени при старении белых крыс по сравнению с половозрелым возрастом заметно снижается (8,9).

В литературе отсутствуют сведения относительно эндогенного дыхания, содержания дикарбоновых аминокислот и процессов образования аммиака в митохондриях печени в течение всего постнатального периода развития. Опыты были поставлены нами на белых крысах в возрасте 1; 10; 21; 90; 360 и 720 дней. Для каждой пробы использовали 1 мл митохондриальной взвеси, которая соответствовала 500 мг свежей ткани печени, инкубировали в специально подобранном нами К-фосфатном буфере (10). АДФ и малонат добавляли к реакционной смеси 2 и 20 мМ соответственно (конечная концентрация). Инкубацию проводили в атмосфере кислорода при 37° в течение 40 минут. Данные выражали в  $\mu\text{моль/г}$  свежей ткани/40 минут. Аминокислоты определяли

методом электрофореза на бумаге (11), аммиак и глутамин—микродиффузионным методом (12), поглощение кислорода—манометрическим методом Варбурга.

Результаты наших исследований показали, что интенсивность эндогенного дыхания митохондрий печени белых крыс в значительной степени усиливается до 21-дневного возраста, однако наиболее сильное его возрастание происходит к 10-му дню (табл. 1). В наших других иссле-

Таблица 1

Дыхание митохондрий (мкмоль/г свежей ткани/30 минут) печени белых крыс в зависимости от возраста

Возраст, дни	Контроль	АДФ		Малонат		АДФ+малонат	
		количество	разница с контролем	количество	разница с контролем	количество	разница с АДФ
<1	1,07±0,04 (4)	1,05±0,08 (4)	-0,02	0,22±0,02 (4)	-0,85	0,13±0,02 (4)	-0,92
10	7,19±0,40 P<0,001 (11)	7,63±0,14 (12)	+0,44	0,83±0,01 (6)	-6,36 P<0,001	1,19±0,13 (8)	-6,44 P<0,001
21	10,07±1,03 P<0,05 (9)	10,37±1,05 (12)	+0,30	1,21±0,13 (4)	-8,86 P<0,05	0,96±0,10 (4)	-9,41 P<0,025
90	7,04±0,36 P<0,025 (10)	7,14±0,34 (10)	+0,10	0,76±0,13 (4)	-6,28 P=0,05	0,66±0,09 (4)	-6,46 P<0,05
360	10,5±0,5 P=0,005 (14)	10,43±0,28 (9)	-0,07	1,83±0,13 (5)	-8,67 P=0,05	1,51±0,18 (5)	-8,92 P<0,05
720	7,21±0,30 P=0,01 (10)	7,27±0,30 (6)	+0,06	1,49±0,15 (4)	-5,72 P<0,05	1,32±0,18 (4)	-5,95 P=0,025

дованиях также было показано, что дыхание митохондрий печени при использовании в качестве субстрата окисления ГК усиливается в основном до 10-дневного возраста. Как видно из табл. 1, дыхание митохондрий печени у половозрелых животных (90 дней) по сравнению с 21-дневными заметно снижается, у годовалых снова возрастает, приближаясь к уровню 21-дневных, а при старении в значительной степени падает. Эти данные согласуются с результатами наших исследований, свидетельствующих о том, что потенциальные возможности митохондрий печени к окислению добавленной ГК заметно снижаются к старости. Однако они находятся в противоречии с результатами ряда авторов, которым не удалось получить какие-либо сдвиги в интенсивности дыхания гомогенатов и митохондрий печени при использовании различных субстратов, в том числе и ГК (1-6). Исходя из этих результатов

Стрелер и сотр. приходят к ошибочному заключению, что митохондрии печени при старении остаются молодыми (6). Полученные нами данные согласуются с результатами других исследователей, показавших, что в печеночной ткани при старении происходят значительные изменения, выражающиеся в уменьшении количества паренхиматозных клеток, появлении гигантских ядер, уменьшении количества митохондрий и увеличении их размеров (13-14).

Как видно из табл. 1, на всем протяжении постнатальной жизни белых крыс АДФ не оказывает существенного влияния на эндогенное дыхание. С другой стороны, начиная с новорожденного возраста, малонат оказывает сильное ингибирующее действие на эндогенное дыхание. Соответствующие расчеты показывают, что ингибирование дыхания малонатом у 1; 10; 21; 90; 360 и 720-дневных животных составляет соответственно 79,4; 88,5; 88,0; 89,2; 82 и 79,3%, т. е. эффект малоната несколько усиливается к 10-дневному возрасту, остается на этом уровне до половой зрелости и постепенно снижается до старости. Подавляющее действие малоната на эндогенное дыхание сохраняется и в присутствии АДФ.

