

ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОГО ПОЛЯ НА ДЫХАНИЕ МИТОХОНДРИИ ПЕЧЕНИ КРЫС

С. Л. МКРТЧЯН, Г. Г. АРЦРУНИ

Исследовались процессы окисления и фосфорилирования в митохондриях печени крысы после воздействия электростатического поля при различных экспозициях. Показано нарушение сопряжения при одночасовой экспозиции и сравнительная адаптация к данному фактору при других, более длительных экспозициях.

Имеющиеся в литературе данные о влиянии электростатического поля (ЭСП) на биообъекты убеждают в его высокой биологической активности. Исследованиями ряда авторов было показано, что после воздействия ЭСП наблюдается снижение уровня адениловых нуклеотидов [1], увеличение снабжения тканей кислородом [2], повышение общего уровня газообмена [3]. Подобные изменения либо должны привести к изменению тканевого дыхания, либо явиться следствием его. Цель данной работы заключалась в выявлении изменений в терминальном окислении после воздействия ЭСП.

Материал и методика. Опыты проводились на белых беспородных крысах-самцах весом 200—250 г. Электростатическое поле напряженностью 2000 в/см создавалось при помощи установки конденсаторного типа, имеющей строго регулируемые электрические параметры [1, 5]. Исследовалось влияние трех экспозиций ЭСП: часовой, суточной, недельной (по 6 час. каждые сутки). Во избежание влияния циркадных ритмов все опыты проводились в одно и то же время суток.

Митохондрии печени крысы извлекались по известной методике [6], модифицированной Мосоловой с сотр. [7]. Животные забивались непосредственно после воздействия ЭСП, через 1, 4, 7 и 14 суток.

Поглощение кислорода в митохондриях определялось полярографически на полярографе I. P-7 (ЧССР) по методике Эстабрука [8] с использованием модифицированной ячейки с мембранными электродами Кларка [9]. Среда инкубации содержала 0,25 М сахарозу, 0,1 М KCl, 0,1 М KH_2PO_4 , 0,5 М $MgSO_4$, 200 мкМ АДФ. В качестве субстрата использовался сукцинат (10 мМ).

Измерялась скорость поглощения кислорода во всех трех метаболических состояниях: V_2 —дыхание «покоя», V_3 —активное дыхание, V_4 —дыхание «отдыха» (в нА О₂/мин/мг белка); Δt —время фосфорилирования (в сек); АДФ/О—отношение эстерифицированного фосфора в мкМ АДФ к утилизированному кислороду (в мкА); дыхательный контроль (ДК) по Чансу—отношение V_2/V_4 .

При одночасовой и суточной экспозициях ЭСП исследовалось два цикла фосфорилирования (с двумя добавками АДФ).

Количество белка в ячейке, определяемое по Лоури, составляло 1,5—1,7 мг.

Результаты и обсуждение. При однократном воздействии ЭСП параметры дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий печени крыс изменялись следующим образом (табл. 1). Непосредственно после воздействия наблюдалось изменение лишь двух показателей — ΔI и АДФ/О. Первый из них увеличивался в обоих циклах фосфорилирования на 48 и 45% соответственно, а второй уменьшался на 32 и 22%. Сопоставляя эти данные с небольшой тенденцией к увеличению скоростей дыхания, можно прийти к выводу, что происходит некоторое снижение эффективности фосфорилирования и митохондрии переходят в рыхло-сопряженное состояние. В следующие сроки исследования никаких достоверных изменений не было отмечено.

Эксперимент с односторонней экспозицией поля выявил несколько иные закономерности (табл. 2). Непосредственно после воздействия ЭСП скорость поглощения кислорода во всех трех метаболических состояниях резко угнеталась: V_2 — на 31, V_3 — на 50, V_4 — на 55%. В дальнейшем эти показатели несколько увеличивались, хотя и оставались на уровне ниже контрольного. На 7-е сутки скорости дыхания резко падали, а к 14-м возвращались к норме. ДК при данной экспозиции несколько увеличивался непосредственно после воздействия поля и нормализовался в последующие сроки эксперимента, за исключением 7-х суток. Продолжительность цикла фосфорилирования увеличивалась непосредственно после воздействия на 42% и на 7-е сутки — на 19%, оставаясь в остальные сроки близкой к норме. Изменение АДФ/О выражалось лишь в небольшом увеличении его в первые часы после воздействия. В табл. 3 представлены результаты, полученные при недельной экспозиции. Так, скорость переноса электронов вновь падала непосредственно после воздействия ЭСП (V_2 — на 23, V_3 — на 25, V_4 — на 13%), причем во втором цикле фосфорилирования эти показатели почти нормализовались. Через сутки происходило углубление этих нарушений в обоих циклах фосфорилирования. На 4-е сутки никаких достоверных изменений не отмечалось, в то время как позднее (7-е сутки) скорости дыхания вновь уменьшались.

