

Wpływ α -ketoglutaranu (AKG) na behavior starzejących się myszy laboratoryjnych

Tomasz Niemieć¹, Klara Zglińska^{1#}, Wiesław Świderek²,
Weronika Górecka¹, Magdalena Matusiewicz¹, Andrzej Łozicki¹,
Iwona Kosieradzka¹, Stefan Pierzynowski³

¹Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Nauk o Zwierzętach,
Katedra Żywienia i Biotechnologii Zwierząt,
ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; e-mail: klara_piotrowska@sggw.pl

²Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Nauk o Zwierzętach,
Katedra Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt,
ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

³Lund University, Department of Cell and Organism Biology,
Sölvegatan 35/37, 223 62 Lund, Szwecja

Starzenie jest złożonym procesem fizjologicznym, charakteryzującym się stopniową utratą funkcjonalności komórek, tkanek i narządów. W konsekwencji przyczynia się do licznych chorób, m.in. układu sercowo-naczyniowego, cukrzycy i neurodegeneracji. Zmiany w funkcjonowaniu układu nerwowego mogą z kolei prowadzić do zaburzeń behawioralnych i psychologicznych. Ostatnie wyniki badań dowodzą, że α -ketoglutaran (AKG), który jest kluczowym intermediatem cyklu Krebsa, wydłuża życie dorosłych organizmów zwierzęcych. Celem przeprowadzonego doświadczenia była ocena wpływu AKG na behavior myszy laboratoryjnych w teście otwartego pola. Wyniki wskazują, że forma sodowa AKG zwiększa u badanych zwierząt eksplorację percepcyjno-ruchową (wyrażoną liczbą stójek wykonanych przez myszy), tłumiąc jednocześnie zachowania lękowe.

SŁOWA KLUCZOWE: starzenie / α -ketoglutaran / AKG / zachowanie się / test otwartego pola

Starzenie jest złożonym procesem fizjologicznym, charakteryzującym się stopniowym pogorszeniem funkcji narządów. Proces ten postępuje wraz z upływem czasu, utrudniając utrzymanie homeostazy organizmu. W przypadku człowieka starzeniu najczęściej towarzyszą zmiany patologiczne, oprócz zmian narządowych wynikających z upływu lat pojawiają się także choroby współistniejące. Jednymi z najdotkliwszych schorzeń z tym związanych są choroby neurodegeneracyjne, które niejednokrotnie uniemożliwiają samodzielnie funkcjonowanie osób w podeszłym wieku. Do zmian, które pojawiają się w układzie nerwowym osób starszych (także tych, u których proces ten nie przebiega patologicznie) zalicza się między innymi: spowolnienie przewodzenia impulsów nerwowych w układzie

nerwowym, zmniejszenie odpowiedzi na stymulację β -adrenergiczną oraz zwiększenie sztywności naczyń krwionośnych, także w mózgu [2, 11]. U starzejących się zwierząt wykazano dysfunkcję systemu obrony antyoksydacyjnej przy jednoczesnym zwiększeniu generacji reaktywnych form tlenu w obrębie mitochondriów oraz produktów peroksydacji lipidów, jako skutku zachwiania homeostazy oksydoredukcyjnej [11]. Liczne badania wskazują również, że reaktywne formy tlenu przyczyniają się do rozwoju wielu chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera, stwardnienie zanikowe boczne, choroba Parkinsona, stwardnienie rozsiane, choroba Huntingtona i inne [3].

Od lat prowadzone są badania koncentrujące się na poszukiwaniu związków biologicznie czynnych mogących zapobiec procesom starzenia komórkowego, najlepiej poprzez łagodzenie przyczyn jego powstawania, a zwłaszcza produkcji nadmiernej ilości utleniaczy i przeciwdziałania skutkom ich aktywności. Alfaketoglutaran (AKG) jest cząsteczką wyznaczającą tempo przemian w cyklu kwasów trikarboksylowych w organizmie. Powszechnie znany zmiatacz grup aminowych stymuluje syntezę białek, a zarazem hamuje degradację białek w mięśniach. AKG jako źródło glutaminianu i glutaminy jest najważniejszym „paliwem” dla komórek nabłonka układu pokarmowego [12]. AKG odgrywa także ważną rolę jako antyoksydant, biorąc udział w nieenzymatycznej dezaktywacji nadtlenu wodoru. Badania ostatnich lat wykazały, że AKG może także zwiększać długość życia u starzejących się zwierząt laboratoryjnych, hamując procesy degeneracyjne między innymi w układzie nerwowym [1, 6, 7].