В митохондриях печени количество ГК и аспарагиновой кислоты (АК) значительно увеличивается к 10-му дню, остается без изменения до половой зрелости, после чего постепенно снижается и достигает минимальной величины у старых особей, однако следует отметить, что более выраженное снижение наблюдается в содержании АК (табл. 2).

Таблица 2

Количественные сдвиги в содержании глютаминовой, аспарагиновой кислот, глутаминна и аммиака (мкмоль/г свежей ткани) в митохондриях печени белых крыс в зависимости от возраста

Аминокислоты, глутамин и аммиак	Возраст, дни					
	<1	10	21	90	360	720
Глутаминовая кислота	0,23±0,02 (9)	0,40±0,03 P<0,01 (15)	0,38±0,02 P>0,5 (12)	0,40±0,03 P>0,5 (15)	0,35±0,01 P>0,1 (12)	0,34±0,01 P>0,2 (18)
Аспарагиновая кислота	0,26±0,02 (9)	0,49±0,02 P<0,001 (15)	0,47±0,04 P>0,5 (18)	0,41±0,01 P>0,1 (12)	0,30±0,02 P<0,001 (13)	0,24±0,01 P<0,01 (18)
Глутамин	0,43± 0,023 (5)	0,59±0,04 P<0,005 (9)	0,48±0,05 P=0,1 (9)	0,73±0,03 P<0,005 (10)	0,47±0,04 P<0,001 (11)	0,37±0,04 P=0,05 (10)
Аммиак	0,29±0,02 (8)	0,35±0,03 P=0,05 (9)	0,29±0,03 P>0,1 (11)	0,33±0,03 P>0,2 (11)	0,48±0,04 P<0,01 (16)	0,52±0,03 P=0,4 (15)

Наши данные о количественных сдвигах в содержании ГК и АК при старении согласуются с результатами других авторов, в исследованиях которых отмечалось понижение уровня указанных аминокислот в пече-

Таблица 3

Аммиакообразовательная функция (мкмоль/г свежей ткани/40 минут)  
митохондрий печени белых крыс в зависимости от возраста

Возраст, дни	До инкубации	После инкубации							
		Контроль		АДФ		Малонат		АДФ+малонат	
		количество	разница	количество	разница с контролем	количество	разница с контролем	количество	разница с АДФ
1	0,29±0,02 (8)	0,76±0,06 (6)	+0,47	2,16±0,14 (4)	+1,40	0,91±0,04 (5)	+0,15	2,24±0,1 (4)	+0,08
10	0,35±0,03 (9)	1,14±0,04 (9)	+0,79 P<0,001	2,95±0,10 (10)	+1,81 P<0,005	1,20±0,03 (7)	+0,06	3,11±0,08 (10)	+0,16
21	0,29±0,03 (11)	1,36±0,07 (8)	+1,07 P<0,01	3,08±0,09 (8)	+1,72 P>0,2	1,24±0,07 (8)	-0,12	3,11±0,11 (10)	+0,03
50	0,33±0,03 (10)	1,59±0,09 (10)	+1,26 P>0,05	3,80±0,23 (10)	+2,21 P<0,005	1,66±0,17 (6)	+0,07	3,74±0,13 (8)	-0,06
360	0,48±0,04 (16)	1,77±0,09 (11)	+1,29 P>0,5	3,48±0,18 (10)	+1,71 P<0,01	2,01±0,04 (6)	+0,24	3,91±0,37 (6)	+0,43
720	0,52±0,03 (15)	1,82±0,08 (12)	+1,30 P>0,5	3,81±0,18 (8)	+1,99 P>0,05	1,90±0,12 (6)	+0,08	4,27±0,17 (6)	+0,46

ни в этом возрасте. Было высказано предположение, что уменьшение содержания ГК и АК в печени при старении в основном обуславливается понижением проницаемости клеточных мембран в отношении этих аминокислот (19). Однако наши исследования показали, что при добавлении к инкубационной среде ГК без АДФ поглощение кислорода митохондриями печени при старении заметно усиливается, свидетельствуя о том, что проницаемость митохондрий в отношении ГК при старении не ухудшается.

При инкубации митохондрий печени количество ГК в них несколько уменьшается и соответственно увеличивается АК, однако в возрастном аспекте особых закономерностей в этом процессе нами не было обнаружено.

Содержание глутамина в митохондриях печени с момента рождения до 10-дневного возраста заметно увеличивается, остается без каких-либо изменений к 21-му дню, а в период половой зрелости несколько увеличивается.

Содержание свободного аммиака повышается к 10-му дню и на этом уровне сохраняется до половой зрелости. В митохондриях печени при старении по сравнению с половозрелым возрастом содержание глутамина значительно уменьшается и соответственно увеличивается количество свободного аммиака (табл. 2). Эти данные свидетельствуют, что глутаминсинтетазная активность митохондрий печени к старости заметно снижается.