Дыхательный контроль при недельной экспозиции поля почти не изменялся. М, как и при предыдущих экспозициях, увеличивалось непосредственно после воздействия ЭСП на 1-е и 7-е сутки и оставалось повышенным даже на 14-е. Причем эти отклонения также были довольно значительными. Эффективность фосфорилирования (АДФ/О) при этом почти не изменялась во все сроки эксперимента.

Суммируя изложенное, можно отметить определенную направленность и полнообразность изменений тканевого дыхания после воздействия ЭСП. Так, наибольшие отклонения от контрольного уровня наблюдаются в основном непосредственно после воздействия и через 1 сутки, затем они повторяются через 7 суток. Возможным объяснением этого может быть определенная адаптация животных к данному фактору. Аналогичная цикличность наблюдалась в экспериментах по выживаемости животных после сочетанного воздействия радиацией и ЭСП [10], а

Таблица 1

Параметры дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий печени крысы в различные сроки после воздействия электростатического поля продолжительностью 1 час

	Контроль	Сроки исследования				
		непосредственно после воздействия	1-е сутки	4-е сутки	7-е сутки	11-е сутки
V_2	$51 \pm 2,2$ $t = 0,46$	$54 \pm 2,7$ $t = 0,46$	$55 \pm 0,9$ $t = 1,66$	$51 \pm 1,7$ $t = 0$	$48 \pm 2,3$ $t = 0,94$	$52 \pm 1,7$ $t = 0,37$
	$63 \pm 3,6$ $t = 0$	$63 \pm 2,9$ $t = 0$	$75 \pm 0,8$ $t = 3,21$	$69 \pm 2,6$ $t = 1,35$	$63 \pm 3,5$ $t = 0$	$63 \pm 4,4$ $t = 0$
V_3	$161 \pm 9,4$ $t = 1,02$	$172 \pm 5,4$ $t = 1,02$	$193 \pm 11,3$ $t = 2,18$	$179 \pm 7,7$ $t = 1,47$	$165 \pm 8,8$ $t = 0,31$	162 ± 13 $t = 0,06$
	$176 \pm 9,4$ $t = 0,04$	$170 \pm 1,1$ $t = 0,04$	207 ± 12 $t = 0,65$	$192 \pm 9,7$ $t = 1,51$	$171 \pm 10,9$ $t = 0,35$	$175 \pm 15,5$ $t = 0,05$
V_4	$63 \pm 3,6$ $t = 1,93$	$74,4 \pm 4,4$ $t = 1,93$	$76 \pm 0,9$ $t = 3,51$	$68 \pm 1,9$ $t = 1,22$	$64 \pm 3,2$ $t = 0,22$	$65 \pm 4,4$ $t = 0,35$
	$68 \pm 4,3$ $t = 0,55$	$66 \pm 3,3$ $t = 0,55$	$78 \pm 4,3$ $t = 1,64$	$67 \pm 3,2$ $t = 0,19$	$65 \pm 3,8$ $t = 0,17$	$68 \pm 4,2$ $t = 0$
ЛК	$2,57 \pm 0,22$ $t = 0,76$	$2,38 \pm 0,12$ $t = 0,76$	$2,55 \pm 0,13$ $t = 0,08$	$2,67 \pm 0,22$ $t = 0,1$	$2,57 \pm 0,11$ $t = 0$	$2,51 \pm 0,09$ $t = 0,25$
	$2,7 \pm 0,21$ $t = 0,55$	$2,56 \pm 0,15$ $t = 0,55$	$2,69 \pm 0,15$ $t = 0,001$	$2,76 \pm 0,12$ $t = 0,25$	$2,7 \pm 0,15$ $t = 0$	$2,55 \pm 0,16$ $t = 0,57$
Δt	$68,4 \pm 4,56$ $t = 3,2$	$101,1 \pm 8,93$ $t = 3,2$	$66,6 \pm 6,19$ $t = 0,23$	$73,7 \pm 3,57$ $t = 0,91$	$76,1 \pm 9,05$ $t = 0,76$	$76,8 \pm 6,53$ $t = 1,05$
	$68,5 \pm 4,95$ $t = 3,0$	$99,3 \pm 8,97$ $t = 3,0$	$63,7 \pm 6,90$ $t = 0,57$	$76,9 \pm 11,88$ $t = 0,64$	$81,2 \pm 5,31$ $t = 1,74$	$74,3 \pm 5,24$ $t = 0,8$
АДФ/О	$1,42 \pm 0,043$ $t = 7,4$	$0,97 \pm 0,043$ $t = 7,4$	$1,28 \pm 0,11$ $t = 1,16$	$1,22 \pm 0,051$ $t = 2,9$	$1,31 \pm 0,04$ $t = 1,92$	$1,29 \pm 0,036$ $t = 2,32$
	$1,27 \pm 0,08$ $t = 3,5$	$0,99 \pm 0,02$ $t = 3,5$	$1,25 \pm 0,11$ $t = 0,15$	$1,09 \pm 0,11$ $t = 1,12$	$1,15 \pm 0,04$ $t = 1,35$	$1,2 \pm 0,044$ $t = 0,78$