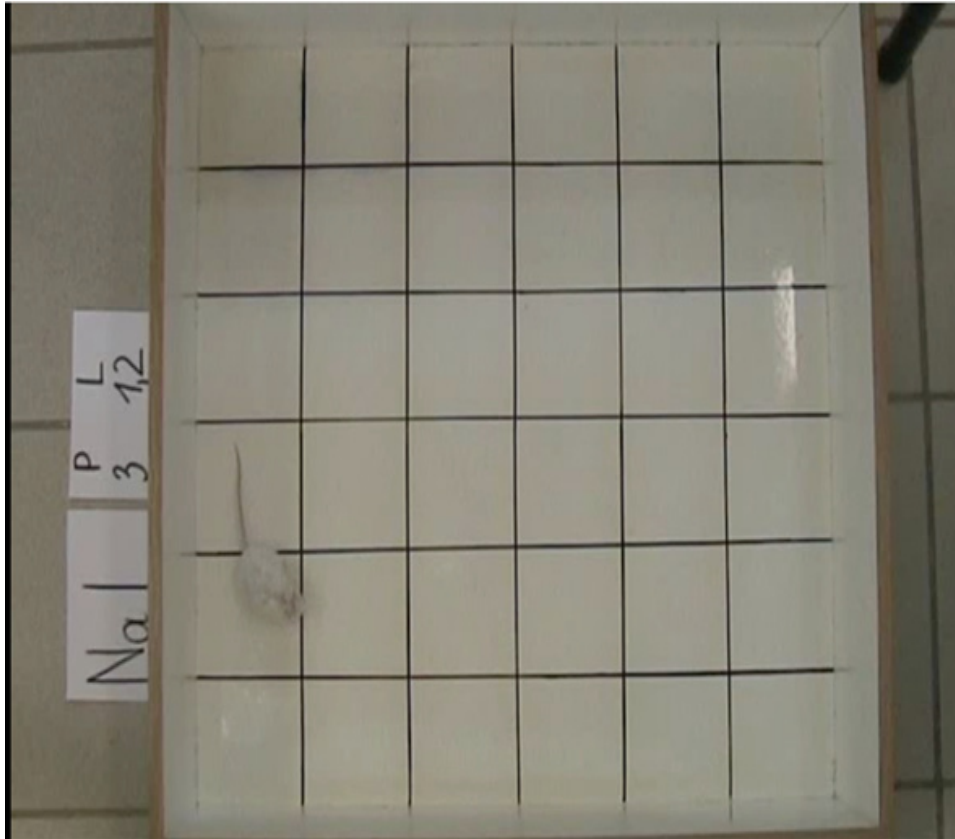
Przeprowadzono badania, których celem była ocena wpływu AKG dodanego do mieszanki paszowej na behavior starzejących się myszy na podstawie przeprowadzonego testu otwartego pola.

Material i metody

Doświadczenie przeprowadzono na myszach laboratoryjnych pochodzących z Katedry Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Do doświadczenia wybrano samce w wieku 12 miesięcy. Myszy utrzymywane były w warunkach standardowych. Stosunek dnia do nocy wynosił 12/12 godzin, temperatura 22°C i wilgotność 60%. Zwierzęta w grupie kontrolnej (K) żywione były *ad libitum* standardową karmą (Labofeed H Kcynia, Polska). Wyróżniono dwie grupy doświadczalne – P1 i P2, w których karmy zawierały odpowiednio 2% soli wapniowej AKG (Ca-AKG) i 2% soli sodowej AKG (Na-AKG). Udział dodatku został ustalony na podstawie wyników badań na trzodzie chlewnej i szczurach [5, 8]. Pod koniec doświadczenia grupę kontrolną (K) i grupę P2 stanowiło 8 myszy, a grupę P1 – 10 myszy. W trakcie doświadczenia niektóre zwierzęta padły z przyczyn naturalnych (starość), co zostało stwierdzone na podstawie sekcji wykonanej przez lekarza weterynarii.

