



Биол. журн. Армении, 3 (67), 2015

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНОГО ПЛАСТОХИНОНА (SkQ1) НА АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ КЛЮЧЕВЫХ ФЕРМЕНТОВ КЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА

Л.Г. ПОГОСЯН, З.С. МКРТЧЯН, М.Г. ГАЗАРЯНЦ, А.С. МАРГАРЯН*,
Р.Б. БАДАЛЯН*, А.А. СИМОНЯН*, Ж.И. АКОПЯН

Институт молекулярной биологии НАН РА
*Институт биохимии им. Г.Бунятына НАН РА
lina-edu@mail.ru

Показано, что в митохондриях сердца, мозга, печени и селезенки белых крыс, при эпилептиформных припадках, индуцированных пентилентетразолом (коразол), фактор антиоксидантного действия – производное пластохинона SkQ1, и совместное введение SkQ1 и коразола оказывают значительное влияние на активность креатинкиназы, пуриноклеозидфосфоорилазы и аланинаминотрансферазы.

Ферменты – SkQ1 – митохондрии – активность – эпилептиформные судороги

Հետազոտության նախնական տվյալները ցույց են տվել, որ պենտիլենտետրազոլով (կորազոլ) ինդուկցված էպիլեպսանման ճնշումների ժամանակ, հակաօքսիդանտային գործոն հանդիսացող պլաստոկինոնի ածանցյալ SkQ1-ի և կորազոլի համատեղ ներարկումը բերում է մի շարք օրգանների միտոքոնդրիումների կրեատինկինազի և պուրինոկլեոզիդֆոսֆորիլազի ակտիվության մակարդակի զգալի տեղաշարժերի:

Ֆերմենտներ – SkQ1 – միտոքոնդրիումներ – ակտիվություն – էպիլեպսանման ճնշումներ

The results showed that during the epileptiform convulsions in rats induced by pentylenetetrazole (corazolum) separately as well as together with the derivative of plastoquinone SkQ1, the significant changes in activities of some key metabolic enzymes were revealed.

Enzymes – SkQ1 – mitochondria – activities – epileptiform convulsions

В современных условиях, когда человеку постоянно приходится сталкиваться с негативным воздействием огромного количества агрессивных факторов внешней среды (экология, несбалансированное питание, постоянные стрессы и т.д.), риск развития оксидативного стресса крайне велик. Деятельность свободных радикалов способствует развитию более 100 различных заболеваний. Патологическое действие свободных радикалов связано, прежде всего, с их влиянием на клеточные

мембраны [9]. Активные формы кислорода (АФК), образующиеся в митохондриях, могут играть важную роль в процессах неопластической трансформации и канцерогенезе [1]. Поиск эффективных соединений – антиоксидантов, способных селективно регулировать продукцию АФК митохондриями, привел к необходимости разработки акад. В.П. Скулачевым и коллегами в Институте физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ нового типа антиоксидантов, названных SkQ. Они являются производными пластохинона, конъюгированного с липофильными катионами, что позволяет им свободно проникать через бислойные липидные мембраны митохондрий [11]. Было показано, что соединения типа SkQ накапливаются в митохондриях клеток и защищают их от апоптоза и некроза, вызванных АФК [10].

Эпилепсия – одна из распространенных болезней нервной системы. Эта патология характеризуется стойкой склонностью к возникновению эпилептических припадков [2]. Проблема эпилепсии сложна и многогранна.

Исследовано действие SkQ1 на энергетические реакции в митохондриях белых крыс при экспериментальных припадках, индуцированных пентилентетразолом (ПТЗ или коразол). В работах [6-8] было показано, что введение животным SkQ1 в наномолярных концентрациях нивелирует выявленные отклонения активности Mg^{2+} - и Ca^{2+} -зависимых фосфогидролаз в митохондриях разных органов белых крыс и увеличивает выживаемость животных.

Литературные данные относительно влияния этих препаратов на исследуемые нами ферменты практически отсутствуют.

