

УДК 577.15.04+577.151.04

**Изменение активности Ca^{2+} -АТФазы в митохондриях
тканей белых крыс под влиянием производного
пластохинона (SkQ1)
при коразолиндуцированных эпилептиформных
припадках**

**А.А. Симонян¹, Р.А. Симонян², А.С. Маргарян¹,
Л.А. Симонян³**

¹Институт биохимии им. Г.Х. Бунятыана НАН РА

²Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, РФ

³Государственный социально-гуманитарный университет, РФ
0014, Ереван, ул. П. Севака, 5/1

Ключевые слова: SkQ1, Ca^{2+} -АТФаза, эпилепсия

В Институте физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова академиком В.П. Скулачевым осуществлен синтез катионных производных пластохинона (SkQ), содержащих положительно заряженные остатки ацилтрифенилфосфония, или родамина, которые соединены с пластохиноном посредством деканового или пентанового линкера. Показано, что различные формы SkQ легко проникают через плоскую бислойную фосфолипидную мембрану, мембраны митохондрий и внешнюю клеточную мембрану, электрофоретически накапливаются в изолированных митохондриях и в митохондриях живых клеток [9,11,16]. В низких (наномолярных) концентрациях проявляют высокую антиоксидантную активность в водных растворах, липидных мицеллах, в изолированных митохондриях, предотвращают окисление митохондриального кардиолипина под действием радикала $\text{OH}^\bullet$, увеличивают выживаемость клеток, гиперчувствительных к активным формам кислорода (АФК) [10,14]. АФК представляют серьезную опасность для клеток и целого организма. Многими авторами было показано, что они образуются в гидрофобной области внутренней мембраны митохондрий и инициируют цепные реакции перекисного окисления липидов, являясь серьезной угрозой для живых систем. Более того, митохондриальные АФК способны также вызывать окислительное повреждение митохондриальной ДНК, локализованной вблизи внутренней мембраны [1]. Одновременно было показано, что при увеличении концентрации SkQ проявляются его прооксидантные свойства [10].

В представленной работе мы поставили цель исследовать возможное участие SkQ1 в коррекции отклонения каталитической активности Ca^{2+} -АТФазы в митохондриях различных органов белых крыс при коразол-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 [3-5] было показано, что при эпилептиформных припадках, индуцированных коразолом, 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.

В опытах *in vivo*, результаты которых приведены в данной работе, мы исследовали влияние антиоксидантного фактора SkQ1 на сдвиги активности Ca^{2+} -АТФазы в митохондриях, выделенных из различных органов белых крыс при коразолиндуцированных 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 ($3 \cdot 10^{-3}\text{M}$). Главную роль в этом процессе играет кальциевый насос – Ca^{2+} -АТФаза. Последний включает в себя не один фермент, а группу кальциевых АТФаз, различающихся по строению, локализации в клетке и способу регуляции. Все эти ферменты переносят ионы кальция из цитоплазмы во внеклеточную жидкость или внутриклеточные депо кальция–пузырьков эндоплазматического ретикулума за счет энергии гидролиза АТФ, обеспечивая тем самым низкую концентрацию ионов кальция в цитоплазме. Попадая 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.

Материал и методы

В экспериментах использовали беспородных крыс-самцов массой 180-200 г, содержащихся в условиях вивария при естественном освещении и свободном доступе к воде и пище. Эпилептиформные припадки вызвали одноразовым введением коразола внутримышечно из расчета 8 мг

на 100 г массы животного. Подопытные животные были разделены на следующие группы:

I (контрольная) – животным вводили 1 мл физраствора;

II – животным в течение 2 дней вводили SkQ1 в расчете 37 нм SkQ1 в 1 мл воды один раз в день;

III – животным вводили коразол 8 мг на 100 г массы животного в 1 мл воды;

IV – животным вводили SkQ1 + коразол.

Судорожное поведение наблюдали в течение 20 минут после инъекции коразола. Стадии судорог определяли по модифицированной шкале Racine R.J. [15].