W celu dokonania oceny behawioralnej zwierząt zastosowano test otwartego pola. Badanie to jest testem zoopsychologicznym jakościowo-ilościowym wykorzystywanym do pomiaru aktywności ruchowej oraz zachowania i nawyków zwierząt. Test otwartego pola jest przydatny do określania zmian behawioralnych i lokomotorycznych, np. pod wpływem określonych substancji chemicznych. Badanie to bazuje na naturalnym zachowaniu gryzoni, wynikającym z potrzeby eksploracji [10].

Zastosowane pole badawcze miało wymiary 120 cm x 120 cm i było podzielone na 36 kwadratów (fot.). W trakcie wykonywania obserwacji źródło oświetlenia charakteryzowało się wartością strumienia świetlnego rzędu 700 lm/m². Zwierzęta przenoszono do pomieszczenia, w którym było przeprowadzane badanie, 30 minut przed jego rozpoczęciem, w celu zminimalizowania stresu.



Fot. Mysz podczas testu otwartego pola
Phot. Mouse during 'open field' test

Obserwacja każdego zwierzęcia w trakcie wykonywanego testu trwała 5 minut. Zastosowano 6 powtórzeń. Określano następujące parametry:

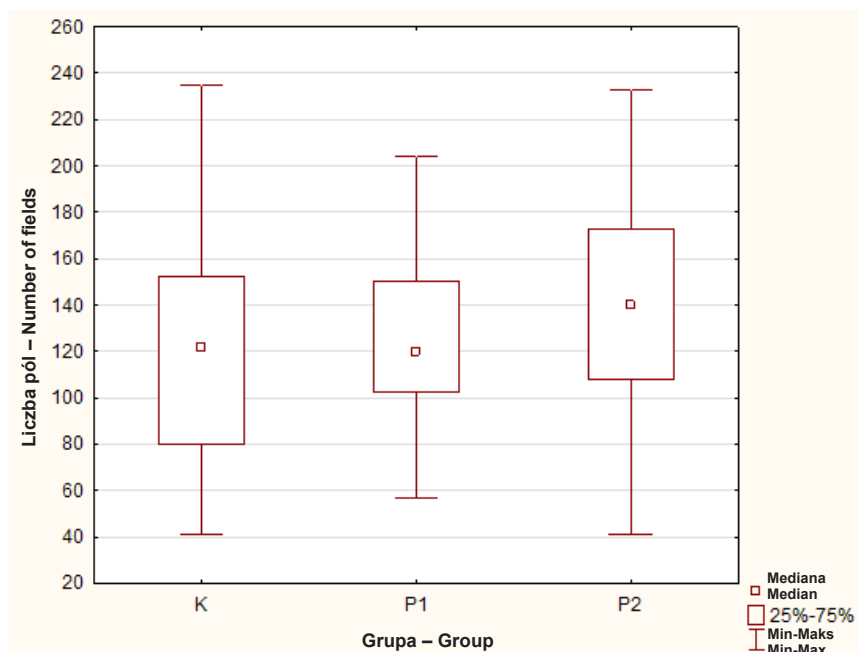
- liczba przejść w każdej minucie doświadczenia,
- liczba stójek (związana z aktywnością zwierzęcia, potrzebą eksploracji, towarzyszy jej wzmożone węszenie) w każdej minucie doświadczenia,
- liczba groomingów (zachowanie pielęgnacji ciała, jako wskaźnik stresu i napięcia emocjonalnego, próba rozładowania emocji) wykonanych w każdej minucie doświadczenia.

Aktywność lokomotoryczną zmierzono na podstawie liczby przekroczonych kwadratów, a eksploracyjno-percepcyjną na podstawie liczby wykonanych stójek. Poziom stresu został wyznaczony przez liczbę wejść na kwadraty centralne i czas przebywania w tej części skrzyni.