В представленной работе, в опытах *in vivo*, мы исследовали влияние антиоксидантного фактора SkQ1 на уровни активности креатинкиназы (КК), пуриннуклеозидфосфорилазы (ПНФ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ) при эпилептиформных припадках, индуцированных пентилентетразолом (коразол): КК – важнейший фермент энергетического обмена клетки, отличающийся высокой чувствительностью к окислительному стрессу; ПНФ – важнейший фермент пуринового метаболизма, который служит прижизненным маркером заболеваний, связанных с иммунодефицитным состоянием организма; АЛТ – общепринятый маркер гепатотоксичности.

Материал и методика. Препарат SkQ1 был любезно предоставлен Центром митохонгенерии МГУ.

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 вызывались однократным введением ПТЗ внутримышечно из расчета 8 мг на 100 г массы животного. Подопытные животные были разделены по следующим группам:

- 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 8 мг ПТЗ на 100 г массы животного в 1мл воды;
- IV. животным вводили SkQ1 + ПТЗ.

Судорожное поведение наблюдалось в течение 20 мин после инъекции ПТЗ. Стадии судорог определяли по модифицированной шкале Racine [12].

Животных декапитировали после полного проявления генерализованных тоникоклонических судорог. После декапитации соответствующие ткани 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, 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 HCl буфере и повторно центрифугировали.

Активность КК определяли по накоплению креатина [3]; ПНФ – по накоплению гуанина [3]; АЛТ – на основе измерения убыли НАДН в сопряженных реакциях с лактатдегидрогеназой [4].

Построение гистограмм выполнено с помощью программы Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение. Предварительные экспериментальные результаты указывают на определенные изменения активности исследуемых ферментов в сыворотке крови, в экстрактах и мембранах митохондрий мозга, сердца, печени и селезенки под воздействием SkQ1, коразола (при эпилептиформных судорогах), а также при совместном введении обоих соединений.

Известно, что ПНФ катализирует обратимую реакцию фосфорилиза пуриновых (дезоксир)ибонуклеотидов с образованием (d)Rib-1-P и соответствующих оснований, которые являются основным источником синтеза пуринов в клетке. ПНФ служит специфическим диагностическим тестом при ряде заболеваний, связанных с иммунодефицитным состоянием [5].

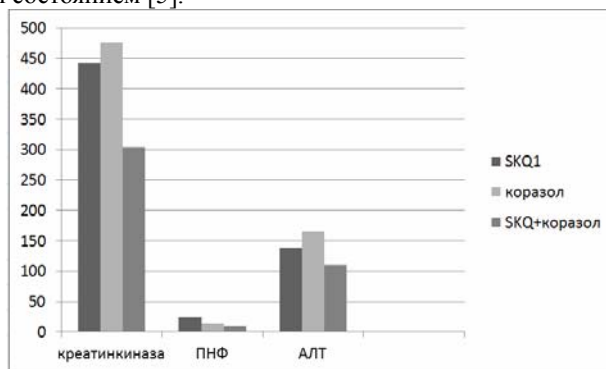


Рис.1. Изменения уровней активности КК, ПНФ, АЛТ в сыворотке крови крыс под воздействием SkQ1, коразола, SkQ1+коразол. Здесь, как и на следующих рисунках, данные контроля после обработки принимаются за 100%

Из рис.1 следует, что активность ПНФ в сыворотке крови резко подавляется у животных, которым был введен только препарат SkQ1, а в 2-х других группах, где вводили только коразол и SkQ1+коразол, активность подавлена полностью. Поскольку наиболее высокая активность ПНФ наблюдается в эритроцитах и гепатоцитах печени и почках[5], можно предположить, что подавление активности ПНФ связано с тем, что мишенью действия SkQ1 и коразола являются форменные элементы крови.

Что касается КК, то как видно из рис.1, значительное повышение активности КК в сыворотке крови в группах животных с введением только SkQ1 или коразола, по сравнению с контролем, по-видимому, связано с повреждением клеточных мембран мозга, сердца, печени и селезенки, что приводит к выходу фермента в сыворотку крови. При смешанном же воздействии SkQ1+коразола происходит небольшое повышение активности фермента.

Далее, рассмотрим влияние SkQ1 и коразола на уровни активности исследуемых ферментов в экстрактах и мембранах митохондрий мозга, сердца, печени и селезенки белых крыс. Оценку действия исследуемых соединений проводили на основании сравнения уровня активности фермента в органах животных опытных групп по сравнению с контрольной (интактной) группой.

