

АНАЛИЗ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ РЕАКЦИЙ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО
МЕТАБОЛИЗМА В ТКАНЯХ С МОДЕЛИРОВАННЫМИ ЭПИЛЕПТИФОРМНЫМИ
ПРИПАДКАМИ

УДК: 577.15.04+577.151.04

DOI: 10.56246/18294480-2024.16-49

СИМОНЯН ЛУСИНЕ

Кандидат медицинских наук, доцент

Государственное образовательное учреждение

высшего образования Московской области

«Государственный социально-гуманитарный университет»

Электронная почта: lusinesi1@mail.ru

СИМОНЯН АРМЕН

Заслуженный деятель науки РА, профессор

Доктор биологических наук, почетный профессор ГГУ

Электронная почта: simarmen@mail.ru

ОГАННИСЯН МАРИНЕ

Преподаватель кафедры биологии, экологии

и здорового образа жизни ГГУ

электронная почта: marine.hovhannisyan@ggu.am

Биохимические механизмы патогенеза эпилепсии связаны с расстройством ионных, медиаторных и энергетических процессов. Было показано, что при эпилептиформных припадках, индуцированных коразолом, статистически достоверно стимулируется функциональная активность АТФазы в митохондриях разных органов. SkQ1 играет корректирующую роль в поддержании нормального физиологического статуса функционирования реакций энергетического метаболизма в тканях с моделированными эпилептиформными припадками.

За счет активации соответствующих адаптивных механизмов в необычных условиях существования, созданных для организма, стимулируется синтез АТФазы как необходимый сдвиг для поддержания оптимального уровня энергетического баланса при изучаемой патологии.

Наша цель исследовать сдвиги активности Mg^{2+} -зависимой АТФазы в изолированных митохондриях мозга, сердца, селезенки и печени белых крыс при пентилентетразол-индуцированных эпилептиформных припад-

ках и корректирующее влияние антиоксидантного фактора SkQ1 на эти изменения в опытах *in vivo*.

Эндогенно введенный SkQ1 действует как мощный антиоксидантный стимулятор эндогенной системы антирадикальной защиты клетки. Это проявляется в нейтрализации ПТЗ-индуцированных супероксидных радикалов и, таким образом, в нивелировании чрезмерно повышенной активности АТФ-фосфогидролазы. Таким образом, SkQ1 играет корректирующую роль в поддержании нормального физиологического состояния функционирования реакций энергетического обмена в тканях белых крыс с моделированными эпилептиформными припадками.

Ключевые слова: активные формы кислорода, SkQ1, Mg^{2+} -зависимая АТФаза, пентилентетразол-индуцированные эпилептиформные припадки.

Актуальность. 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. Экспериментально было показано, что при эпилептиформных припадках, индуцированных коразолом, статистически достоверно стимулируется функциональная активность АТФазы в митохондриях разных органов [3, 4, 5].

Известно, что активные формы кислорода (АФК) – серьезная угроза для клеток и организмов [1, 7]. В митохондриях АФК образуются 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. Установлено, что катионные хиноны в микромолярных концентрациях являются сильнейшими прооксидантами [1, 7]. Их

антиоксидантные свойства проявляются при меньших (субмикромольных) концентрациях. Было показано, что SkQ1 быстро восстанавливается компонентами I и II 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.

Цель исследования. Изучить влияние препаратов SkQ на энергетические реакции в митохондриях различных тканей белых крыс при пентилентетразол (ПТЗ)-индуцированных эпилептиформных припадках.

На основании этого, в представленной работе исследовались 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], 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.

Методика и организация исследования. 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 внутрибрюшинно 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. [12]:

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 соответствующие ткани быстро извлекали, промывали в 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 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-фосфогидролазной активности содержала: 0.7 мл 0.25 М сахарозы-0.02 М трис-HCl буфера, 0.1 мл митохондрий (соответствующий 2-3 мг белка), 0.1 мл (2мМ) АТФ (производства Sigmachem. corp., США), растворенного в сахарозы-трис-HCl 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. [10] в модификации Скулачева [6] и пересчитывали на мг белка [11]. Полученные данные обработаны статистически. Достоверность различий между средними величинами определяли по t-критерию Стьюдента [2].