Uzyskane wyniki badań opracowano statystycznie, wyliczając podstawowe statystyki opisowe przy pomocy programu Statistica 1. Istotność różnic między analizowanymi grupami oceniono metodą ANOVA rang Kruskala-Wallisa.

Wyniki i dyskusja

Charakterystykę aktywności lokomotorycznej badanych myszy przedstawiono na rysunku 1. i w tabeli 1. Nie wykazano istotnych różnic w ilości pól przebytych przez myszy z różnych grup. Myszy z grupy P2, otrzymujące w karmie 2% soli sodowej AKG (Me = 140), wykazywały jednak tendencję do wyższej aktywności lokomotorycznej w teście otwartego pola w porównaniu do myszy z grup P1 (Me = 120) i K (Me = 122).



Rys. 1. Zmienność aktywności lokomotorycznej myszy w badanych grupach (K, P1, P2) wyrażona liczbą przebytych pól w teście otwartego pola

Fig. 1. Variation in locomotor activity of mice in the test groups (K, P1, P2) expressed as number of fields crossed in the 'open field' test

Tabela 1 – Table 1

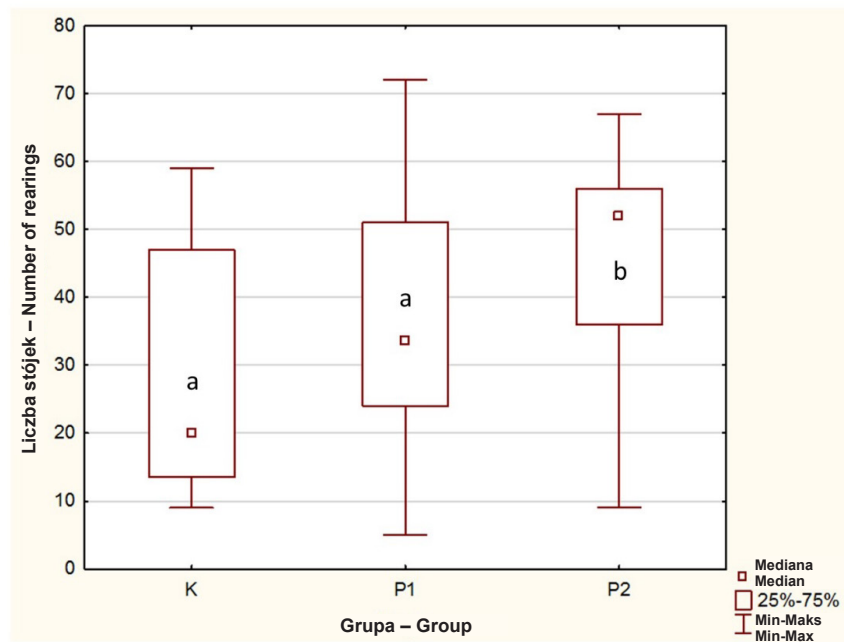
Podstawowe statystyki opisowe zmiennej wyrażonej liczbą przebytych pól przez myszy w teście otwartego pola

Basic descriptive statistics of the variable expressed as the number of fields crossed by mice in the 'open field' test

Grupa Group	Mediana Median (Me)	Kwartył dolny Lower quartile (Q ₁)	Kwartył górny Upper quartile (Q ₃)	Minimum Minimum	Maksimum Maximum	Współczynnik zmienności (VQ, %) Coefficient of variation (VQ, %)
K	122,0	80,0	152,5	41,0	235,0	29,7
P1	120,0	102,5	150,5	57,0	204,0	20,0
P2	140,0	108,0	173,0	41,0	233,0	23,2

