

АТФазная активность в мембранах митохондрий печени крыс при эпилептиформных припадках, индуцированных коразолом, и корригирующее действие антиоксидантных факторов

А.А. Симонян, Л.А. Симонян, И.Г. Батикян

Институт биохимии им. Г.Х. Бунятына НАН РА

375014, Ереван, ул. П. Севака, 5/1

Ключевые слова: эпилептиформные припадки, коразол, АТФаза, митохондрии

Молекулярные механизмы патогенеза острого эпилептиформного припадка (ЭФП) продолжают оставаться в поле зрения исследователей различных направлений неврологии академического и прикладного профиля. Отсутствие принципиально новой информации, позволяющей выявить истинные причинно-следственные связи, обуславливающие природу указанной патологии, создает существенные трудности в поиске мер по нивелированию причин, лежащих в основе инициации, развития и генерализации этиопатогенетических механизмов эпилепсии. С этой точки зрения особого внимания заслуживают расстройства, происходящие в различных структурах как целостных клеток, так и их субклеточных образований, а также протекающих в них процессов метаболизма и функциональной активности.

Исходя из вышеизложенного, мы задались целью проследить в мембранных структурах митохондрий печени экспериментальных крыс за характером сдвигов активности АТФ-фосфогидролазы при коразоловых припадках, вызванных как у интактных животных, так и спустя 10-15 мин после предварительного введения им тиосульфата натрия (ТСН) и α -токоферола (α -ТФ). Такая постановка вопроса имела принципиально важное значение, поскольку ТСН в настоящее время отводится роль мощного синергиста гидроксиформы α -ТФ как единственного проявления антиоксидантных свойств в сложной эндогенной системе антирадикальной защиты клетки. Этот факт был зарегистрирован при многочисленных болезненных состояниях организма – отравлениях различного происхождения [5-9], токсикозах анестетического действия [3], сахарном диабете [2].

Материал и методы

Исследования были проведены на 30 беспородных белых крысах-самцах массой 180-200 г, содержащихся в обычных условиях вивария. Одноразовое

введение коразола производили внутривенно из расчета 8-9 мг на 100 г массы животного. ТСН вводили из расчета 1 мг, а α -ТФ – 0,4 мг на 200 г массы животного. При формировании коразоловых припадков на фоне предварительного введения ТСН и α -ТФ инъекции коразола производили спустя 15 мин после введения указанных факторов антиоксидантного действия. Судорожное поведение наблюдали в течение 20 мин после инъекции коразола. Стадии судорог определяли по модифицированной шкале Racine R.J. [13].

Животных декапитировали после полного проявления припадка под легким эфирным наркозом. Изолирование печени, освобождение от капсулы, кровеносных сосудов и приготовление печеночного гомогената производили на холоде. Ткань гомогенизировали в охлажденном растворе 0,25 М сахарозы – 0,02 М трис-НСl буфера (рН-7,4). Ядерную фракцию печени выделяли центрифугированием при 800 g в течение 10 мин. Митохондриальную фракцию выделяли при 9000g в течение 15 мин. Мембранные структуры митохондрий получали 3-кратным замораживанием и оттаиванием фракции с последующим центрифугированием при 105 000g. Инкубационная смесь (2 мл) для определения АТФ-фосфогидролазной активности содержала: 1,6 мл 0,25 М сахарозы, 0,02 М трис-НСl буфера, 0,2 мл мембраны митохондрий (соответствующей 2-3 мг белка), 4 мг АТФ (Sigma corp.), растворенного в 0,2 мл сахарозы, и 0,5 mM Mg^{2+} ($MgCl_2$), Ca^{2+} ($CaCl_2$) или HCO_3^- ($NaHCO_3$) в конечной концентрации [4]. Время инкубации смеси – 30 мин при температуре 37°C. Об активности АТФазы судили по нарастанию в среде содержания неорганического фосфата. Неорганический фосфат определяли по Lowry et al. [11] в модификации Скулачева [10] и пересчитывали на 1 мг белка. Определение белка проводили по Lowry et al. [12]. Полученные данные обработаны статистически. Достоверность различий между средними величинами определяли по t-критерию Стьюдента [1].