V_2 , V_3 , V_4 —скорости потребления кислорода, нл/мин/мг белка ЛК— V_2/V_3 , Δt —время фосфорилирования, сек. Количество животных в каждой серии экспериментов составляло 7—12.

В таблице представлены данные по двумшкалам фосфорилирования.

Таблица 2

Параметры дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий печени крысы в различные сроки после воздействия электростатического поля продолжительностью 1 сутки

	Контроль	Сроки исследования				
		непосредственно после воздействия	1-е сутки	4-е сутки	7-е сутки	14-е сутки
V_1	$26 \pm 2,2$	$18 \pm 1,6$ $t = 2,86$	$21 \pm 5,4$ $t = 0,86$	$22 \pm 2,1$ $t = 1,33$	$17 \pm 1,6$ $t = 6,0$	$22 \pm 1,1$ $t = 1,6$
V_3	125 ± 11	$61 \pm 7,5$ $t = 8,16$	$92 \pm 7,9$ $t = 2,29$	$95 \pm 6,6$ $t = 4,18$	$72 \pm 8,2$ $t = 3,64$	$97 \pm 4,7$ $t = 2,16$
V_4	$56 \pm 6,3$	$25 \pm 1,8$ $t = 6,69$	$38 \pm 5,7$ $t = 2,14$	$38 \pm 2,6$ $t = 2,61$	$36 \pm 6,6$ $t = 2,22$	$46 \pm 3,8$ $t = 1,34$
ДК	$2,19 \pm 0,095$	$2,65 \pm 0,19$ $t = 2,09$	$2,58 \pm 0,12$ $t = 2,41$	$2,79 \pm 0,17$ $t = 3,07$	$2,64 \pm 0,52$ $t = 0,87$	$2,20 \pm 0,14$ $t = 0,58$
ΔI	$134,4 \pm 7,2$	$190,2 \pm 22,8$ $t = 2,31$	$145,2 \pm 13,2$ $t = 2,27$	$124,8 \pm 10,8$ $t = 0,77$	$159,6 \pm 7,8$ $t = 13,2$	$125,4 \pm 7,2$ $t = 0,87$
АДФ/О	$1,53 \pm 0,05$	$1,78 \pm 0,25$ $t = 4,9$	$1,55 \pm 0,05$ $t = 0,33$	$1,61 \pm 0,041$ $t = 1,73$	$1,60 \pm 0,18$ $t = 0,12$	$1,49 \pm 0,089$ $t = 0,35$

В таблице представлены данные по одному циклу фосфорилирования.