Liczba wykonanych stójek przez myszy z grupy P2, otrzymujących w karmie 2% soli sodowej AKG (Me = 52), była znacznie wyższa niż w grupach P1 (Me = 33,5) i K (Me = 20). Należy również podkreślić, że myszy z grupy kontrolnej (K), o niższej aktywności eksploracyjnej (liczba wykonanych stójek), wykazywały jednocześnie większe zróżnicowanie ruchowe wyrażone współczynnikiem zmienności (VQ = 83,7%) niż myszy z grup doświadczalnych P1 (VQ = 40,3%) i P2 (VQ = 19,2%) – tabela 2. Z przedstawionych danych wynika, że sól sodowa AKG (grupa P2) silniej niż sól wapniowa AKG (grupa P1) oddziaływała na behavior myszy (wyrażony liczbą wykonanych stójek). Wzmocnienie eksploracji percepcyjno-ruchowej w grupie P2 wskazuje, że dodatek Na-AKG osłabia naturalny strach przed nowym, niosącym potencjalne zagrożenie otoczeniem. W innych badaniach na myszach z tej linii wykazano [7], że AKG zmniejszał skutki stresu oksydacyjnego, hamując peroksydację lipidów. Na-AKG silniej niż Ca-AKG zmniejszał koncentrację wskaźnika utleniania lipidów w wątrobie myszy (TBARS). Z kolei Ca-AKG wpływał na zmniejszenie poziomu TBARS w osoczu krwi i zwiększenie całkowitego statusu antyoksydacyjnego (TAS) [7]. Istnieje prawdopodobieństwo, że dodatek AKG do diety ogranicza utlenianie makromolekuł w komórkach nerwowych, spowalniając procesy neurodegeneracyjne związane ze starzeniem się zwierząt i poprzez ten mechanizm wpływa na większą aktywność eksploracyjną.

Działanie AKG nie ogranicza się tylko do aktywności przeciwutleniającej. Jak dowodzą najnowsze badania, α -ketoglutaran reguluje tempo metabolizmu komórkowego, hamując aktywność syntazy ATP i kinazy TOR, co wyraźnie opóźnia procesy starzenia u nicieni *Caenorhabditis elegans* [1, 12]. Według Satpute i wsp. [9], doustne podawanie myszom AKG wyraźnie poprawiało koordynację ruchową, co potwierdza oddziaływanie AKG na układ nerwowy i behavior zwierząt. Nie jest zatem wykluczone, że AKG może ograniczać postępujące procesy starzenia układu nerwowego poprzez wpływ na hamowanie szlaku TOR w komórkach nerwowych, ochronę lipidowej domeny mózgu przed utleniającym działaniem reaktywnych form tlenu (RFT), stymulację syntezy poszczególnych neuro-mediatorów lub poprawę unaczynienia struktur mózgu odpowiedzialnych za koordynację ruchową zwierząt.



Rys. 2. Zmienność aktywności eksploracyjnej myszy w badanych grupach (K, P1, P2) wyrażona liczbą wykonanych stójek w teście otwartego pola (dla a i b różnice istotne przy $p < 0,05$)
 Fig. 2. Variation in exploratory activity of mice in the test groups (K, P1, P2) expressed as the number of rearings in the 'open field' test (for a and b differences significant at $p < 0,05$)

Tabela 2 – Table 2

Podstawowe statystyki opisowe zmiennej wyrażonej liczbą wykonanych stójek przez myszy w teście otwartego pola

Basic descriptive statistics of the variable expressed as the number of rearings in the 'open field' test