Результаты и обсуждение

Результаты экспериментов, приведенные в табл. 1, показывают, что в мембранах митохондрий печеночной ткани при ЭФП общая (без добавления активаторов) АТФазная активность не меняется по сравнению с интактными крысами. При этом активность Mg^{2+} -зависимой АТФазы достоверно увеличивается. При введении животным α -ТФ активность фермента также увеличивается в отмеченных двух вариантах, однако у крыс, получивших одновременно коразол + α -ТФ, уровень активности приближается к контрольным цифрам.

Таблица 1

Изменение активности Mg^{2+} -АТФазы и регулирующей эффект α -ТФ в мембранах митохондрий печени при ЭФП у крыс

Условия опыта	Без добавления активаторов	Mg^{2+}
Контроль	3,28±0,03	8,41±0,07
Коразол	3,39±0,01	11,93±0,14 p<0,005
α -ТФ	5,61±0,06 p<0,001	14,50±0,09 p<0,001
Коразол+ α -ТФ	3,56±0,02 p<0,005	8,83±0,04 p<0,001

Аналогичная картина сдвигов активности фермента получена также в отношении Ca^{2+} - и HCO_3^- -зависимых АТФаз (табл. 2).

Интересные результаты получены в отношении влияния ТСН при ЭФП крыс (табл. 3). При введении только ТСН активность общей и Mg^{2+} -АТФазы достоверно подавляется по сравнению с контролем. Однако при совместном действии коразола+ТСН активность фермента нормализуется, доходя до уровня контрольных величин. Аналогичная картина наблюдается также в отношении Ca^{2+} - и HCO_3^- -зависимых АТФаз, с той разницей, что в варианте коразол+ТСН уровень активности этих ферментов достигает уровня контроля и не меняется по сравнению с одним ТСН (табл. 4).

Таким образом, как показывают полученные данные, при ЭФП крыс наблюдаются глубокие перестройки активностей различных АТФаз в мембранных структурах печеночной ткани. Эти результаты свидетельствуют о важном мобилизирующем влиянии α -ТФ и его синергиста ТСН на соответствующие системы эндогенной антирадикальной защиты клетки. Они предотвращают и нивелируют метаболические рас-

Сдвиги активности Ca^{2+} - и HCO_3^- -зависимых АТФаз и корректирующее действие α -ТФ в мембранах митохондрий печени при ЭФП у крыс (ΔP в мкатомах/мг белка/30 мин), $M \pm m$, n=7

Условия опыта	Ca^{2+}	HCO_3^-
Контроль	8,13±0,06	5,83±0,14
Коразол	10,26±0,12 p<0,001	6,23±0,04 p<0,400
α -ТФ	11,79±0,11 p<0,001	9,55±0,06 p<0,001
Коразол+ α -ТФ	7,35±0,07 p<0,001	5,75±0,30 p<0,500

Таблица 3

Изменение Mg^{2+} -АТФазной активности и регулирующей эффект ТСН в мембранах митохондрий печени при ЭФП у крыс (ΔP в мкатомах/мг белка/30 мин), $M \pm m$, n=7

Условия опыта	Без активаторов	Mg^{2+}
Контроль	3,28±0,03	8,41±0,07
Коразол	3,39±0,01	11,93±0,14 p<0,005
ТСН	2,13±0,46 p<0,005	4,16±0,08 p<0,001
Коразол+ТСН	4,14±0,01 p<0,005	7,50±0,13 p<0,005

Таблица 4

Сдвиги активности Ca^{2+} - и HCO_3^- -зависимых АТФаз и корректирующий эффект ТСН в мембранах митохондрий печени при ЭФП у крыс (ΔP в мкатомах/мг белка/30 мин), $M \pm m$, n=7

Условия опыта	Ca^{2+}	HCO_3^-
Контроль	8,13±0,06	5,83±0,14
Коразол	10,26±0,12 p<0,001	6,23±0,04 p<0,400
ТСН	3,87±0,03 p<0,001	4,04±0,03 p<0,005
Коразол+ТСН	3,84±0,08	3,87±0,02 p<0,001

стройства макроэргов и их ферментативное расщепление, вызванное действием коразола на интактных животных, поддерживая нормальный физиологический статус функционирования реакций мета-

болизма в мембранных структурах печеночной ткани белых крыс с моделированным коразолом эпилептиформным припадком.

