

Биолог. журн. Армении, 3-4 (56), 2004

УДК 577.15.04:577.151.04

АТФ-ФОСФОГИДРОЛАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ В МОЗГЕ КРЫС ПРИ ЭПИЛЕПТИФОРМНЫХ ПРИПАДКАХ, ИНДУЦИРОВАННЫХ КОРАЗОЛОМ

Л.А. СИМОНЯН, А.А. СИМОНЯН, К.Г. КАРАГЕЗЯН

Институт биохимии им. Г.Х. Бунятыана НАН РА, 375014, Ереван

Исследованы сдвиги в активности Mg^{2+} -, Ca^{2+} - и HCO_3^- - активируемых АТФ-фосфогидролаз в структурных образованиях - мембранах и растворимой фракции митохондрий ткани мозга белых крыс при эпилептиформных припадках, индуцированных внутримышечно введенным коразолом. Изучена коррегирующая роль антиоксидантных факторов - α -токоферола (ТФ) и тиосульфата натрия (ТСН). Показано значительное повышение активности исследованных АТФаз при этой патологии по сравнению с контролем. ТФ и ТСН оказывают коррегирующее действие в поддержании нормального физиологического статуса функционирования энергетического метаболизма в структурных элементах ткани мозга крыс при моделированных эпилептиформных припадках.

Դետազոտվել է Mg^{2+} -, Ca^{2+} - և HCO_3^- -կախյալ ԱՏՖ-ֆոսֆոհիդրոլազների ակտիվության տեղաշարժերը սպիտակ առնետների ուղեղից անջատված միտոքոնդրիումների մեմբրաններում և լուծվող ֆրակցիայում ներմկանային ներարկված կորազոլով մակածված էպիլեպսիան սցենարների դեպքում և հակաօքսիդանտային գործոնների α -տոկոֆերոլի (ՏՖ) և նատրիումի թիոսուլֆատի (ՆԹՍ) դերը այդ պրոցեսում: Ներարկված կորազոլի ներգործությամբ, ստուգիչ ցուցանիշների համեմատությամբ, հետազոտված ԱՏՖ-ազների ակտիվությունը զգալիորեն աճում է, իսկ ՏՖ և ՆԹՍ դրսևորում են պրոցեսը նորմալացնող ազդեցություն պահպանելով էներգետիկ փոխանակության ֆունկցիոնալ կարգավիճակը:

It was studied the activities of Mg^{2+} -, Ca^{2+} - and HCO_3^- - activating ATP-phosphohydrolases in the structural formations - membranes and mitochondrial soluble fractions in rat brain during the epileptiform seizures induced by intramuscular injection of corasole. The corregating role of antioxidant factors - α -tocopherole (TP) and sodium thiosulfate (STS) - was established in these reactions. It was revealed a significant increase in the activities of studied ATPases during the injection of corasole in comparison with control data. The administration of TP and STS play a corregating role in the maintenance of normal physiological status in the functioning of energetic metabolism in the rat brain mitochondrial structural elements with modulated epileptiform seizures.

Mg^{2+} -, Ca^{2+} -, HCO_3^- - АТФазы - коразол-индуцированные припадки - митохондрии - мозг

Процесс эпилепсии сопровождается длительными пластическими и транспластическими изменениями. Вместе с этим, в последние годы установлена важная роль свободнорадикальных процессов в регуляции трансмембранного ионного тока, который обуславливает возбудимость нейрона [3]. При этом происходит увеличение количества кальция, что способствует

высокому росту образования свободных радикалов [15]. В свою очередь, свободные радикалы кислорода могут активно участвовать в структурно-функциональных перестройках пластичных нейронов в норме и при различных патологиях. Известно, что при патологических состояниях существенно усиливается перекисное окисление липидов (ПОЛ) в мембранных образованиях [3, 4, 15]. Внутривнутрибрюшинное хроническое (киндинг) и однократное введение пентилтетразоля (аналога коразола) крысам вызывает оксидативный стресс в гиппокампе и мозжечке, сопровождающийся увеличением содержания продуктов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой с уменьшением уровня сульфгидрильных групп [8]. Предварительное введение животным антиоксидантов предотвращает эффект активации ПОЛ [1, 2, 5]. Симоньяном и сотр. [6] было показано, что именно защитное действие супероксиддисмутазы при судорожных состояниях связано со способностью этого фермента путем уменьшения количества супероксидов подавлять липидную перекисацию в мембранах.

