

2.

ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՓԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

BIOLOGY

БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

**РЕГУЛИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ SKQ1 В АКТИВНОСТИ  
АТФАЗЫ В МИТОХОНДРИЯХ ОРГАНОВ БЕЛЫХ КРЫС  
ПРИ ПЕНТИЛЕНТЕТРАЗОЛ-ИНДУЦИРОВАННЫХ  
ЭПИЛЕПТИФОРМНЫХ СУДОРОГАХ**

**А. А. СИМОНЯН**

*Профессор, заслуженный деятель науки РА,  
заведующий кафедрой биологии, экологии и  
здорового образа жизни ГГУ,  
Институт биохимии им. Г.Бунятыана НАН РА*

**Р. А. СИМОНЯН**

*Кандидат биологических наук, доцент,  
Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, РФ*

**А. С. МАРГАРЯН**

*Кандидат биологических наук, доцент,  
преподаватель кафедры биологии, экологии и  
здорового образа жизни ГГУ,  
Институт биохимии им. Г. Бунятыана НАН РА*

**Л. А. СИМОНЯН**

*Кандидат медицинских наук, доцент,  
кафедра медико-биологических дисциплин  
Московского областного  
государственного социально-гуманитарного университета РФ*

**Р. Б. БАДАЛЯН**

*Кандидат биологических наук,  
Институт биохимии им. Г. Бунятыана НАН РА  
Младший научный сотрудник,  
Институт биохимии им. Г. Бунятыана НАН РА*

**М. М. ГУРОГЛЯН**

*Младший научный сотрудник,  
Институт биохимии им. Г. Бунятыана НАН РА*

**Н. В. МУРАДЯН**

*Выпускница магистратуры  
кафедры биологии, экологии и здорового образа жизни ГГУ,  
специалист отдела информации и связей с общественностью ГГУ*

Известно, что активные формы кислорода (АФК) – серьезная угроза для клеток и организмов [1, 8]. В митохондриях АФК обра-

зуются в гидрофобной области внутренней мембраны этих органоидов и инициируют цепные реакции перекисного окисления липидов. Снижается электрическое сопротивление внутренней митохондриальной мембраны и происходит разобщение дыхания и окислительного фосфорилирования. В Институте физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова синтезирован новый тип антиоксидантов (SkQ), и на митохондриях испытаны анти- и прооксидантные свойства этих веществ. Установлено, что катионные хиноны в микромолярных концентрациях являются сильнейшими прооксидантами [1, 8]. Их антиоксидантные свойства проявляются при меньших (субмикромолярных) концентрациях. Было показано, что SkQ1 быстро восстанавливается III комплексом дыхательной цепи митохондрий и является регенерируемым антиоксидантом многократного действия. На основании многочисленных исследований авторы этих соединений пришли к выводу о перспективности клинических испытаний препаратов типа SkQ как потенциальных лекарственных средств при лечении старческих недугов и широкого круга тяжелых патологий человека и животных.

В рамках проекта по проникающим ионам Лабораторией эмбриохимии Института биохимии им. Г.Х. Бунятына НАН Армении была поставлена задача исследовать влияние препаратов SkQ на энергетические реакции в митохондриях различных тканей белых крыс при пентилентетразол (ПТЗ)-индуцированных эпилептиформных припадках.

Проблема эпилепсии на протяжении последних десятилетий привлекает все большее внимание ученых различных специальностей. По данным мировой статистики, заболеваемость эпилепсией в ряде стран достигает 0,8-1% популяции, резко ограничивая профессиональную пригодность больного человека.

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 коразолом, статистически достоверно стимулируется функциональная активность АТФазы в митохондриях разных органов у белых крыс.

На основании этого в представленной работе мы исследовали сдвиги активности  $Mg^{2+}$ -зависимой АТФазы в изолированных митохондриях мозга, сердца, селезенки и печени белых крыс при пентилентетразол-индуцированных эпилептиформных припадках и корректирующее влияние антиоксидантного фактора SkQ1 на эти изменения в опытах *in vivo*.

Известно, что истинным субстратом митохондриальной АТФазы является Mg-АТФ [6, 7], причем имеются указания об их связи в активном центре фермента приблизительно с одинаковой пропорциональностью и эффективностью, что акцентирует исключительный интерес в направлении изучения особенностей сдвигов активности  $Mg^{2+}$ -АТФазы при эпилептиформных припадках и имеет важное прикладное значение.

