

ным 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 [2 - 4] было показано, что при эпилептиформных припадках, индуцированных коразолом, статистически достоверно стимулируется функциональная активность АТФазы в митохондриях разных органов у белых крыс.

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

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 однократным введением ПТЗ внутривентрикулярно из расчета 8 мг на 100 г веса животного. Подопытные животные были разделены по следующим группам: I - контрольная группа, животным вводили 1 мл физраствора; II группе в течение 2 дней вводили SkQ1 из расчета 37 нмоль вещества в 1 мл воды ежедневно один раз; III группе животных вводили ПТЗ из расчета 8 мг на 100 г веса животного в 1 мл воды; IV группе вводили SkQ1 + ПТЗ. Судорожное поведение наблюдали в течение 20 мин после инъекции ПТЗ. Стадии судорог определяли по модифицированной шкале Р. Рацина [5]:

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-НСI буфера (рН 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, митохондрию мозга – при 18000 g, сердца и селезенки – 12000 g, печени - 9000 g в

течение 15 мин. Осадок митохондрий суспендировали в среде выделения и центрифугировали повторно.

Инкубационная смесь (1 мл) для определения АТФ-фосфогидролазной 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 2 мМ АТФ (производства Sigma chem. corp., США), растворенного в сахароза-трис-НСl буфере и 0.1 мл 1 мМ Mg^{2+} ($MgCl_2$) в конечной концентрации [2, 3, 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. [7] в модификации Скулачева [6] и пересчитывали на мг белка [8]. Полученные данные обработаны статистически. Достоверность различий между средними величинами определяли по t-критерию Стьюдента [9].

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

Изменение 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 37 нм SkQ1 АТФазная активность в митохондриях мозга достоверно повышается. При инъекции ПТЗ каталитическая активность фермента еще больше увеличивается, достигая 38.8 % по сравнению с контролем. Однако при совместном введении ПТЗ и SkQ1 активность фермента достоверно уменьшается по сравнению с введением только ПТЗ.

Интересные результаты получены относительно влияния SkQ1 на активность АТФазы в митохондриях сердца белых крыс при эпилептиформных судорогах (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 совместное введение ПТЗ и SkQ1 заметно подавляет активность фермента почти до уровня контрольных цифр.

Таблица 2

Изменение 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 \pm 0.32	23.09 \pm 0.23 p<0.001	18.77 \pm 0.96 p<0.001	11.85 \pm 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 \pm 0.02	5.60 \pm 0.002 p<0.001	4.09 \pm 0.05 p<0.001	6.69 \pm 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 63.5% 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

Изменение 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 ПТЗ-индуцированными эпилептиформными припадками при заметном снижении в ней уровня активности каталазы [3, 4].

Обобщая полученные результаты, 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, по литературным данным [10, 11], способствуют ингибированию АТФ-фосфогидролазной реакции. Однако благодаря подключению соответствующих адаптационных механизмов в создавшихся для организма необычных условиях существования происходит стимулирование синтеза АТФазы как необходимого фактора для поддержания оптимального уровня энергетического баланса при изучаемой патологии.

Эндогенно введенный SkQ1 также стимулирует каталитическую активность фермента и одновременно нивелирует сдвиги в активности АТФазы в митохондриях миокарда, вызванные ПТЗ.

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

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

А. А. Симонян, Р. А. Симонян, А. С. Маргарян

Изменение активности АТФ-фосфогидролазы в митохондриях органов белых крыс под влиянием фактора антиоксидантного действия SkQ1 при эпилептиформных припадках, индуцированных пентилентетразолом

Показано, что при эпилептиформных припадках, индуцированных пентилентетразолом, внутримышечное введение нмолей SkQ1 достоверно стимулирует ак-

тивность Mg^{2+} -АТФазы в митохондриях мозга, сердечной мышцы, селезенки и печени, одновременно нивелируя сдвиги в активности фермента в митохондриях миокарда, вызванные пентилентетразолом.

Ա. Ա. Միմոնյան, Ռ. Ա. Միմոնյան, Ա. Ս. Մարգարյան

ԱԵՖ-ֆոսֆոհիդրոլազի ակտիվության փոփոխությունները սպիտակ առնետների տարբեր օրգանների միտոքոնդրիումներում SkQ1 հակաօքսիդանտի ներգործությամբ, պենտիլենտետրազոլով մակաձված էպիլեպսանան գնցումների դեպքում

Ցույց է տրվել, որ սպիտակ առնետների պենտիլենտետրազոլով մակաձված էպիլեպսանան գնցումների դեպքում նախնական քանակներով SkQ1-ի ներմկանային ներարկումը գլխուղեղից, սրտամկանից, փայծաղից և լյարդից անջատված միտոքոնդրիումներում հավաստի խթանում է Mg^{2+} -ԱԵՖազայի ակտիվությունը, իսկ սրտամկանում համահարթեցնում նաև պենտիլենտետրազոլի ներգործությամբ ֆերմենտի ակտիվության մեջ դիտված տեղաշարժերը:

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

Changes in the Activity of ATP-Phosphohydrolase in Mitochondria of Different Organs of White Rats under the Influence of Antioxidant Factor SkQ1 at Pentylentetrazol-Induced Epileptiform Convulsions

It has been shown that during epileptiform convulsions, induced by pentylentetrazol, the nmol SkQ1 intramuscular injection significantly stimulates the activity of Mg^{2+} -ATPase in mitochondria of brain, heart muscle, spleen and liver, and contemporaneously corrected changes of enzyme activity in mitochondria of myocardium caused by pentylentetrazole.

Литература

1. Антоненко Ю. Н., Аветисян А. В., Бакеева Л. Е., Симосян Р. А., Скулачев В. П. и др. - Биохимия. 2008. Т. 73. Вып. 12. С. 1589-1606.
2. Симосян А. А., Бадалян Р. Б., Симосян Л. А., Степанян Р. А., Галоян А. А.- Нейрохимия. 2002. Т. 19. № 2. С.143-145.
3. Симосян Л. А., Симосян А. А., Карагезян К. Г. - Биол.ж. Армении. 2004. Т. 56. N 3-4. С. 226-231.
4. Симосян Л. А., Симосян А. А., Бадалян Р. Б., Маргарян А. С., Симосян Р.А., Карагезян К. Г. - Международная академия наук экологии и безопасности жизнедеятельности. Вестник. СПб. 2005. Т. 10. N 5. С. 174-176.
5. Racine R. J.- Electroencephal. Clin. Neurophysiol. 1972. V. 32. P. 281-294.

6. *Скулачев В.П.* Энергетика биологических мембран. М. Наука. 1989. 564 с.
7. *Lowry O.H., Lopez J.A.* - J. Biol. Chem. 1946. V. 162. P. 421.
8. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R. J.* - J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265-275.
9. *Бессмертный Б.С.* Математическая статистика в клинической, профилактической и экспериментальной медицине. М. 1967.
10. *Das D. K., Neogi A.* - Clin. Physiol. Biochem. 1984. V. 2. P. 32–38.
11. *Jain S. K., Lim G.* - Free Radic. Biol. Med. 2001. V. 30. N 3. P. 232–237.