На основании проведенных исследований, имея ввиду отсутствие прямых данных об изменении АТФ-фосфогидролазной активности в различных структурных элементах митохондрий ткани мозга при коразол-индуцированных эпилептиформных припадках (ЭФП) крыс, мы задались целью исследовать сдвиги в активности этого фермента при данной патологии и нивелирующее воздействие факторов антиоксидантного характера — α -токоферола (ТФ) и тиосульфата натрия (ТСН) при ЭФП.

Материал и методика. В работе использовали 46 беспородных крыс массой 180-200 г, содержащихся в условиях вивария по 5 особей в клетке при естественном освещении и свободном доступе к воде и пище. Эпилептиформные припадки вызывали одноразовым введением коразола внутримышечно из расчета 8 мг на 100 г массы животного. Контрольным животным вводили 1 мл физраствора. С целью предварительной сенсibilизации факторами эндогенной антиоксидантной активности животным производили одноразовые внутримышечные инъекции 1 мг ТСН на массу животного и 0,4 мг масляного раствора ТФ. Инъекции коразола производили спустя 15 мин после введения указанных факторов антиоксидантного действия. Судорожное поведение наблюдали в течение 20 мин после инъекции коразола. Стадии судорог определяли по модифицированной шкале Рейсина [16]:

стадия 0: отсутствие реакции;

стадия 1: подергивание ушей и вибрисс;

стадия 2: миоклонические судороги без подъема на задние конечности;

стадия 3: миоклонические судороги с подъемом на задние конечности и клонус передних конечностей;

стадия 4: отдельные тонико-клонические судороги с потерей позы;

стадия 5: генерализованные тонико-клонические судороги.

Животных декапитировали после полного проявления припадков. После декапитации мозг быстро удаляли, промывали в охлажденном растворе 0,25 М сахарозы — 0,02 М трис HCl буфера (рН 7,4). Ядерную фракцию мозга выделяли центрифугированием при 900 г в течение 10 мин, митохондриальную фракцию — при 18000 г в течение 15 мин. Мембранные структуры митохондрий получали 3-кратным замораживанием и оттаиванием фракции с последующим центрифугированием при 105000 г. Инкубационная смесь (2 мл) для определения АТФ-фосфогидролазной активности содержала: 1,6 мл 0,25 М сахарозы — 0,02 М трис HCl буфера, 0,2 мл мембраны митохондрий или растворимой фракции (соответствующей 2-3 мг белка), 4 мг АТФ (производства Sigma corp.), растворенного в 0,2 М сахарозы, и 0,5 мМ Mg^{2+} ($MgCl_2$), Ca^{2+} ($CaCl_2$) или HCO_3^- ($NaHCO_3$) в конечной концентрации. Время инкубации смеси 30 мин, температура 37°. Об активности

АТРазы судили по нарастанию в среде содержания P_i . Неорганический фосфат определяли по Лоури и соавт. [13] в модификации Скулачева [7] и пересчитывали на 1 мг белка. Определение белка проводили по Лоури и соавт. [14]. Полученные данные обработаны статистически. Достоверность различий между средними величинами определяли по t-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Сдвиги активности АТРаза в митохондриальных мембранах мозга при коразол-индуцированных ЭФП у крыс приведены на рис. 1. Как видно из этих результатов, в опытах без добавления активаторов при инъекции коразола значительно (57%, $p < 0,001$) повышается каталитическая активность фермента по сравнению с контрольными величинами. В пробах с одним только ТФ отмечается небольшое, но достоверное повышение активности фермента. Однако на фоне инъекции коразола ТФ заметно ($p < 0,001$) снижает фермент активирующее действие коразола в мембранах митохондрий мозга. В группе животных, получивших ТСН, показатели активности фермента остаются на уровне контрольных проб. Сочетанное введение коразола + ТСН не вызывает каких-либо изменений в активности фермента.

