



Биол. журн. Армении, Приложение 1 (66), 2014

ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ Ca^{2+} -зависимой АТФ-фосфогидролаз И ВЛИЯНИЕ АНТИОКСИДАНТА SKQ1 В МИТОХОНДРИЯХ ТКАНЕЙ БЕЛЫХ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЭПИЛЕПТИФОРМНЫХ СУДОРОГАХ

А.А. СИМОНЯН¹, Р.А. СИМОНЯН², А.С. МАРГАРЯН¹,
Л.А. СИМОНЯН³, Р.Б. БАДАЛЯН¹, М.М. ГУРОГЛЯН¹

¹Институт биохимии им. Г.Бунятяна НАН РА

²Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, РФ

³Кафедра медико-биологических дисциплин Московского областного государственного
социально-гуманитарного университета РФ
anahit78.78@mail.ru

При экспериментальных эпилептиформных судорогах у белых крыс, в отличие от Mg^{2+} -зависимой АТФ-азы, экзогенная инъекция антиоксидантной SkQ1 не нивелирует изменения в активности Ca^{2+} -зависимой АТФазы.

Митохондрии - Ca^{2+} -зависимая АТФаза - SkQ1 - эпилептиформные судороги

Սպիտակ առնետների փորձարարական էպիլեպսիաների ընթացքում, ի տարբերություն Mg^{2+} -կախյալ ԱԵՖազի, SkQ1 հակաօքսիդանտի էկզոգեն ներարկման դեպքում տարբեր հյուսվածքներից անջատված միտոքոնդրիումներում Ca^{2+} -կախյալ ԱԵՖազի ակտիվության շեղումների նկատելի համահարթեցում չի դրսևորվում:

Միտոքոնդրիումներ - Ca^{2+} -կախյալ ԱԵՖազ - SkQ1 - էպիլեպսիաների ընթացքում

At experimental epileptiform convulsions on white rats as opposed to Mg^{2+} -dependent ATPase, SkQ1 antioxidant exogenous injection not displayed correlation effects on changes of Ca^{2+} -dependent ATPase activity.

Mitochondria - Ca^{2+} -dependent ATPase - SkQ1 - epileptiform convulsions

В Институте физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова осуществлен синтез катионных производных пластохинона (SkQ), содержащих положительно заряженные остатки ацилтрифенилфосфония или родамина, соединенные с пластохиноном посредством деканового или пентанового линкера. Показано, что различные формы SkQ легко проникают через

плоскую бислойную фосфолипидную мембрану через мембраны митохондрий и внешнюю клеточную мембрану, электрофоретически накапливаются в изолированных митохондриях и в митохондриях живых клеток [8, 10, 15]. В низких (наномолярных) концентрациях проявляют высокую антиоксидантную активность в водных растворах, липидных мицеллах, изолированных митохондриях, предотвращают окисление митохондриального кардиолипина под действием радикала $\text{OH}^\bullet$, увеличивают выживаемость клеток гиперчувствительных к активным формам кислорода (АФК) [9, 13]. АФК представляют серьезную опасность для клеток и всего организма. Авторами было показано, что они образуются в гидрофобной области внутренней мембраны этих органелл и инициируют цепные реакции перекисного окисления липидов и являются серьезной угрозой для живых систем. Более того, митохондриальные АФК способны также вызывать окислительные повреждения митохондриальной ДНК, локализованной вблизи внутренней мембраны [1]. Было показано также, что при увеличении концентрации SkQ проявляются его прооксидантные свойства [9].

В представленной работе мы поставили цель исследовать возможное участие SkQ1 в коррекции отклонения в каталитической активности Ca^{2+} -АТФазы в митохондриях различных органов белых крыс при пентилентетразол-индуцированной эпилепсии.

Биохимические механизмы патогенеза эпилепсии связаны с расстройством ионных, медиаторных и энергетических процессов. Ионные сдвиги ведут к повышению мембранной проницаемости и усилению в результате этого деполяризации нейронов, их сверхвозбудимости. Снижение запасов глюкозы и накопление молочной кислоты в тканях головного мозга во время приступа эпилепсии являются причиной ацидотических сдвигов, усугубляющих гипоксию и снижающих уровень фосфатных соединений. В наших предыдущих работах [3, 4, 5] было показано, что при эпилептиформных припадках, индуцированных пентилентетразолом (ПТЗ), статистически достоверно стимулируется функциональная активность АТФазы в различных органах у белых крыс, а эндогенно введенный α -токоферол и его синергист – тиосульфат натрия выступают в роли антиоксидантного стимулятора эндогенной системы антирадикальной защиты клетки.