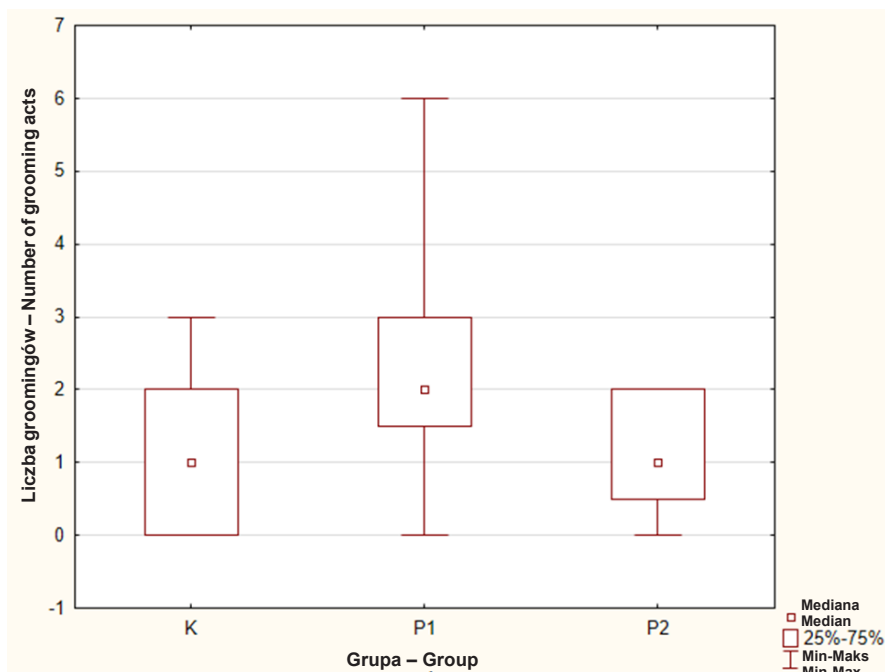
Grupa Group	Mediana Median (Me)	Kwartył dolny Lower quartile (Q ₁)	Kwartył górny Upper quartile (Q ₃)	Minimum Minimum	Maksimum Maximum	Współczynnik zmienności (VQ, %) Coefficient of variation (VQ, %)
K	20,0 ^a	13,5	47,0	9,0	59,0	83,7
P1	33,5 ^a	24,0	51,0	5,0	72,0	40,3
P2	52,0 ^b	36,0	56,0	9,0	67,0	19,2

a, b – różnice istotne przy $p < 0,05$

a, b – significant differences at $p < 0,05$

Nie wykazano istotnych różnic w liczbie groomingów wykonywanych przez myszy (rys. 3, tab. 3). Zwierzęta z grupy P1 wykazywały jednak tendencję do częstszych aktów

pielęgnacyjnych. Pielęgnacyjne zachowania gryzoni to złożony wzorec zachowań związanych ze stresem. Ich wyższą frekwencję obserwuje się u zwierząt wykazujących zaburzenia ze spektrum autyzmu (ASD) oraz obsesyjno-kompulsywne (OCD) [4]. Tendencja do wzmożonych zachowań pielęgnacyjnych u zwierząt otrzymujących Ca-AKG (grupa P1)



Rys. 3. Zmienność zachowań pielęgnacyjnych w badanych grupach (K, P1, P2) wyrażona liczbą aktów groomingu w teście otwartego pola

Fig. 3. Variation in grooming behaviours in the test groups (K, P1, P2) expressed as the number of grooming acts in the 'open field' test

Tabela 3 – Table 3

Podstawowe statystyki opisowe zmiennej wyrażonej liczbą aktów groomingu wykonanych przez myszy w teście otwartego pola

Basic descriptive statistics of the variable expressed as the number of grooming acts in the 'open field' test

Grupa Group	Mediana Median (Me)	Kwartył dolny Lower quartile (Q ₁)	Kwartył górny Upper quartile (Q ₃)	Minimum Minimum	Maksimum Maximum	Współczynnik zmienności (VQ, %) Coefficient of variation (VQ, %)
K	1,0	0,0	2,0	0,0	3,0	100,0
P1	2,0	1,5	3,0	0,0	6,0	37,5
P2	1,0	0,5	2,0	0,0	2,0	75,0

w stosunku do grupy kontrolnej (K) może wskazywać, że ta forma AKG wzmacnia u myszy zmiany związane z zaburzeniami behawioralnymi. Brak istotności różnic w uzyskanych wynikach nie pozwala na formułowanie jednoznacznych stwierdzeń. Ponadto wykonane obserwacje wymagają dodatkowych, bardziej szczegółowych badań i analiz.

Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują, że AKG podany *per os* w ilości 2% mieszanki, zarówno w postaci soli wapniowej (Ca-AKG), a zwłaszcza soli sodowej (Na-AKG), wpłynął na behavior starzejących się myszy laboratoryjnych. Forma sodowa AKG wydaje się mieć najsilniejszy wpływ na zwierzęta, wzmacniając u nich eksplorację percepcyjno-ruchową, a zarazem tłumiąc zachowania o podłożu lękowym. Przeprowadzone badania potencjału AKG mogą mieć znaczenie nie tylko dla zwierząt, ale także dla ludzi, dając szansę na podniesienie standardów życia w wieku podeszłym, poprzez działanie protekcyjne względem układu nerwowego oraz usprawnienie funkcji motorycznych całego organizmu.