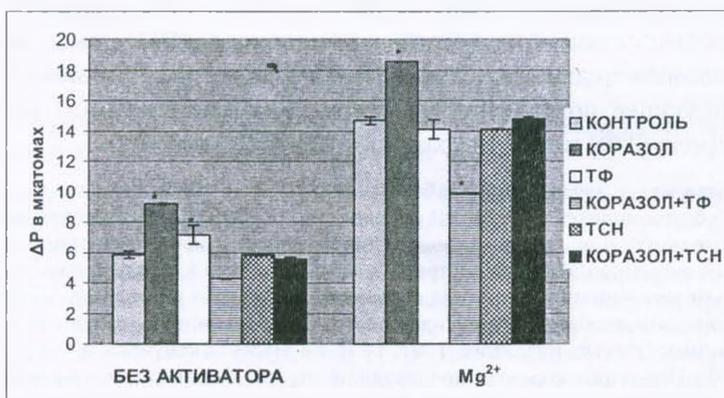


Рис. 1. Сдвиги в активности общей (без активатора) и Mg^{2+} -АТФ-фосфогидролазы в мембранных структурах митохондрий мозга при ЭФП у крыс (ΔP в мкмолях/мг белка/30 мин). По оси ординат – количество свободного фосфата. * - достоверное отклонение от контроля, $p < 0,005$. Число животных в группах – 6.

Как видно из рис. 1, Mg^{2+} -зависимая АТРазная активность во всех вариантах опытов значительно превалирует над таковой в пробах без добавления активаторов. При этом введение животным только коразола приводит к достоверному повышению активности фермента по сравнению с контролем. При сочетанном введении коразола + ТФ значительно подавляется активирование фермента коразолом. Каких-либо сдвигов в каталитической активности фермента при инъекции крысам ТСН или коразола + ТСН не обнаруживается. Полученные данные находятся на уровне контрольных показателей. Аналогичные сдвиги активности фермента в мембранных структурах митохондрий мозга при коразолиндуцированных эпилептиформных припадках обнаруживаются также в отношении Ca^{2+} -, HCO_3^- -активируемых АТРаза (рис. 2).

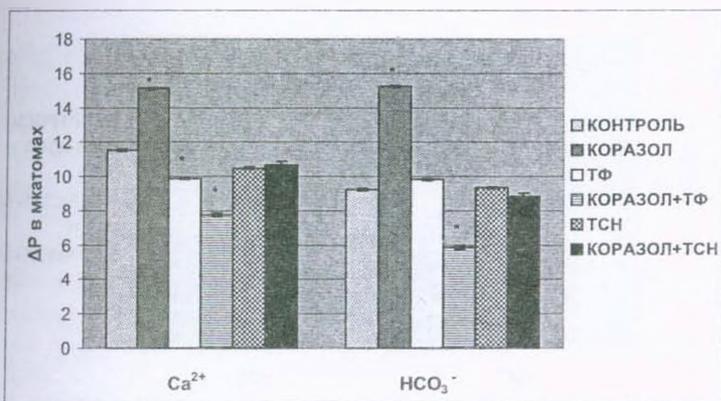


Рис. 2. Сдвиги в активности Ca²⁺- и HCO₃⁻ - зависимых АТР-фосфогидролаз в мембранных структурах митохондрий мозга при ЭФП у крыс (ΔP в мкатомах/мг белка/30 мин.). По оси ординат – количество свободного фосфата. * - достоверное отклонение от контроля, p<0,005. Число животных в группах – 6.