Поступила 14.12.05

ԱՏՖազային ակտիվությունը առնետների լյարդի միտոքոնդրիումների թաղանթներում կորագոլով մակածված էպիլեպսիան հանգստացնող գործոնների կարգավորիչ ազդեցությունը

Ա.Ա.Սիմոնյան, Լ.Ա.Սիմոնյան, Ի.Ն. Բատիկյան

Կորագոլով մակածված էպիլեպսիան հանգստացնող գործոնների թաղանթներում սպիտակ առնետների լյարդի միտոքոնդրիումների թաղանթներում դիտվում է տարբեր ԱՏՖազների ակտիվության խորը փոփոխություններ, որտեղ տոկոֆերոլը և դրա սինթեզիստ՝ նատրիումի թիոսուլֆատը դրսևորում են կարևոր

մոբիլիզացնող ազդեցություն բջջի էներգետիկ հակաօքսիդանտային պաշտպանության համակարգի վրա, դրանով իսկ կանխելով և կարգավորելով մակրոէներգիայի նյութափոխանակության խանգարումները և դրանց ֆերմենտային ճեղքումը, որը առաջ է գալիս կորագոլի ներգործությամբ՝ պահպանելով բջջի նորմալ ֆիզիոլոգիական ստատուսը:

ATPase activity in the rats liver mitochondrial membranes at corazol induced epileptiform fits and correcting action of the antioxidative agents

A.A. Simonyan, L. A. Simonyan, I. H. Batikyan

At corazol induced epileptiform fits in white rats liver mitochondrial membranes different ATPase activity shifts were investigated. Under this condition α -tocopherol and its synergist – sodium thiosulfate were shown to produce a

mobilizing action on the cellular antioxidative system. This action prevents corazol induced high-energy bonds metabolic breakdown and enzymatic conversion, as well as maintains the physiological balance of the cell..

Լիտերատուրա

1. Бессмертный Б.С. Математическая статистика в клинической, профилактической и экспериментальной медицине. М., 1967.
2. Геворкян Д.М. Липидный обмен при диабете и коррекция его антиоксидантами. Автореф. дис. докт. биол. наук, Ереван, 1989, 45 с.
3. Данилова Р.А. Действие галотановой анестезии на мембранные структуры мозговой ткани и эритроцитов и методы его коррекции. Автореф. дис. канд. мед. наук. Ереван, 2000, 20 с.
4. Иващенко А.Т. Вестн. АН Каз. ССР, 1977, 8, с. 73–75.
5. Карагезян М.К., Бояджян А.С., Осипян Л.Л., Карагезян К.Г. Тез. докл. V съезда Армянского физиологического общества. Ереван, 1994, с.44.
6. Карагезян М.К., Бояджян А.С., Осипян Л.Л., Карагезян К.Г. Докл. РАН, 1995, т. 341, 1, с. 113–114.
7. Карагезян М.К., Овсепян Л.М., Овакимян С.С., Бояджян А.С., Осипян Л.Л., Карагезян К.Г. Докл. РАН, 1995, т. 341, 2, с. 259–262.
8. Карагезян М.К., Овакимян С.С., Овсепян Л.М., Бояджян А.С., Осипян Л.Л., Карагезян К.Г. Докл. РАН, 1995, т. 341, 3, с. 408–411.
9. Карагезян М.К. Изучение молекулярных механизмов токсических эффектов микотоксина зеараленона. Дис. канд. биол. наук, Ереван, 1997, 120 с.
10. Скулачев В. П. Энергетика биологических мембран, М., 1989, 564с.
11. Lowry O.H., Lopez J.A. Biol. Chem., 1946, 162, p. 421.
12. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Biol. Chem., 1951, 193, p. 265–275.
13. Racine R.J. Electroencephal. Clin. Neurophysiol., 1972, 32, p. 281–285.