Результаты исследования и их 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 мкатамах / мг белка / 30 мин) $M \pm S.M.E.$, $n=9$

Митохондрии	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, как и в следующих таблицах, p - по сравнению с контролем.*

Как показывают приведенные результаты, при внутрибрюшинном введении крысам 37мг 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 достоверно угнетается активность фермента по сравнению с изолированным введением 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^{2+} -зависимой АТФазы в митохондриях сердечной ткани с эпилептиформными судорогами под влиянием SkQ1 (ΔP в мкатомах / мг белка / 30 мин) $M \pm S.M.E.$, n=9)

Митохондрии	Контроль	SkQ1	ПТЗ	ПТЗ + SkQ1
Сердце	13.04 ± 0.32	23.09 ± 0.23 p<0.001	18.77 ± 0.96 p<0.001	11.85 ± 0.08 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 (ΔP в мкатомах / мг белка / 30 мин) $M \pm S.M.E.$, n=9)

Митохондрии	Контроль	SkQ1	ПТЗ	ПТЗ + SkQ1
Селезенка	4.50 ± 0.02	5.60 ± 0.002 p<0.001	4.09 ± 0.05 p<0.001	6.69 ± 0.06 p<0.001

Как показывают результаты, приведенные в табл. 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) активирует 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 (ΔP в мкатомах / мг белка / 30 мин) $M \pm S.M.E.$, $n=9$)

Митохондрии	Контроль	SkQ1	ПТЗ	ПТЗ + SkQ1
Печень	2.50 ± 0.11	3.71 ± 0.14 $p < 0.001$	3.14 ± 0.10 $p < 0.001$	3.32 ± 0.03 $p < 0.001$

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].

Заключение. 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 [8, 9], 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 корректирующую роль в поддержании нормального физиологического статуса функционирования реакций энергетического метаболизма в тканях белых крыс с моделированными эпилептиформными припадками.

Список использованной литературы

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 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, N5, с. 174-176.
6. Скулачев В. П., Энергетика биологических мембран, М., Наука, 1989, 564 стр.
7. Bakeeva, 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.
8. 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.

9. 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.

10. Lowry, O. H., Lopez, J. A. Determination of inorganic phosphate in the presence of labelling ester. // J. Biol. Chem. 1946. V. 162. P. 421.

11. 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.

12. Racine, R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II Motorseizures. // Electroencephal.Clin.Neurophysiol. 1972. V. 32. P. 281–294.

**ՄՈԴԵԼԱՎՈՐՎԱԾ ԷՊԻԼԵՊՍԱՆՄԱՆ ՆՈՊԱՆԵՐՈՎ ՀՅՈՒՍՎԱԾՔՆԵՐՈՒՄ
ԷՆԵՐԳԵՏԻԿ ՆՅՈՒԹԱՓՈԽԱՆԱԿՈՒԹՅԱՆ ՌԵԱԿՑԻԱՆԵՐԻ
ՖՈՒՆԿՑԻՈՆԱԼՈՒԹՅԱՆ ՎԵՐԼՈՒԾՈՒԹՅՈՒՆԸ**

ՍԻՄՈՆՅԱՆ ԼՈՒՍԻՆԵ

*Մոսկվայի մարզային «Պեդական սոցիալ-հումանիտար
համալսարան» բարձրագույն կրթության պեդական
կրթական հաստատություն,
բժշկական գիտությունների թեկնածու, դոցենտ
Էլփոստ՝ lusines1@mail.ru*

ՍԻՄՈՆՅԱՆ ԱՐՄԵՆ

*ՀՀ գիտության վաստակավոր գործիչ, պրոֆեսոր,
կենսաբանական գիտությունների դոկտոր,
ԳՊՀ պատվավոր պրոֆեսոր
Էլփոստ՝ simarmen@mail.ru*

ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ ՄԱՐԻՆԵ

*ԳՊՀ կենսաբանության, էկոլոգիայի
և առողջ ապրելակերպի ամբիոնի դասախոս
Էլփոստ՝ marine.hovhannisyan@gsu.am*

Էպիլեպսիայի ախտաբանության կենսաքիմիական մեխանիզմները կապված են իոնային, մեդիատորային և էներգետիկ պրոցեսների խանգարմամբ: Ցույց է տրված, որ կորագլոլ մակաձված էպիլեպսանման նոպաների ժամանակ տարբեր օրգանների միտոքոնդրիումներում խթանվում է ԱՏՖազայի ֆունկցիոնալ