Таблица 3

Параметры дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий печени крыс в различные сроки после воздействия электростатического поля продолжительностью 1 неделя

	Контроль	Сроки исследования				
		немедленно после воздействия	1-е сутки	4-е сутки	7-е сутки	14-е сутки
V_2	47±2,2 t=4,07	36±1,5 t=4,07	31±1,9 t=5,52	16±3,5 t=0,24	37,8±4,2 t=2,42	42±2,0 t=1,72
	62±3,2 t=1,77	54±3,2 t=1,77	41±2,7 t=1,46	66±5,5 t=0,62	54±4,6 t=2,0	56±2,2 t=1,58
V_3	150±7,9 t=3,42	113±7,4 t=3,42	119±6,0 t=3,13	116±13,9 t=0,23	121±11,1 t=2,07	126±3,7 t=2,76
	159±9,4 t=3,44	116±8,3 t=3,44	119±6,0 t=3,13	156±17,9 t=0,15	127±15,9 t=2,2	134±4,6 t=2,43
V_4	62±3,2 t=1,77	54±3,2 t=1,77	41±2,7 t=4,46	66±5,5 t=0,62	54±4,6 t=2,0	56±2,2 t=1,58
	61±2,2 t=1,16	56±3,8 t=1,16	45±3,2 t=4,2	65±3,6 t=1,0	50±2,1 t=3,79	55±1,2 t=2,6
ДК	2,36±0,13 t=2,18	2,04±0,06 t=2,18	2,65±0,18 t=1,31	2,21±0,15 t=0,75	2,22±0,11 t=0,81	2,24±0,086 t=0,75
	2,6±0,14 t=2,97	2,02±0,12 t=2,97	2,67±0,19 t=0,3	2,32±0,18 t=1,2	3,23±0,106 t=2,05	2,41±0,08 t=1,15
Δt	80,9±3,6 t=1,96	103±10,73 t=1,96	100,9±5,34 t=3,1	92,6±12,67 t=0,8	116,96±8,45 t=4,0	102,1±5,23 t=3,33
	80,1±3,3 t=2,16	108,3±12,57 t=2,16	102,4±6,41 t=3,09	94,5±12,24 t=1,13	122,2±10,67 t=3,75	99,6±4,79 t=3,75
АДФ/О	1,33±0,042 t=1,0	1,48±0,15 t=1,0	1,35±0,045 t=0,33	1,32±0,08 t=0,11	1,17±0,067 t=2,05	1,24±0,054 t=1,43
	1,23±0,027 t=3,07	1,39±0,04 t=3,07	1,27±0,075 t=0,5	1,19±0,05 t=0,73	1,16±0,044 t=1,37	1,19±0,05 t=0,7

В таблице представлены данные по двум циклам фосфорилирования.

также при исследовании уровня газообмена после воздействия ЭСП [3]. Основываясь на предыдущих работах, показавших увеличение снабжения тканей кислородом после воздействия ЭСП [2], можно предположить, что это является одним из факторов, вызывающих описываемые изменения в цепи переноса электронов и сопряженном с ним синтезе АТФ. Так, снижение скоростей дыхания во всех трех состояниях при суточной и недельной экспозициях и одновременное увеличение времени фосфорилирования, возможно, являются следствием токсического действия повышенных концентраций кислорода. Эти данные согласуются с работой Елисейевой и др. [11], в которой показано аналогичное снижение скоростей дыхания и увеличение Δt при увеличении концентрации кислорода в опытах *in vitro*. В пользу этого предположения говорят также данные об угнетении фосфорилирования при окислении α -кетоглутарата [12], уменьшение восстановления НАД путем обратного транспорта электронов [13], снижение содержания АТФ в тканях животных, находящихся в атмосфере повышенного давления кислорода [14]. Однако, как было показано этими работами и подтверждено нашими исследованиями, при гипероксии наблюдается быстрая нормализация параметров окисления и фосфорилирования. Об этом свидетельствуют также более близкие к контрольным цифрам данные второго цикла фосфорилирования, проводящегося в той же пробе. Косвенным доказательством участия кислорода в процессе повреждения могут служить также полностью противоположные нашим данным результаты исследований тканевого дыхания при гипоксии [15, 16].

Сравнительно небольшие изменения интенсивности окисления при одночасовой экспозиции, вероятно, можно объяснить меньшим временем воздействия ЭСП. Однако снижение коэффициента АДФ/О, увеличение Δt и тенденция к интенсификации дыхания при этом говорят о выраженном нарушении эффективности фосфорилирования, т. е. о разобщении дыхания и накопления энергии. Тот факт, что этого не происходит при других, более длительных экспозициях нам кажется закономерным, так как при этом, возможно, включаются определенные механизмы адаптации, не успевающие сработать при кратковременном воздействии ЭСП.