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 различных тканей выделяли центрифугированием при 600-800 g, 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 активности Ca^{2+} -АТФазы содержала: 0.7 мл 0.25 М сахарозы – 0.02 М трис-HCl буфера, 0.1 мл митохондрий (соответствуют 2-3 мг белка), 0.1 мл (2 мМ) АТФ (производства “Sigma” chem. corp.), растворенного в буфере, и 0.1 мл 1 мМ Ca^{2+} (CaCl_2) в конечной концентрации [3, 6, 8]. 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. [12] в модификации Скулачева [8] и пересчитывали на мг белка [13]. 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+} -АТФазы в intactных митохондриях мозга крыс при коразолиндуцированных эпилептиформных припадках под воздействием SkQ1.

Приведенные результаты показывают, что при внутримышечном введении крысам SkQ1 АТФазная активность в митохондриях мозга повышается. При инъекции же коразола каталитическая активность

фермента, наоборот, угнетается по сравнению с SkQ1. Такая же картина наблюдается и при совместном введении коразола и SkQ1.

Таблица 1

*Влияние SkQ1 на активность Ca^{2+} -АТФазы в митохондриях
мозга белых крыс при коразолиндуцированных эпилептиформных судорогах
(ΔP в мкатомах / мг белка / 30 мин) $M \pm S.M.E.$, $n=9$*

Митохондрии мозга	Контроль	SkQ1	Коразол	Коразол + SkQ1
	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

В тех же условиях опыта в печеночных митохондриях наблюдается иная картина активности Ca^{2+} -зависимой АТФазы (табл. 2). При внутримышечном введении SkQ1 заметных изменений активности фермента по сравнению с контролем не происходит. Однако при совместном введении коразола и SkQ1 стимулируется активность фермента. Под влиянием коразола активность Ca^{2+} -АТФазы также достоверно повышается по сравнению с контролем.

Таблица 2

*Влияние SkQ1 на активность Ca^{2+} -АТФазы в митохондриях
печени белых крыс при коразолиндуцированных эпилептиформных судорогах
(ΔP в мкатомах / мг белка / 30 мин) $M \pm S.M.E.$, $n=9$*

Митохондрии печени	Контроль	SkQ1	Коразол	Коразол + SkQ1
	1.90 ± 0.01	1.82 ± 0.02 $p < 0.010$	2.71 ± 0.04 $p < 0.001$	3.15 ± 0.08 $p < 0.001$

Данные активности Ca^{2+} -АТФазы в митохондриях селезенки приведены в табл. 3. SkQ1 приводит к достоверному (на 165.4%) повышению активности АТФазы по сравнению с митохондриями той же ткани intactных животных. При введении животным только коразола, как и при совместном введении коразола 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 коразолиндуцированных эпилептиформных судорогах
(ΔP в мкатомах / мг белка / 30 мин) $M \pm S.M.E.$, $n=9$*

Митохондрии селезенки	Контроль	SkQ1	Коразол	Коразол + SkQ1
	1.69 ± 0.05	4.49 ± 0.13 $p < 0.001$	3.41 ± 0.12 $p < 0.001$	3.71 ± 0.07 $p < 0.001$

Результаты исследования активности фермента в изолированных митохондриях сердца приведены в табл. 4. Данные показывают, что изолированные митохондрии миокарда наделены более высокой каталитической активностью Ca^{2+} -АТФазы по сравнению с аналогичными органоидами других органов. В митохондриях миокарда под влиянием введенного крысам SkQ1 активность фермента несколько подавляется. Однако при введении животным коразола, наоборот, активность фермента заметно стимулируется. Аналогичные результаты активности АТФазы получены также при совместной инъекции коразола и SkQ1.