На основании приведенного мы в опытах *in vivo* исследовали влияние антиоксидантного фактора SkQ1 на сдвиги активности Ca^{2+} -АТФазы в митохондриях, выделенных из различных органов белых крыс при ПТЗ-индуцированных эпилептиформных припадках.

Известно, что Ca^{2+} -АТФаза осуществляет активный перенос ионов кальция через мембраны клеток, поддерживая низкую концентрацию этих ионов в клетке (10^{-7}M) по сравнению с окружающей средой и внутриклеточными депо ($3 \cdot 10^{-3}\text{M}$). Поддерживает эту разницу система активного транспорта ионов кальция, главную роль в котором играет кальциевый насос - Ca^{2+} -АТФаза. Здесь мы имеем дело не с одним ферментом, а группой кальциевых АТФаз, различающихся по локализации в клетке, строению и способу регуляции. Но все эти ферменты переносят ионы кальция из цитоплазмы во внеклеточную жидкость или внутриклеточные депо кальция-пузырьки эндоплазматического ретикулума за счет энергии гидролиза АТФ, поддерживая тем самым низкую концентрацию ионов кальция в цитоплазме. Входя в клетку, эти ионы активируют множество внутриклеточных процессов, как, например, сокращение мышцы, которое начинается с выхода ионов Ca из саркоплазматического ретикулума и его взаимодействия с сократительными белками.

Материал и методика.

Опыты проводили на 20-ти беспородных крысах-самцах массой 180-200 г, содержащихся в условиях вивария при естественном освещении и свободном доступе к воде и пище. Эпилептиформные припадки вызывали одноразовым введением ПТЗ внутримышечно из расчета 8 мг на 100 г массы животного. Подопытные животные были разделены по следующим группам (в каждом по 5 животных):

- I. животным (контрольная группа) вводили 1мл физраствора
- II. животным один раз в день 2 дня подряд вводили SkQ1 (в расчете 37 нм SkQ1 в 1мл воды)
- III. животным вводили ПТЗ 8 мг на 100 г массы животного в 1мл воды.
- IV. животным вводили SkQ1 + ПТЗ.

Судорожное поведение наблюдали в течение 20 мин после инъекции ПТЗ. Стадии судорог определяли по модифицированной шкале Racine [14].

Животных декапитировали после полного проявления генерализованных тонико-клонических судорог. После декапитации соответствующие ткани быстро извлекали, промывали в охлажденном растворе 0.25 М сахарозы- 0.02 М трис-НСl буфера (pH 7.4).

Измельченные ткани гомогенизировали в том же буфере гомогенизатором с тефлоновым пестиком. Ядерную фракцию из гомогената различных тканей выделяли центрифугированием при 600-800 g, а митохондрии мозга – при 18000 g, сердца и селезенки – 12000 g, печени - 9000 g в течение 15 мин. Осадок митохондрий суспендировали в 0.25 М сахарозы – 0.02 М трис НСl буфере и центрифугировали повторно.

Инкубационная смесь (1мл) для определения АТФ-фосфогидролазной активности содержала: 0.7 мл 0.25 М сахарозы – 0.02 М трис-НСl буфера, 0.1 мл митохондрий (соответствующих 2-3 мг белка), 0.1 мл (2 mM) АТФ (производства Sigma chem. соrp., США), растворенного в сахарозе-трис-НСl буфере и 0.1 мл 1 mM Ca^{2+} (CaCl_2) в конечной концентрации [3, 6, 7]. Время инкубации смеси 30 мин при температуре 37°C. Об активности АТФазы судили по нарастанию в среде содержания неорганического фосфата, который определяли по Лоури и соавт. [11], в модификации Скулачева [7] и пересчитывали на мг белка [12]. Полученные данные обработаны статистически. Достоверность различий между средними величинами определяли по t-критерию Стьюдента [2].