Конечно, «кислородная» гипотеза действия ЭСП не исключает и другие механизмы влияния последнего на тканевое дыхание. Так, нарушение сопряжения дыхания и фосфорилирования при этом может происходить путем снижения мембранного потенциала митохондрий [17]. Изменение скорости транспорта электронов, возможно, происходит благодаря определенным сдвигам в структуре и функции компонентов дыхательной цепи, обеспечивающих этот перенос. Не исключены изменения в гем-белковой связи цитохромов дыхательных ансамблей аналогично изменению гем-глобиновой связи под действием ЭСП [10].

На данном этапе исследований трудно представить себе конкретные механизмы воздействия ЭСП на тканевое дыхание. Возможно, все они срабатывают одновременно или включается лишь один или некото-

рые из них. Несомненно, однако, что воздействие ЭСД при указанных режимах приводит к определенному угнетению дыхания, а в некоторых случаях и к подавлению окислительного фосфорилирования.

Ереванский государственный медицинский институт,
кафедра биохимии, лаборатория биофизики и
молекулярной биологии ЦИИЛ

Поступило 31V 1978 г.

ԷԼԵԿՏՐՍՏԱՏԻԿ ԳԱՇՏԻ ԱԶԳԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ԼՅԱՐԻԻ ՄԻՓՈՔՈՆՈՐԻՆԱՆԵՐԻ ՇՆՁԱՌՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Ս. Լ. ՄԿՐՏՉՅԱՆ, Գ. Գ. ԱՐՇՐՈՒՆԻ

Հետազոտվել է տարբեր էքսպոզիցիաների պայմաններում էլեկտրաստատիկ դաշտի ազդեցությունը առնետների լյարդի միթոքոնդրիաներում օքսիդացման և ֆոսֆորիլացման պրոցեսների վրա:

Ցույց է արված, որ մեկժամյա էքսպոզիցիայի դեպքում խախտվում է այդ պրոցեսների զուգակցումը: Էքսպոզիցիայի սեռողությունը երկարացնելու դեպքում, շնորհիվ ազապատցիայի, այդ պրոցեսների զուգակցումը համեմատաբար կարգավորվում է:

THE EFFECT OF ELECTROSTATIC FIELD ON THE RESPIRATION IN RAT LIVER MITOCHONDRIONS

S. L. MKRTCHIAN, G. G. ARTSRUNY

The oxidation and phosphorylation processes have been investigated after the influence of electrostatic field at different expositions.

The obtained results show the coherence desintegration at an hour long exposition and the comparative adaptation to the given factor at more prolonged expositions.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Портноз Ф. Г., Непомнящий Л. Н., Нерусалимский И. И. Гигиена труда и биологическое действие электромагнитных волн радиочастот 102, М., 1972.
2. Mose V. R., Fisher G. Arch. Hyg., 154, 6, 549, 1971.
3. Schretznicke A. Zentr. gen. Hyg., 16, 7, 519, 1970.
4. Арцруни Г. Г. Мат-ли конф. мол. уч., посвящ. XXV съезду КПСС, Ереван, 1975.
5. Арцруни Г. Г., Романов І. В., Кутурзов А. Д., Пирюзли Л. А. Изв. АН СССР (сер. биол.), 3, 135, 1973.
6. Hageboom G. H., Schneider W., Pullade G. E. J. Biol. Chem., 172, 619, 1948.
7. Мосолова И. М., Горская И. А., Шолов К. Ф., Котельникова А. В. Методы современной биохимии. 45, М., 1975.
8. Estabrook R. W. Meth In Enzym., 10, 41, 1967.
9. Шолов К. Ф., Островский Д. Н. Методы современной биохимии. 52, М., 1975.
10. Арцруни Г. Г. Канд. дисс., М., 1973.
11. Елисеева С. В., Котова Е. Н., Кондашова М. Н. Сб.: Митохондрии, структура и функции в норме и патологии. 122, М., 1971.

12. *Barron E. S. O.* Arch. Biochem., 59, 502, 1955.
13. *Chance B., Coles G. A.* Nature, 206, 257, 1965.
14. *Sanders A. R., Holt U. H., Cavanaugh P. V., Woodhall B.* Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med., 121, 32, 1966
15. *Толейкис А. И., Прайквичус А. К.* Сб.: Митохондрии. Структура и функции в норме и патологии. 99, М., 1971.
16. *Хватова Е. М., Шумилова Е. Н., Варыпаева Н. С.* Сб.: Митохондрии. Аккумуляция энергии и регуляция ферментативных процессов 32. М., 1977.
17. *Скулицев В. П.* Трансформация энергии в биомембранах. М., 1972.