Соответствующие исследования проводили также в растворимой фракции выделенных митохондрий (рис. 3). Как видно из рис., в растворимой фракции уровень АТР-фосфогидролазной активности во всех вариантах опыта намного ниже, чем в мембранах этих органоидов. Одноразовое введение коразола крысам значительно (p<0,001) увеличивает активность фермента как в контрольных пробах, так и при добавлении Mg²⁺. У крыс, получивших только ТФ, также отмечается тенденция активирования фермента по сравнению с контролем. Однако при комбинированном введении коразола + ТФ активность фермента достоверно угнетается. Такая же динамика сдвигов АТРазной активности наблюдается под воздействием ТСН.

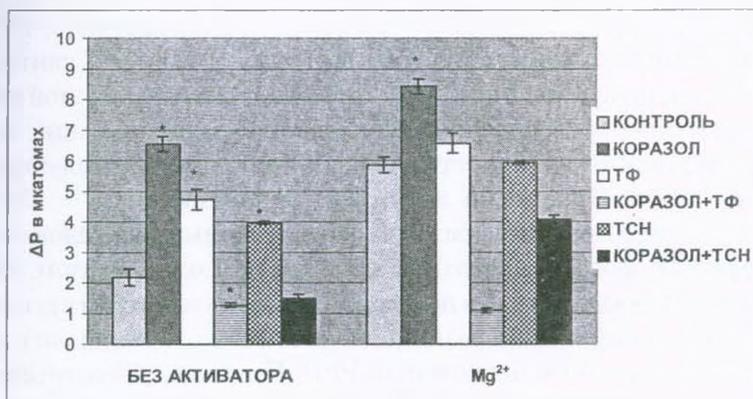


Рис. 3. Сдвиги в активности общей (без активатора) и Mg²⁺- АТР-фосфогидролазы в растворимой фракции митохондрий ткани мозга при ЭФП у крыс (ΔP в мкатомах/мг белка/30 мин.). По оси ординат – количество свободного фосфата. * - достоверное отклонение от контроля, p<0,005. Число животных в группах – 6.

Аналогичные изменения активности фермента в растворимой фракции митохондрий мозга крыс при коразолиндуцированных эпилептиформных приступах наблюдаются также при изучении Ca²⁺- и HCO₃⁻ - зависимых АТР-фосфогидролаз (рис.4).

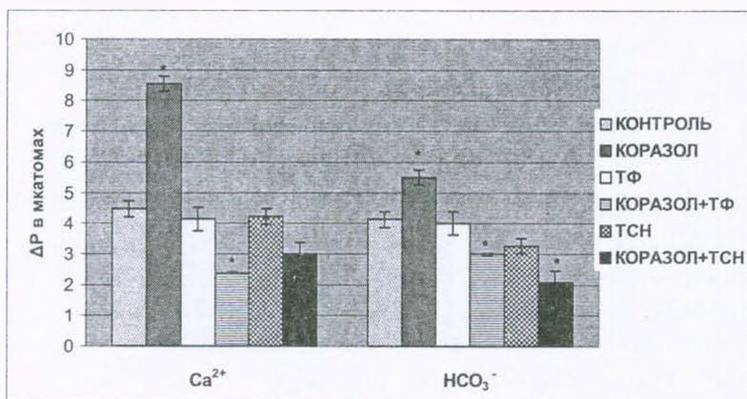


Рис. 4. Сдвиги в активности Ca^{2+} - и HCO_3^- -зависимых АТФ-фосфогидролаз в растворимой фракции митохондриальной ткани мозга при ЭФП у крыс (ΔP в мкмолях/мг белка/30 мин.). По оси ординат – количество свободного фосфата. * - достоверное отклонение от контроля, $p < 0,005$. Число животных в группах – 6.