Результаты и обсуждение.

В табл. 1 приведены данные экспериментов по изучению сдвигов активности Ca^{2+} -зависимой АТФазы в интактных митохондриях мозга крыс при ПТЗ-индуцированных эпилептиформных судорогах под воздействием SkQ1.

Таблица 1. Влияние SkQ1 на активность Ca^{2+} -АТФазы в митохондриях мозга белых крыс при ПТЗ-индуцированных эпилептиформных судорогах.
(ΔP в мкатамах / мг белка / 30 мин) $M \pm S.M.E.$; $n=9$

Митохондрии	Контроль	SkQ1	ПТЗ	ПТЗ + SkQ1
Мозг	2.24 ± 0.12	2.67 ± 0.09 $p < 0.025^*$	1.25 ± 0.10 $p < 0.001$	1.24 ± 0.05 $p < 0.001$

*Здесь и в следующих таблицах p - по сравнению с контролем.

Приведенные результаты показывают, что при внутримышечном введении крысам SkQ1 АТФазная активность в митохондриях мозга повышается. При инъекции же ПТЗ каталитическая активность фермента, наоборот, угнетается по сравнению с SkQ1. Такая же картина наблюдается при совместном введении ПТЗ и SkQ1.

В тех же условиях опыта наблюдается иная картина активности Ca^{2+} -зависимой АТФазы в печеночных митохондриях. При внутримышечном введении SkQ1 в активности фермента, по сравнению с контролем, заметных изменений не наблюдается (табл. 2). Однако стимулируется активность фермента при совместном введении ПТЗ и SkQ1.

А.А. СИМОНЯН, Р.А. СИМОНЯН, А.С. МАРГАРЯН, Л.А. СИМОНЯН, Р.В. БАДАЛЯН, М.М. ГУРОГЛЯН

Под влиянием ПТЗ активность Ca^{2+} -АТФазы так же достоверно повышается по сравнению с контролем. Полученные данные об активности Ca^{2+} -АТФазы в митохондриях селезенки приведены в табл. 3. SkQ1 приводит к достоверному (165.4 %) повышению активности АТФазы по сравнению с митохондриями той же ткани intactных животных. Введение животным только ПТЗ, как и при совместном введении ПТЗ и SkQ1, стимулирует активность фермента более чем в два раза, по сравнению с контролем.

Таблица 2. Влияние SkQ1 на активность Ca^{2+} -АТФазы в митохондриях печени белых крыс при ПТЗ-индуцированных эпилептиформных судорогах.
(ΔP в мкатомах / мг белка / 30 мин) $M \pm S.M.E.$; $n=9$

Митохондрии	Контроль	SkQ1	ПТЗ	ПТЗ + SkQ1
Печень	1.90 ± 0.01	1.82 ± 0.02 $p < 0.010$	2.71 ± 0.04 $p < 0.001$	3.15 ± 0.08 $p < 0.001$

Таблица 3. Влияние SkQ1 на активность Ca^{2+} -АТФазы в митохондриях селезенки белых крыс при ПТЗ-индуцированных эпилептиформных судорогах.
(ΔP в мкатомах / мг белка / 30 мин) $M \pm S.M.E.$; $n=9$

Митохондрии	Контроль	SkQ1	ПТЗ	ПТЗ + SkQ1
Селезенка	1.69 ± 0.05	4.49 ± 0.13 $p < 0.001$	3.41 ± 0.12 $p < 0.001$	3.71 ± 0.07 $p < 0.001$

Интересные результаты активности фермента получены в изолированных митохондриях сердца (табл. 4). Согласно таблице изолированные митохондрии миокарда наделены более высокой каталитической активностью Ca^{2+} -АТФазы по сравнению с аналогичными органеллами других органов. В митохондриях миокарда под влиянием введенного крысам SkQ1 активность фермента несколько подавляется. Однако при введении животным ПТЗ, наоборот, активность фермента заметно (58.0 %) стимулируется. Аналогичные результаты в активности Ca^{2+} -АТФазы получены также при совместной инъекции ПТЗ и SkQ1.