Изменения активности ПНФ в экстракте митохондрий, представленные на рис. 2, указывают на то, что в мозге и селезенке наблюдается резкое повышение уровня активности ПНФ в опытных группах. При этом пик активности фермента в

мозге приходится на группу с совместным действием SkQ1+коразол, а в селезенке – на группу с действием только коразола, но тем не менее в группе с совместным введением SkQ1+коразол активность ПНФ в селезенке, также как и в мозге, почти в три раза выше активности ПНФ интактной группы животных.

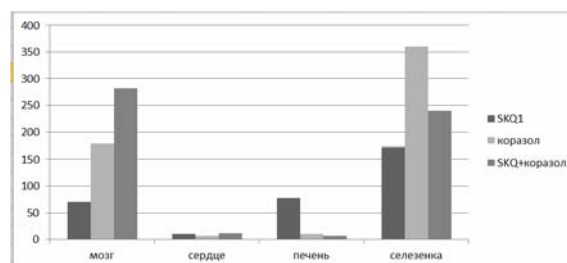


Рис.2. Динамика изменений активности ПНФ в экстракте митохондрий различных органов крыс

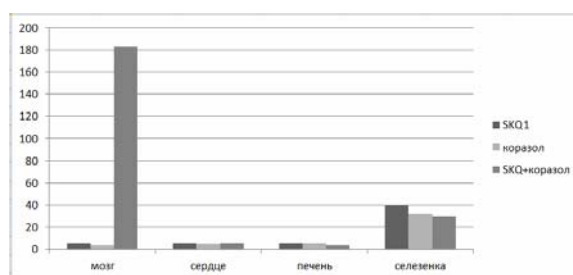


Рис.3. Динамика изменений активности ПНФ в мембранах митохондрий различных органов крыс

Особый интерес вызывает действие SkQ1 и коразола на печень, которая характеризуется достаточно высокой активностью ПНФ и резистентностью к различного рода воздействиям [4]. На рис. 2 и 3 наглядно видно ингибирующее действие SkQ1 и коразола на ПНФ-азную активность печеночной ткани как в экстракте, так и в мембранах митохондрий. В экстракте митохондрий активность ПНФ контрольной группы достаточно высока. Однако если в группе животных с введением только SkQ1 активность фермента значительно падает, а в других группах отсутствует, то в мембранах митохондрий активность ПНФ в контрольной группе, будучи изначально достаточно низкой, во всех остальных группах также отсутствует.

На рис. 4 показано, что в экстракте митохондрий мозга наблюдается выраженное (2.5 раза) повышение активности КК при смешанном воздействии SkQ1 и коразола, в то время как в мембранной фракции (рис.5) происходит понижение активности (1.5-2 раза). В экстракте митохондрий селезенки КК-активность отсутствует, а в мембранной фракции – наблюдается резкое, почти 3х-кратное повышение ее в группе SkQ1. Предполагается, что повышение активности может быть результатом диссоциации мембранно-связанной КК, приводящей к повышению активности фермента [4].

В сыворотке крови экспериментальных животных, а также в тканях исследуемых органов определялся уровень активности АЛТ, однако при воздействии препаратов SkQ1 и коразола каких-либо информативно достоверных изменений активности аминотрансфераз, являющихся биохимическими маркерами функционального состояния гепатоцитов, не наблюдалось.

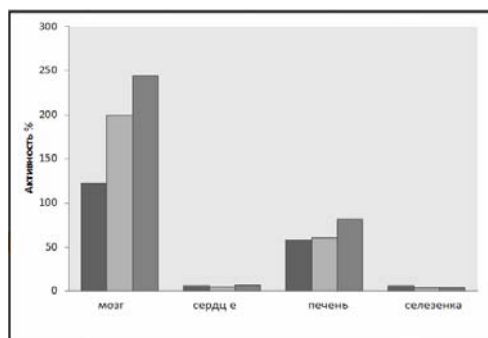


Рис.4. Динамика изменений активности КК в экстракте митохондрий различных органов крыс