Таблица 4

Влияние SkQ1 на активность Ca^{2+} -АТФазы в митохондриях сердечной ткани белых крыс при коразолиндуцированных эпилептиформных судорогах (ΔP в мкатомах / мг белка / 30 мин) $M \pm S.M.E.$, $n=9$

Митохондрии сердца	Контроль	SkQ1	Коразол	Коразол + SkQ1
	7.19 ± 0.001	6.29 ± 0.37 $p < 0.025$	11.36 ± 0.33 $P < 0.001$	10.34 ± 0.22 $p < 0.001$

Обобщая вышеприведенные результаты экспериментов, можно заключить, что экзогенно введенный SkQ1, в отличие от Mg^{2+} -АТФазы [7], не нивелирует отклонения в активности Ca^{2+} -АТФазы в изолированных митохондриях различных тканей белых крыс с моделированными эпилептиформными припадками.

Поступила 17.05.16

Ca²⁺-ԱԵՖազայի ակտիվության տեղաշարժերը սպիտակ առնետների հյուսվածքների միտոքոնդրիումներում պլաստոքինոնի ածանցյալի (SkQ1) ազդեցությամբ կորագույն մակաձված էպիլեպսանման նոպաների դեպքում

**Ա.Ա. Միմոնյան, Ռ.Ա. Միմոնյան, Ա.Ս. Մարգարյան,
Լ.Ա. Միմոնյան**

Սպիտակ առնետների փորձարարական էպիլեպսանման ցնցումների դեպքում, ի տարբերություն Mg^{2+} -կախյալ ԱԵՖազայի, SkQ1 հակաօքսիդանտի էկզոգեն ներարկման դեպքում տարբեր հյուսվածքներից անջատված միտոքոնդրիումներում Ca^{2+} -կախյալ ԱԵՖազայի ակտիվության շեղումների նկատելի համահարթեցում չի դրսևավորվում:

Changes in the activity of Ca^{2+} -ATPase in mitochondria of white rats tissues under the influence of derivative of plastoquinone (SkQ1) at korazol-induced epileptiform seizures

A.A. Simonyan, R.A. Simonyan, A.S. Margaryan,
L.A. Simonyan

At experimental epileptiform convulsions in white rats, as opposed to Mg^{2+} -dependent ATPase, in mitochondria isolated from various tissues, SkQ1 antioxidant exogenous injection did not display correlation effects on changes of Ca^{2+} -dependent ATPase activity.

Литература

1. Антоненко Ю.Н., Аветисян А.В., Бакеева Л.Е., Северина И.И., Симонян Р.А., Скулачев В.П. и др. Производное 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, 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. СПб., 2005, т. 10, 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 Армении НАН РА, 2005, т. XLV, 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. Нейрохимия, 2002, т. 19, 2, с.143-145.
7. Симонян А.А., Симонян Р.А., Маргарян А.С., Симонян Л.А. и др. Регулирующий эффект SkQ1 в активности АТФазы в митохондриях органов белых крыс при пентилентетразол-индуцированных эпилептиформных судорогах. Сборник научных статей ГГУ, 2014, т. 1, с. 44-53.
8. Скулачев В.П. Энергетика биологических мембран. М., 1989.
9. 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, vol. 216, p. 1-12.
10. 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, vol. 28, p. 21295-21312.
11. 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, vol. 222, p. 1076-1078.

-
12. *Lowry O.H., Lopez J.A.* Determination of inorganic phosphate in the presence of labelling ester. *J. Biol. Chem.*, 1946, vol. 162, p. 421.
 13. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.* Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, vol. 193, p. 265-275.
 14. *Murphy M.P.S., Smith R.A.* Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2007, vol. 47, p. 629-656.
 15. *Racine R.J.* Modification of seizure activity by electrical stimulation. II Motor seizures. *Electroencephal. Clin. Neurophysiol.*, 1972, vol. 32, p. 281-294.
 16. *Severin S.E., Skulachev V.P., Yaguzinsky L.A.* A possible role of carnitine in transport of fatty acids through the mitochondrial membrane. *Biokhimiya*, 1970, vol. 35, p. 1250-1257.