Таблица 4. Влияние SkQ1 на активность Ca^{2+} -АТФазы в митохондриях сердечной ткани белых крыс при ПТЗ-индуцированных эпилептиформных судорогах.
(ΔP в мкатомах / мг белка / 30 мин) $M \pm S.M.E.$; $n=9$

Митохондрии	Контроль	SkQ1	ПТЗ	ПТЗ + SkQ1
Сердце	7.19 ± 0.001	6.29 ± 0.37 $p < 0.025$	11.36 ± 0.33 $p < 0.001$	10.34 ± 0.22 $p < 0.001$

Обобщая выше приведенные результаты экспериментов, можно заключить, что экзогенно введенный SkQ1, в отличие от Mg^{2+} -АТФазы, не нивелирует отклонения в активности Ca^{2+} -АТФазы в изолированных митохондриях различных тканей белых крыс с моделированным эпилептиформным припадком.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Антоненко Ю.Н., Аветисян А.В., Бакеева Л.Е., Северина И.И., Симонян Р.А., Скулачев В.П. и др. Производные пластохинона, адресованное в митохондрии, как средство, прерывающее программу старения. // Биохимия. 73(12). С. 1589-1606. 2008.
2. Бессмертный Б.С. Математическая статистика в клинической, профилактической и экспериментальной медицине. М. 1967.
3. Симонян Л.А., Симонян А.А., Карагезян К.Г. АТФ-фосфогидролазная активность в мозге крыс при эпилептиформных припадках, индуцированных коразолом. // Биолог. ж. Армении. 56(3-4). С. 226-231. 2004.
4. Симонян Л.А., Симонян А.А., Бадалян Р.Б., Маргарян А.С., Симонян Р.А., Карагезян К.Г. Корректирующий эффект α -токоферола и тиосульфата натрия на активность АТФ-фосфогидролазы в митохондриях печени крыс с моделированным коразолом эпилептиформным припадком. // Международная академия наук экологии и безопасности жизнедеятельности. Вестник. Санкт-Петербург. 10(5). С. 174-176. 2005.
5. Симонян Л.А., Симонян Г.М., Симонян А.А., Симонян М.А. Повреждающее воздействие эпилептогена коразола на металлопротеины крови *in vivo*. // Мед. наука Армении. 14(1). С. 30-33. 2005.
6. Симонян А.А., Бадалян Р.Б., Симонян Л.А., Степанян Р.А., Галоян А.А. Регуляция энергетического метаболизма под действием обогащенного пролином полипептида гипоталамуса. // Нейрохимия. 1(2). С. 143-145. 2002.
7. Скулачев В.П. Энергетика биологических мембран. М.: Наука. 564 стр. 1989.
8. Grinius L.L., Jasaitis A.A., Kadzius kas Yu.L., Liberman E.A., Skulachev V.P., Topali V.P., Tsofina L.M., Vladimirova M.A. Conversion of biomembrane-produced energy into electric form. 1. Submitochondrial particles. // Biochem. Biophys. Acta. 216. P. 1-12. 1970.
9. James A.M., Cocheme H.M., Smith R.A. and Murphy M.P. Interactions of mitochondria-targeted and untargeted ubiquinones with the mitochondrial respiratory chain and reactive oxygen species, implications for the use of exogenous ubiquinones as therapies and experimental tools. // J. Biol. Chem. 28. P. 21295-21312. 2005.
10. Liberman E.A., Topali V.P., Tsofina L.M., Jasaitis A.A., Skulachev V.P. Mechanism of coupling of oxidative phosphorylation and the membrane potential of mitochondria. // Nature. 222. P. 1076-1078. 1969.
11. Lowry O.H., Lopez J.A. Determination of inorganic phosphate in the presence of labelling ester. // J. Biol. Chem. 162. P. 421. 1946.
12. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Parr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the folin-phenol reagent. // J. Biol. Chem. 193. P. 265-275. 1951.
13. Murphy M.P.S., Smith R.A. Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations. // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 47. P. 629-656. . 2007.
14. Racine R.J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II Motor seizures. // Electroencephal. Clin. Neurophysiol. 32. P. 281-294. 1972.
15. Severin S.E., Skulachev V.P., Yaguzinsky L.A. A possible role of carnitine in transport of fatty acids through the mitochondrial membrane. // Biokhimiya. 35. P. 1250-1257. 1970.