При инкубации митохондрий отмечается некоторое снижение в них глутамина, которое не подвергается особым возрастным изменениям.

В митохондриях печени новорожденных крыс при инкубации в течение 40 минут образуется определенное количество аммиака из эндогенных источников, интенсивность которого заметно увеличивается до 10-дневного возраста, к 21-му дню продолжается некоторое усиление этого процесса, а в последующем никаких сдвигов не обнаруживается (табл. 3). При добавлении к инкубационной среде АДФ наблюдается значительное образование аммиака из него, интенсивность которого заметно возрастает до 10-дневного возраста, а у более старших возрастных групп, вплоть до наступления старости заметных сдвигов не обнаруживается. Данные табл. 3 также показывают, что у всех возрастных групп малонат не оказывает существенного влияния на образование аммиака из эндогенных источников и АДФ. Интенсивное образование аммиака из АДФ свидетельствует, что в балансе образования аммиака из эндогенных источников аденин-нуклеотиды могут играть определенную роль. Продукция аммиака из эндогенных источников и АДФ при старении поддерживается на высоком уровне, однако нами показано, что при определенных условиях ГК продуцирует значительное количество аммиака, интенсивность которого заметно снижается к старости.

Полученные нами результаты позволяют заключить, что дыхание митохондрий печени, содержание в них дикарбоновых аминокислот, аммиака и глутамина способны образования аммиака из эндогенных

источников и АДФ достигают «взрослого уровня» к 10-дневному возрасту, а в период старения в значительной степени онижаются: величина эндогенного дыхания, количество ГК, АК и глутамина; содержание свободного аммиака заметно увеличивается, а интенсивность образования свободного аммиака из эндогенных источников и АДФ особым изменениям не подвергается.

Институт биохимии  
Академии наук Армянской ССР

Գ. Վ. ԱՊՐԻՆՅԱՆ, Գ. Հ. ՄԿԻՏՅԱՆ

Շնչառությունը, երկարրոնային ամինաթթուների, գլուտամինի պարունակությունը և ամոնիակի առաջացումը սպիտակ առնետների լյարդի միտոքոնդրիաներում՝ կախված հասակից

Ստացված տվյալները վկայում են այն մասին, որ սպիտակ առնետների լյարդի միտոքոնդրիաների շնչառությունը, երկարրոնային ամինաթթուների ամոնիակի ու գլուտամինի պարունակությունը, ամոնիակի առաջացումը էնդոգեն աղբյուրներից և ադենոսինդիֆոսֆատից (ԱԴՖ) α հասուն մակարդակին են հասնում 10-օրեկան հասակում:

Սերացման ընթացքում մեծ չափով թուլանում է էնդոգեն շնչառությունը և իջնում է երկարրոնային ամինաթթուների ու գլուտամինի քանակը, այնինչ ազատ ամոնիակի քանակը զգալի բարձրանում է, իսկ էնդոգեն աղբյուրներից և ԱԴՖ-ից ազատ ամոնիակի առաջացումը առանձին փոփոխության չի ենթարկվում:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- <sup>1</sup> W. W. Westerfeld, D. A. Richter, J. Biol. Chem., 184, 163 (1950). <sup>2</sup> J. F. Roux, A. Dinnerstein, S. L. Romney, Nature, 194, 875 (1963). <sup>3</sup> C. A. Lang, Biochem. J., 95, 365 (1965). <sup>4</sup> C. H. Barrows, M. J. Ylengst, N. W. Shock, J. Geront., 13, 351 (1958). <sup>5</sup> E. C. Weinbach, J. Garbus, J. Biol. Chem., 234, 412 (1959). <sup>6</sup> Ph. H. Gold, M. V. Gee, B. L. Strehler, J. Geront., 23, 509 (1968). <sup>7</sup> M. S. Dunn, E. A. Murphy, Cancer Res., 18, 569 (1958). <sup>8</sup> E. B. Парина, Материалы симп. по осн. пробл. возр. физиол. и биох., Изд. ХГУ, 22, 1965. <sup>9</sup> E. B. Парина и В. П. Мышченко, Ж. эвол. биох. и физиол., 2, 439 (1966). <sup>10</sup> Г. В. Априкян и В. А. Шагинян, Вопросы биохимии мозга, Изд. АН Арм ССР, 5, 17, 1969. <sup>11</sup> W. Grassmann, E. Hanning, M. Plockl, Z. Physiol. Chem., 299, 258 (1955). <sup>12</sup> А. И. Сулакова, Г. П. Труш и А. Яволякова, Вopr. мед. химии, 5, 539 (1962). <sup>13</sup> H. Taucht and T. Sato, J. Geront., 17, 254 (1962). <sup>14</sup> H. Taucht and T. Sato J. Geront., 23, 454 (1968).