PIŚMIENNICTWO

1. CHIN R., FU X., PAI M., VERGNES L., HWANG H., 2014 – The metabolite α -ketoglutarate extends lifespan by inhibiting ATP synthase and TOR. *Nature* 510 (7505), 397-401.
2. FIRLAG M., OSTASZEWSKI A., BALASINSKA B., 2014 – Mechanizmy starzenia się ośrodkowego układu nerwowego u zwierząt. *Życie Weterynaryjne* 89 (01), 40-45.
3. GUTOWICZ M., 2011 – The influence of reactive oxygen species on the central nervous system. *Postępy Higieny Medycyny Doświadczalnej* 18 (65), 104-113.
4. KALUEFF A.V., STEWART A.M., SONG C., BERRIDGE K.C., GRAYBIEL A.M., FENTRESS J.C., 2016 – Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. *Nature Reviews Neuroscience* 17 (1), 45-45.
5. KRISTENSEN N.B., JUNGVID H., FERNÁNDEZ J.A., PIERZYNOWSKI S.G., 2002 – Absorption and metabolism of alpha-ketoglutarate in growing pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 86 (7-8), 239-245.
6. MCLAIN A.L., SZWEDA P.A., SZWEDA L.I., 2011 – α -Ketoglutarate dehydrogenase: A mitochondrial redox sensor. *Free Radical Research* 45 (1), 29-36.
7. NIEMIEC T., SIKORSKA J., HARRISON A., SZMIDT M., SAWOSZ E., 2011 – Alpha-ketoglutarate stabilizes redox homeostasis and improves arterial elasticity in aged mice. *Journal of Physiology and Pharmacology* 62 (1), 37-43.
8. PIERZYNOWSKI S.G., FILIP R., HARRISON A., 2007 – Effect of feed supplementation with α -ketoglutarate, combined with vitamin B6 or C, on the performance and haemoglobin and amino acid levels in growing rats. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 51, 289-296.
9. SATPUTE R., LOMASH V., KAUSHAL M., BHATTACHARYA R., 2013 – Neuroprotective effects of α -ketoglutarate and ethyl pyruvate against motor dysfunction and oxidative changes caused by repeated 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine exposure in mice. *Human & Experimental Toxicology* 32 (7), 747-758.
10. TROJAN M., MATYSIAK J., 2007 – Próba standaryzacji testu otwartego pola. [W:] Zachowanie się zwierząt. Przegląd wybranych zagadnień z zakresu psychologii porównawczej. VIZJA PRESS&IT, Warszawa, ss. 30-70.

11. WIECZOROWSKA-TOBIS K., 2008 – Organ alterations due to aging. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej* 1 (18), 63-69.
12. WU N., YANG M., GAUR U., XU H., YAO Y., LI D., 2016 – Alpha-Ketoglutarate: Physiological Functions and Applications. *Biomolecules & Therapeutics* 24 (1), 1-8.

Tomasz Niemiec, Klara Zglińska, Wiesław Świderek,
Weronika Górecka, Magdalena Matusiewicz, Andrzej Łozicki,
Iwona Kosieradzka, Stefan Pierzynowski

The effect of alpha-ketoglutarate (AKG) on the behaviour of ageing laboratory mice

Summary

Ageing is a complex physiological process characterized by a gradual decline in cell, tissue and organ function. Consequently, ageing is a major risk factor for cardiovascular disease, diabetes and neurodegenerative disorders. Altered nervous system function can lead to behavioural or psychological disorders. Recent research has shown that alpha ketoglutarate (AKG) is a key intermediate in the Krebs cycle that extends the lifespan of adult animal organisms. The objective of this study was to assess the effect of AKG on the behaviour of laboratory mice in an open field test. The Na-AKG form was found to enhance perceptual-motor exploration in the mice (expressed as the number of rearings), and at the same time to suppress anxiety-related behaviour.

KEY WORDS: ageing / alpha-ketoglutarate / AKG / behaviour / open field test