**Материалы и методы.** В экспериментах использовались беспородные крысы-самцы массой 180-200 г, содержащиеся в условиях вивария при естественном освещении и свободном доступе к воде и пище. Эпилептиформные припадки вызывались одноразовым введением ПТЗ внутримышечно из расчета 8 мг на 100 г веса животного. Подопытные животные были разделены по следующим группам: I - контрольная группа - животным вводили 1мл физраствора. II группе в течение 2 дней вводили SkQ1 в расчете 37 нм вещества в 1мл воды ежедневно один раз. III группе животных вводили ПТЗ из расчета 8 мг на 100 г веса животного в 1мл воды. IV группе вводили SkQ1 + ПТЗ. Судорожное поведение наблюдали в течение 20 мин после инъекции ПТЗ. Стадии судорог определяли по модифицированной шкале Racine R.J. [13]:

**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 генерализованных тонико-клонических судорог. После декапитации соот-

ветствующие 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 в различных тканях 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 центрифугировали повторно.

Инкубационная смесь (1 мл) для определения АТФ-фосфогидазной активности содержала: 0.7 мл 0.25 М сахарозы-0.02 М трис-НСl буфера, 0.1 мл митохондрий (соответствующий 2-3 мг белка), 0.1 мл (2мМ) АТФ (производства Sigma chem. corp., США), растворенного в сахарозы-трис-НСl буфере и 0.1 мл 1 мМ  $Mg^{2+}$  ( $MgCl_2$ ) в конечной концентрации [3, 4, 6]. Время инкубации смеси 30 мин при температуре 37°C. Об активности АТФазы судили по нарастанию в среде содержания неорганического фосфата.  $P_{неорг}$  определяли по Лоури и соавт. [11] в модификации Скулачева [6] и пересчитывали на мг белка [12]. Полученные данные обработаны статистически. Достоверность различий между средними величинами определяли по t-критерию Стьюдента [2].

**Результаты и обсуждение.** Полученные данные экспериментов по изучению сдвигов активности  $Mg^{2+}$ -зависимой АТФазы в интактных митохондриях мозга крыс при ПТЗ-индуцированных эпилептиформных судорогах под воздействием SkQ1 приведены в табл. 1.

Таблица 1

**Сдвиги активности  $Mg^{2+}$ -зависимой  
АТФазы в митохондриях мозга белых крыс  
с ПТЗ-индуцированными эпилептиформными судорогами под  
воздействием SkQ1**

(ΔP в мкатомах / мг белка / 30 мин) M \*S.M.E.; n=9

Митохон- дрии	Контроль	SkQ1	ПТЗ	ПТЗ + SkQ1
Мозг	1.95 * 0.03	2.09*0.02 p<0.001*	2.55*0.02 p<0.001	2.34*0.02 p<0.001

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

Как показывают приведенные результаты, при внутримышечном введении крысам 37нм SkQ1 АТФазная активность в митохондриях мозга достоверно повышается. При инъекции ПТЗ каталитическая активность фермента еще больше увеличивается, достигая до 38.8 % по сравнению с контролем. Однако при совместном введении ПТЗ и SkQ1 несколько угнетается активность фермента по сравнению с введением только ПТЗ.

Интересные результаты получены относительно корректирующего влияния SkQ1 на активность АТФазы в митохондриях сердца белых крыс при эпилептиформных судорогах. Как показывают результаты, приведенные в табл. 2, изолированные митохондрии миокарда наделены более высокой каталитической активностью АТФазы по сравнению с мозговыми. В этих экспериментах под влиянием введенного крысам SkQ1 почти в два раза повышается активность фермента по сравнению с митохондриями интактных животных. ПТЗ также приводит к активированию фермента, однако относительно меньше, чем SkQ1. Интересно отметить, что совместно введенные ПТЗ и SkQ1 заметно подавляют процесс катализа макроэргов, доводя активность фермента почти до уровня контрольных цифр.