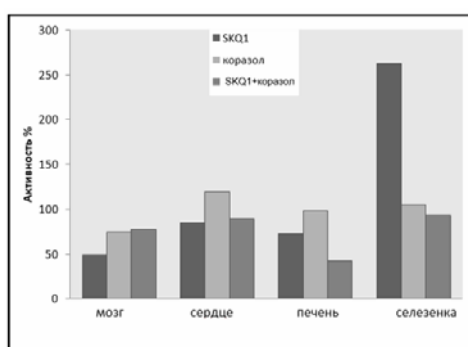


Рис.5. Динамика изменений активности КК в мембранах митохондрий различных органов крыс

Обобщая полученные результаты, можно заключить о некотором влиянии антиоксиданта SkQ1 в экстрактах и в мембранах митохондрий различных органов белых крыс на ферментную активность КК и ПНФ при эпилептиформных судорогах, вызванных коразолом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антоненко Ю.Н., Аветисян А.В., Бакеева Л.Е., Северина И.И., Симонян Р.А., Скулачев В.П. Производные пластохинона, адресованные в митохондрии, как средство, прерывающее программу старения. Биохимия. 73, 12, с.1589-1606, 2008.
2. Дзяк Л.А., Зенков Л.Р., Кириченко А.Г. Эпилепсия. К.: Книга-плюс, с.168, 2001.
3. Нерсесова Л.С., Газарянц М.Г., Мкртчян З.С., Погосян Л.Г., Акопян Ж.И. Влияние ионизирующей радиации на ферментные активности и состояние ядерно-ядрышкового аппарата гепатоцитов крыс. Радиационная биология. Радиоэкология. 53, 1, с.55-62, 2013.
4. Нерсесова Л.С., Газарянц М.Г., Мкртчян З.С., Погосян Л.Г., Акопян Ж.И. Действие низкоинтенсивного электромагнитного излучения с частотой 900 МГц на ферментные активности печени и сыворотки крови крыс. Радиационная биология. Радиоэкология. 54, 5, с.1-9, 2014.
5. Погосян Л.Г., Акопян Ж.И. Пуриннуклеозидфосфоорилаза. Биомедицинская химия, 59, 5, с.483-497, 2013.
6. Симонян Л.А., Симонян А.А., Бадалян Р.Б., Карагезян К.Г. АТФ-фосфогидролазная активность в мозге крыс при эпилептиформных припадках, индуцированных коразолом. Биолог. журн. Армении, 56, 3-4, с.226-231, 2004.
7. Симонян А.А., Симонян Р.А., Маргарян А.С., Симонян Л.А., Бадалян Р.Б., Гуроглян М.М. Изменения активности Ca^{2+} -зависимой АТФ-фосфогидролазы и влияние антиоксиданта SkQ1 в митохондриях тканей белых крыс при экспериментальных эпилептиформных судорогах. Биолог. журн. Армении. Приложение 1, 66, с.78-82, 2014.

8. *Симонян А.А., Симонян Р.А., Маргарян А.С.* Изменение активности АТФ-фосфогидролазы в митохондриях органов белых крыс под влиянием фактора антиоксидантного действия SkQ1 при эпилептиформных припадках, индуцированных пентилентетразолом. Доклады НАН РА. 114, 2, с. 136-142, 2014.
9. *Скулачев В.П.* Попытка биохимиков атаковать проблему старения: "Мегапроект" по проникающим ионам. Первые итоги и перспективы. Биохимия. 72, 12, с.1385-1396, 2007.
10. *Скулачев М.В. и др.* Митохондриально-ориентированные производные пластохинона. Влияние на старение и острые возрастные патологии. Curr Drug Targets. 12(6). С.800-826. 2011.
11. *Черкашина Д.В., Скулачев В.П.* Производное пластохинона SkQ1, адресованное в митохондрии, снижает ишемически-реперфузионные повреждения печени при гипотермическом хранении для трансплантации. Биохимия. 76, 19, с.1254-1263, 2011.
12. *Racine R.I.* Modification of seizure activity by electrical stimulation. Motor seizures. Electroencephall.Clin.Neurophysiol. 32. P.281-294. 1972.

Поступила 24.06.2015