Таким образом, обобщая приведенные результаты, можно заключить следующее. При ЭФП у белых крыс, индуцированных коразолом, наблюдается резкое, статистически достоверное стимулирование изученных нами всех типов АТФаз. Учитывая, что коразол сочетает свойства дыхательного аналептика и судорожного яда, можно предположить, что он, стимулируя дыхательный центр продолговатого мозга и активируя внешнее дыхание, приводит к накоплению кислорода в организме и образованию супероксидов, которые, согласно литературным данным [10, 11], способствуют ингибированию АТФ-фосфогидролазной реакции. С другой стороны, взаимодействие между свободными радикалами и митохондриальными компонентами подавляет образование АТФ, способствуя истощению энергетических ресурсов, вызывая тем самым гибель клетки [9, 12]. Однако адаптационные механизмы организма вынуждены повысить синтез АТФазы для поддержания необходимого энергетического баланса при этой патологии. Поэтому в наших исследованиях наблюдается увеличение или, во всяком случае, сохранение активности АТФазы при коразол-индуцированных судорогах крыс. Экзогенно вводимые антиоксиданты – ТФ и ТСН нейтрализуют образование коразолом супероксидных радикалов, тем самым нивелируя АТФ-фосфогидролазную активность. Таким образом, ТФ и ТСН играют коррегирующую роль в поддержании нормального физиологического статуса функционирования реакций энергетического метаболизма в ткани мозга белых крыс с моделированным ЭФП. Прямым доказательством этого вывода является тот факт, что введение животным супероксиддисмутазы (СОД) полностью предотвращало гибель крыс при действии коразола [2, 6, 16]. При этом значительно сокращается судорожный период с выраженным облегчением клинического состояния животных путем унетения образования супероксидных радикалов и предотвращением процесса липидной перекисидации в нейрональных мембранных структурах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Архипова Г.В., Бурлакова Е.Б., Семиохина А.Ф., Федотова И.Б., Крушинский Л.В. Докл. АН СССР, 267, 469-471, 1982.
2. Крыжановский Г.Н., Шандра А.А., Годлевский Л.С. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 98, 150-153, 1984.
3. Меерсон Ф.З., Каган В.Е., Прилипко Л.Л. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 87, 404-406, 1979.
4. Николаев С.М. Автореф. канд. дисс., М., 1976.
5. Никушин В.Е., Браславский В.Е., Крыжановский Г.Н. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 90, 696-698, 1980.
6. Симонян М.А., Табачникова С.И., Громов Л.А. Нейрохимия, 3, 2, 124-129, 1984.
7. Скулачев В.П. Энергетика биологических мембран., М.: Наука, 1989.
8. Павлова Т.В., Яковлев А.А., Степаничев М.Ю., Менджерлицкий, А.М., Гуляева Н.В. Нейрохимия, 19, 2, 118-121, 2002.
9. Arzimanoglou A. et al. Epilepsy and neuroprotection: an illustrated review, 4, №3, 173-182, 2002.
10. Dus D.K., Neogi A. Clin. Physiol. Biochem., 2, 32-38, 1984.
11. Jain S.K., Lim G. Free Radic. Biol. Med., 30(3), 232-237, 2001.
12. Lanir A., Werber M.M. Biochem. Biophys. Res. Comm., 87/1, 207-213, 1979.
13. Lowry O.H., Lopez J. A. Biol. Chem., 162, 421, 1946.
14. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. J. Biol. Chem., 193, 265-275, 1951.
15. McEachern J.C., Shaw C.A. Brain Res. Rev., 22, 51-92, 1996.
16. Racine R.J. Electroencephal. Clin. Neurophysiol., 32, 281-285, 1972.
17. Zimmerman R., Flohe L., Weser U., Hartman H.J. FEBS Lett., 29, 117-122, 1973.

Поступила 25.VIII.2004