Таблица 2

**Изменения активности Mg<sup>2+</sup>-зависимой АТФазы в митохондриях сердечной ткани с эпилептиформными судорогами под влиянием SkQ1**  
(ΔР в мкатомах / мг белка / 30 мин) M °S.M.E.; n=9

итохон- дрии	Контроль	SkQ1	ПТЗ	ПТЗ + SkQ1
Сердце	<b>13.04 ± 0.32</b>	<b>23.09 ± 0.23</b> p<0.001	<b>18.77 ± 0.96</b> p<0.001	<b>11.85 ± 0.08</b> p<0.001

При тех же условиях опыта в изолированных митохондриях селезенки крыс наблюдается иная картина каталитической активности АТФазы (табл. 3).

Таблица 3

**Сдвиги активности  $Mg^{2+}$ -зависимой АТФазы в митохондриях селезенки белых крыс с ПТЗ-индуцированными эпилептиформными судорогами под влиянием SkQ1**

( $\Delta P$  в мкатомах / мг белка / 30 мин)  $M \pm S.M.E.$ ; n=9)

Митохондрии	Контроль	SkQ1	ПТЗ	ПТЗ + SkQ1
Селезенка	<b>4.50 <math>\pm</math> 0.02</b>	<b>5.60 <math>\pm</math> 0.002</b> p<0.001	<b>4.09 <math>\pm</math> 0.05</b> p<0.001	<b>6.69 <math>\pm</math> 0.06</b> p<0.001

Как показывают результаты, приведенные в таблице 3, введение животным SkQ1 приводит к достоверному (24.4%) повышению активности АТФазы по сравнению с митохондриями той же ткани интактных животных. Интересно отметить, что совместное введение ПТЗ и SkQ1 заметно (48.7%) стимулирует активность фермента по сравнению с контролем и на 62.8% по сравнению с данными, полученными при введении животным только ПТЗ.

SkQ1 при ПТЗ-индуцированной эпилепсии заметно (48.4% по сравнению с контролем) активизирует АТФазу (табл. 4). При инъекции ПТЗ также наблюдается достоверное активирование катализа макроэргов ферментом. В то же время совместное введение ПТЗ и SkQ1 не приводит к каким-либо ощутимым отклонениям по сравнению с показателями, полученными под влиянием ПТЗ или SkQ1 отдельно взятыми.

Таблица 4

**Изменения активности  $Mg^{2+}$ -зависимой АТФазы в митохондриях печени белых крыс с ПТЗ-индуцированными эпилептиформными судорогами под влиянием SkQ1**

( $\Delta P$  в мкатомах / мг белка / 30 мин)  $M \pm S.M.E.$ ; n=9)

митохондрии	Контроль	SkQ1	ПТЗ	ПТЗ + SkQ1
Печень	<b>2.50 <math>\pm</math> 0.11</b>	<b>3.71 <math>\pm</math> 0.14</b> p<0.001	<b>3.14 <math>\pm</math> 0.10</b> p<0.001	<b>3.32 <math>\pm</math> 0.03</b> p<0.001

Результаты ранее проведенных нами исследований продемонстрировали повышение интенсивности течения метаболических процессов в митохондриях мозговой ткани у белых крыс с коразол-индуцированными эпилептиформными припадками при заметном снижении в ней уровня активности каталазы, как результат утилизации ее в процессе нейтрализации растущего количества  $H_2O_2$  [4, 5].

Обобщая полученные результаты настоящей работы, можно заключить о статистически достоверном стимулировании  $Mg^{2+}$ -АТФазы в интактных митохондриях различных тканей при эпилептиформных судорогах у белых крыс, индуцированных ПТЗ. Так как ПТЗ является судорожным ядом, можно предположить, что стимулирование дыхательного центра и, следовательно, внешнего дыхания приводит к накоплению кислорода в организме и образованию супероксидов, которые, согласно литературным данным [9, 10], способствуют ингибированию АТФ-фосфогидролазной реакции. Однако, благодаря подключению соответствующих адаптационных механизмов в создавшихся для организма необычных условиях существования, происходит стимулирование синтеза АТФазы как необходимого сдвига для поддержания оптимального уровня энергетического баланса при изученной патологии.

Эндогенно введенный SkQ1 выступает в роли мощного антиоксидантного стимулятора эндогенной системы антирадикальной защиты клетки. Это проявляется в нейтрализации ПТЗ-индуцированных супероксидных радикалов и, тем самым, в нивелировании чрезмерно повышенной АТФ-фосфогидролазной активности. Таким образом, SkQ1 играет корригирующую роль в поддержании нормального физиологического статуса функционирования реакций энергетического метаболизма в тканях белых крыс с моделированными эпилептиформными припадками.

**Ключевые слова:** АТФ-аза, митохондрии,  $Mg^{2+}$ -АДФаза

## ЛИТЕРАТУРА

1. Антоненко Ю. Н., Аветисян А. В., Бакеева Л. Е., Симонян Р. А., Скулачев В. П. и др., Производное пластохинона: синтез и исследование *in vitro*. // Биохимия. 2008. Т. 73. вып. 12. С. 1589-1606.

2. **Бессмертный Б. С.**, Математическая статистика в клинической, профилактической и экспериментальной медицине. М., 1967.
3. **Симонян А. А., Бадалян Р. Б., Симонян Л. А., Степанян Р. А., Галоян А. А.**, Регуляция энергетического метаболизма под действием обогащенного пролином полипептида гипоталамуса. // Ж.Нейрохимия.2002. Т. 19. №2. С.143-145.
4. **Симонян Л. А., Симонян А. А., Карагезян К. Г.**, АТФ-фосфогидролазная активность в мозге крыс при эпилептиформных припадках, индуцированных коразолом. // Биол.ж. Армении. 2004. Т. 56. N 3-4. С. 226-231.
5. **Симонян Л. А., Симонян А. А., Бадалян Р. Б., Маргарян А. С., Симонян Р. А., Карагезян К. Г.**, Корректирующий эффект  $\alpha$ -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. 2005. Т. 10. N 5. С. 174-176.
6. **Скулачев В. П.**, Энергетика биологических мембран. М.: Наука. 1989. – 564 стр.
7. **Скулачев В. П.**, Аккумуляция энергии в клетке. М.: Наука. 1969. – 439 стр.
8. **Bakoeva L. E, Barskov I. V., Egorov M. V., Isaev N. K., Skulachev V. P. et al.**, Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. // Biochemistry (Moscow). 2008. V. 73. N 12. P. 1288-1299.
9. **Das D. K., Neogi A.**, Effects of superoxide anions on the Na,K-ATPase system in rat lung. // Clin. Physiol. Biochem. 1984. V. 2. P. 32–38.
10. **Jain S. K., Lim G.**, Pyridoxine and pyridoxamine inhibits superoxide radicals and prevents lipid peroxidation, protein glycosylation, and Na,K-ATPase activity reduction in high glucose-treated human erythrocytes. // Free Radic. Biol. Med. 2001. V. 30, N 3. P. 232–237.
11. **Lowry O. H., Lopez J. A.**, Determination of inorganic phosphate in the presence of labelling ester. // J. Biol. Chem. 1946. V. 162. P. 421.
12. **Lowry O. H., Rosebrough N. J., Parr A. L., Randall R. J.**, Protein measurement with the folin-phenol reagent. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265-275.
13. **Racine R. J.**, Modification of seizure activity by electrical stimulation. II Motor seizures. // Electroencephal. Clin. Neurophysiol. 1972. V. 32. P. 281–294.

**ԱԵՖ-ԱԶԱՅԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ԿԱՐԳԱՎՈՐՈՒՄԸ SKQ1-ՈՎ ՍՊԻՏԱԿ ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ՕՐԳԱՆՆԵՐԻ ՄԻՏՈՔՈՆԴՐԻՈՒՄՆԵՐՈՒՄ ՊԵՆՏԻԼԵՆՏԵՏԵՐԱԶՈՒՈՎ ՄԱԿԱԾՎԱԾ ԷՊԻԼԵՊՍԱՆՄԱՆ ՑՆՑՈՒՄՆԵՐԻ ԴԵՊՔՈՒՄ**

**Ա. Ա. ՄԻՄՈՆՅԱՆ**

*Կենսաբանական գիտությունների դոկտոր, պրոֆեսոր,  
ԴԴ գիտության վաստակավոր գործիչ,  
ԳՊԴ կենսաբանության, էկոլոգիայի և առողջ  
ապրելակերպի ամբիոնի վարիչ,  
ԴԴ ԳԱԱ Դ. Բունիաթյանի անվան կենսաքիմիայի ինստիտուտ*