ակտիվությունը: SkQ1-ը կարգավորիչ դեր է կատարում մոդելավորված էպիլեպսանման նոպաներով հյուսվածքներում էներգետիկ նյութափոխանակության ռեակցիաների ֆունկցիոնալության նորմալ ֆիզիոլոգիական կարգավիճակի պահպանմանը:

Գոյության ոչ սովորական պայմաններում համապատասխան հարմարողական մեխանիզմների ակտիվացման հաշվին խթանվում է ԱՏՖագի սինթեզը որպես անհրաժեշտ փոփոխություն էներգետիկ հավասարակշռության օպտիմալ մակարդակը պահպանելու համար ուսումնասիրվող ախտաբանության դեպքում:

Մեր նպատակն է ուսումնասիրել Mg^{2+} -կախյալ ԱՏՖագայի ակտիվության տեղաշարժերը միտոքոնդրիումներում, որոնք անջատվել են պենթիլենտետրազոլ-մակաձված էպիլեպսանման նոպաների դեպքում սպիտակ առնետների ուղեղից, սրտից, փայծաղից և լյարդից, և SkQ1 հակաօքսիդանտային գործոնի կարգավորիչ ազդեցությունը այդ փոփոխությունների վրա *in vivo* փորձերի ժամանակ:

Էնդոգեն ներմուծված SkQ1-ը ազդում է որպես բջջի պաշտպանական հակառադիկալային էնդոգեն համակարգի հզոր հակաօքսիդանտային խթանիչ: Դա դրսևորվում է ՊՏՁ-մակաձված սուպերօքսիդ ռադիկալների չեզոքացմամբ և այդպիսով ԱՏՖ-ֆոսֆոհիդրոլազների չափազանց բարձր ակտիվության մակարդակի կարգավորմամբ:

Այսպիսով, SkQ1-ը ունի կարգավորիչ դեր սպիտակ առնետների՝ մոդելավորված էպիլեպսանման նոպաներով հյուսվածքներում էներգետիկ փոխանակության ռեակցիաների ֆունկցիոնալության նորմալ ֆիզիոլոգիական վիճակը պահպանելու գործում:

Բանալի բառեր՝ թթվածնի ակտիվ ձևեր, SkQ1, Mg^{2+} -կախյալ ԱՏՖագա, պենթիլենտետրազոլ-մակաձված էպիլեպսանման նոպաներ:

ANALYSIS OF THE FUNCTIONING OF ENERGY METABOLISM REACTIONS IN TISSUES WITH SIMULATED EPILEPTIFORM SEIZURES

SIMONYAN LUSINE

Doctor of Medical Science,

Associate Professor,

State Educational Institution of

Higher Education of the Moscow Region

"State Social and Humanitarian University"

e-mail: lusinesil@mail.ru

SIMONYAN ARMEN

RA Honoured Scientist,

Doctor of Biology, Professor,

e-mail: simarmen@mail.ru

HOVHANNISYAN MARINE

Lecturer of the Chair of Biology,

Ecology and Healthy Lifestyle, GSU

e-mail: marine.hovhannisyan@gsu.am

Biochemical mechanisms of the pathogenesis of epilepsy are associated with a disorder of ionic, mediator and energy processes. It was shown that epileptiform seizures induced by corazole significantly stimulated the functional activity of ATPase in the mitochondria of various organs. SkQ1 plays a corrective role in maintaining the normal physiological status of the functioning of energy metabolism reactions in tissues with simulated epileptiform seizures.

Due to the activation of the appropriate adaptive mechanisms in the unusual conditions of existence created for the body, the synthesis of ATPase is stimulated as a necessary shift to maintain the optimal level of energy balance in the studied pathology.

Endogenously introduced SkQ1 acts as a powerful antioxidant stimulator of the endogenous system of cell antiradical defense. This manifests itself in the neutralization of PTZ-induced superoxide radicals and, thus, in the leveling of excessively increased ATP-phosphohydrolase activity. Thus, SkQ1 plays a corrective role in maintaining the normal physiological status of the functioning of energy metabolism reactions in the tissues of white rats with simulated epileptiform seizures.

Keywords: *reactive oxygen species, SkQ1, Mg²⁺-dependent ATPase, pentylenetetrazole-induced epileptiform seizures.*

Հոդվածը ներկայացվել է խմբագրական խորհուրդ 23.04.2023թ.:

Հոդվածը գրախոսվել է 12.05.2023թ.:

Ընդունվել է տպագրության 17.05.2024թ.: