

**СДВИГИ В АКТИВНОСТИ Ca^{2+} -ЗАВИСИМОЙ АТФ-
ФОСФОГИДРОЛАЗЫ В МИТОХОНДРИЯХ ТКАНЕЙ
БЕЛЫХ КРЫС ПОД ВЛИЯНИЕМ АНТИОКСИДАНТА SKQ1
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЭПИЛЕТИФОРМНЫХ
СУДОРОГАХ**

А. А. СИМОНЯН

*Профессор, заслуженный деятель науки РА,
заведующий кафедрой биологии, экологии и здорового образа
жизни ГГУ,*

Институт биохимии им. Г. Бунятыяна 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. Бунятыяна 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. Бунятыяна НАН РА*

М. М. ГУРОГЛЯН

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

Н. В. МУРАДЯН

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

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, в липидных мицеллах, в изолированных митохондриях, предотвращают окисление митохондриального кардиолипина под действием радикала $\text{OH}^\bullet$, увеличивают выживаемость клеток гиперчувствительных к активных форм кислорода (АФК) [9, 13]. АФК представляют серьезную опасность для клеток и целого организма. Многими 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 повреждение митохондриальной ДНК, локализованной вблизи внутренней мембраны [1]. Одновременно было показано, 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 в представленной работе мы в *in vivo* опытах 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 Са из саркоплазматического ретикулума и его взаимодействия с сократительными белками.

Материалы и методы. В экспериментах использовали беспородные крысы-самцы массой 180-200г, содержавшихся в условиях виварии при естественном освещении и свободном доступе к воде и пище. Эпилептиформные припадки вызывали 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 животным 2 дня вводили SkQ1 в расчете 37 нм SkQ1 в 1мл воды один раз в каждый день. III - группе животным вводили ПТЗ 8 мг на 100г 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. [14].

Животных декапитировали после полного проявления генерализованных тонико-клонических судорог. После декапитации соответствующие ткани быстро извлекали, промывали охлажденном растворе 0.25 М сахарозы- 0.02 М трис-HCl 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 HCl буфере и центрифугировали повторно.

Инкубационная смесь (1мл) для определения АТФ-фосфогидролазной активности содержала: 0.7 мл 0.25 М сахарозы – 0.02 М трис-HCl буфера, 0.1 мл митохондрий (соответствующей 2-3 мг белка), 0.1 мл (2 мМ) АТФ (производства Sigma chem. corp., США), растворенного в сахарозы-трис-HCl буфере и 0.1 мл 1 мМ 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. $P_{\text{неорг.}}$ 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-индуцированными эпилептиформными судорогами под воздействием SkQ1.

Таблица 1

Влияние SkQ1 на активность Ca^{2+} -АТФазы в митохондриях мозга 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
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 и 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 намечается (табл. 2). Однако стимулируется активность фермента при совместном введении ПТЗ и SkQ1.

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) $M \pm S.M.E.$; $n=9$

митохон- дрии	Контроль	SkQ1	ПТЗ	ПТЗ + SkQ1
Печень	1.90 $\pm$ 0.01	1.82 $\pm$ 0.02 $p < 0.010$	2.71 $\pm$ 0.04 $p < 0.001$	3.15 $\pm$ 0.08 $p < 0.001$

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

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) $M \pm S.M.E.$; $n=9$

Митохон- дрии	Контроль	SkQ1	ПТЗ	ПТЗ + SkQ1
Селезенка	1.69 $\pm$ 0.05	4.49 $\pm$ 0.13 $p < 0.001$	3.41 $\pm$ 0.12 $p < 0.001$	3.71 $\pm$ 0.07 $p < 0.001$

Интересные результаты получены активности фермента в изолированных митохондриях сердца (табл. 4). Полученные данные, приведенные в этой таблице, показывают, что изолированные

митохондрии миокарда наделены более высокой каталитической активностью Ca^{2+} -АТФазы по сравнению с аналогичными оргanelлами других органов. В митохондриях миокарда под влиянием введенного крысам SkQ1 активность фермента несколько подавляется. Однако при введении животным ПТЗ, наоборот, активность фермента заметна (58.0%) стимулируется. Аналогичные результаты в активности Ca^{2+} -АТФазы получены также при совместном 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 $\pm$ 0.001	6.29 $\pm$ 0.37 p < 0.025	11.36 $\pm$ 0.33 P < 0.001	10.34 $\pm$ 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 припадкам.

Ключевые слова: эпилепсия, Ca^{2+} -АТФаза, митохондрии, активные формы кислорода, SkQ1

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. 2008. Т. 73. вып. 12. С. 1589-1606.
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. // Биол.ж. Армении. 2004. Т. 56. N 3-4. С. 226-231.

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. 2005. Т. 10. N 5. С. 174-176.
5. **Симонян Л. А., Симонян Г. М., Симонян А. А., Симонян М. А.,** Повреждающее воздействие эпилептогена коразола на металлопротеины крови *in vivo*. // Мед. наука Арении. 2005. Т. XIV, N 1. С. 30-33.
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. // Ж.Нейрохимия. 2002. Т. 19. №2. С.143-145.
7. **Скулачев В. П.,** Энергетика биологических мембран. М.: Наука. 1989. – 564 стр.
8. **Grinius L. L., Jasaitis A. A., Kadziauskas 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. 1970. V. 216. P. 1-12.
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. 2005. V. 28. P. 21295-21312.
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. 1969. V. 222. P. 1076-1078.
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. **Murphy M. PS., Smith R. A.,** Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations. // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2007. V. 47. P. 629-656.
14. **Racine R. J.,** Modification of seizure activity by electrical stimulation. II Motor seizures. // Electroencephal. Clin. Neurophysiol. 1972. V. 32. P. 281-294.
15. **Severin S. E., Skulachev V. P., Yaguzinsky L. A.,** A possible role of carnitine in transport of fatty acids through the mitochondrial membrane. // Биохимия. 1970. V. 35. P. 1250-1257.

**Ca²⁺-ԿԱԽՅԱԼ ԱԵՖ-ՖՈՍՖՈՐԴԻՊՈԼԱԶԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՏԵՂԱՇԱՐԺԵՐԸ
ՄՊԻՏԱԿ ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ԴՅՈՒՄՎԱԾՔՆԵՐԻ ՄԻՏՈՔՈՆԴՐԻՈՒՄՆԵՐՈՒՄ ՏՈՂ1
ԴԱԿԱՕՔՍԻԴԱՆՏԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՄԲ ՓՈՐՉԱՐԱՐԱԿԱՆ ԷՊԻԼԵՊՍԱՆՄԱՆ
ՑՆՑՈՒՄՆԵՐԻ ԴԵՊՔՈՒՄ**

Ա. Ա. ՍԻՄՈՆՅԱՆ

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

Ռ. Ա. ՍԻՄՈՆՅԱՆ

*Կենսաբանական գիտությունների թեկնածու, դոցենտ
ՄՊՀ Ա. Ն. Բելոզերսկու անվան ֆիզիկո-քիմիական կենսաբանության ինստիտուտ*

Ա. Ս. ՄԱՐԳԱՐՅԱՆ

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

Լ. Ա. ՍԻՄՈՆՅԱՆ

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

Ռ. Բ. ԲԱՐԱԼՅԱՆ

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

Մ. Մ. ԳՈՒՐՕՂՅԱՆ

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

Ն. Վ. ՄՈՒՐԱԴՅԱՆ

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

Սպիտակ առնետների փորձարարական էպիլեպսանման ցնցումների դեպքում, ի տարբերություն Mg²⁺-կախյալ ԱԵՖազայի, SkQ1 հակաօքսիդանտի էկզոգեն ներարկման դեպքում տարբեր հյուսվածքներից անջատված միտոքոնդրիումներում Ca²⁺-կախյալ ԱԵՖազայի ակտիվության շեղումների նկատելի համահարթեցում չի դրսևորվում:

Բանալի բառեր - էպիլեպսիա, Ca²⁺-ԱԵՖազա, միտոքոնդրիում, թթվածնի ակտիվ ձևեր, SkQ1

**CHANGES IN THE ACTIVITY OF Ca^{2+} -DEPENDENT ATP-
PHOSPHOHYDROLASE IN MITOCHONDRIA OF WHITE RATS TISSUES
UNDER THE INFLUENCE OF ANTIOXIDANT SKQ1 AT EXPERIMENTAL
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. GUROGHLIAN

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

N. V. MURADYAN

*Graduate of GSU Faculty of Natural Sciences, Department of Biology, Master's Degree,
Specialist of GSU Public Relations and Information Department*

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.

Key words: Ca^{2+} -ATPase, mitochondrion, SkQ1, active, form of oxygen