**Ռ. Ա. ՄԻՄՈՆՅԱՆ**

*Կենսաբանական գիտությունների թեկնածու, դոցենտ*

**Ա. Ս. ՍԱՐԳՍՅԱՆ**

*Կենսաբանական գիտությունների թեկնածու, դոցենտ,  
ԳՊԴ կենսաբանության, էկոլոգիայի և առողջ ապրելակերպի ամբիոն,  
ԴԴ ԳԱԱ Դ. Բունիաթյանի անվան կենսաքիմիայի ինստիտուտ*

**Լ. Ա. ՄԻՄՈՆՅԱՆ**

*Բժշկական գիտությունների թեկնածու, դոցենտ, Մոսկվայի մարզային  
սոցիալ-հումանիտար պետական համալսարան,  
բժշկա-կենսաբանական դիսցիպլինների ամբիոն*

**Ռ. Բ. ԲԱՂԱՅԱՆ**

*Կենսաբանական գիտությունների թեկնածու,  
ԴԴ ԳԱԱ Դ. Բունիաթյանի անվան կենսաքիմիայի ինստիտուտ*

**Մ. Մ. ԳՈՒՐՕՂՅԱՆ**

*ԴԴ ԳԱԱ Դ. Բունիաթյանի անվան կենսաքիմիայի ինստիտուտի կրտսեր  
գիտաշխատող*

**Ն. Վ. ՍՈՒՐԱՂՅԱՆ**

*ԳՊԴ բնագիտական ֆակուլտետի կենսաբանության բաժնի  
մագիստրատուրայի շրջանավարտ,  
ԳՊԴ հանրության հետ կապերի և լրատվության բաժնի մասնագետ*

Էկզզոգեն ներարկված SkQ1-ը բարձր ակտիվությամբ օժտված հակաօքսիդանտային գործոն է բջջի հակառադիկալային պաշտպանության համակարգում: Դա դրսևվորվում է նաև սպիտակ առնետների տարբեր հյուսվածքներից անջատված միտոքոնդրիոմներում պենտիլենտետրազոլով մակածված էպիլեպսամման ցնցումների դեպքում սուպերօքսիդ-ռադիկալների չեզոքացման և ԱԵՖ-ֆոսֆոհիդրոլազի ակտիվության մեջ շեղումները համահարթեցնելու ուղղությամբ:

*Բանալի բառեր - ԱԵՖ-ազա, միտոքոնդրիումներ, Mg<sup>2+</sup> ԱԵՖ-ազա*

**REGULATING EFFECT OF SKQ1 ON ATPASES ACTIVITY IN  
MITOCHONDRIA OF WHITE RATS AT PENTYLENETETRAZOL-INDUCED  
EPILEPTIFORM CONVULSIONS**

**A. A. SIMONYAN**

*Doctor of Biology, Professor, RA Honoured Scientist,  
Head of GSU Chair of Biology, Ecology and Healthy Lifestyle,  
Institute of Biochemistry after H. Buniatian, NAS RA, Yerevan*

**R. A. SIMONYAN**

*PhD of Biology, Assistant Professor  
Institute of Physical and chemical Biology MSY*

**A. S. MARGARYAN**

*PhD of Biology, Assistant Professor,  
GSU Chair of Biology, Ecology and Healthy Lifestyle,  
Institute of Biochemistry after H. Buniatian, NAS RA, Yerevan*

**L. A. SIMONYAN**

*PhD of Medical Sciences, Assistant Professor,  
Moscow Regional Socio-Humanitarian University,  
Chair of Medico-biological Disciplines*

**R. B. BADALYAN**

*PhD of Biology,  
Institute of Biochemistry after H. Buniatian, NAS RA, Yerevan*

**M. M. GUROGHLYAN**

*Junior Researcher at the Institute of Biochemistry after H. Buniatian, NAS RA,  
Yerevan*

**N. V. MURADYAN**

*MA Graduate of GSU Faculty of Natural Sciences, Department of Biology,  
Specialist of GSU Public Relations and Information Department*

Exogenously injected SkQ1 is a highly active antiradical factor of cell antioxidant defense system is displayed. This is also reflected in the correlation deviations activity of superoxide-radicals and ATP-phosphohydrolase activities in the mitochondria of white rats various tissues during pentylenetetrazol-induced epileptiform convulsions.

**Key words:** *ATP-ase, SkQ1, mitochondrium*