

## СВОБОДНОРАДИКАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ ПОСЛЕ ДЕЙСТВИЯ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОГО ПОЛЯ

Г. Г. АРЦРУНИ, С. Л. МКРТЧЯН

Исследовалась интенсивность сигналов ЭПР митохондрий печени крыс после воздействия электростатического поля.

Показано, что воздействие электростатического поля приводит к понижению концентрации свободных радикалов в митохондриях.

В наших предыдущих сообщениях [7, 8] было показано определенное влияние электростатического поля (ЭСП) на процессы энергетического обмена в митохондриях. В частности, было установлено, что ЭСП тормозит скорость переноса электронов по дыхательной цепи митохондрий без существенного нарушения их АТФ-синтезирующей функции. При тех же экспозициях поля (суточной и недельной) активность сукцинатдегидрогеназы и сукцинатцитохром-с-редуктазы также оказывалась ниже контрольного уровня.

Одним из важных показателей, характеризующих функциональное состояние митохондрий, является концентрация в них стабильных свободных радикалов с g-фактором, близким к g-фактору неспаренного электрона, обнаруживаемых методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Работами ряда исследователей [1, 2, 10] было доказано, что уровень свободнорадикальной активности в митохондриях зависит от таких важных процессов, как перенос электронов, изменяющий окислительно-восстановительное состояние переносчиков дыхательной цепи, от активности отдельных ее участков, а также АТФ-синтезирующей системы.

Таким образом, изучение интенсивности сигналов ЭПР в митохондриях после воздействия ЭСП поможет нам полнее представить себе механизмы нарушений энергетического обмена, обнаруженные нами ранее.

*Материал и методика.* Эксперименты проводились на белых беспородных крысах-самцах массой 150—180 г. Животные подвергались воздействию ЭСП, напряженностью 2000 в/см, продолжительностью в один час, сутки и неделю по 6 ч. в день. Электростатическое поле создавалось при помощи установки конденсаторного типа со строго контролируруемыми электрическими параметрами.

Во избежание влияния циркадных ритмов опыты проводились в одно и то же время суток.

Митохондрии печени крыс извлекались по известной методике [9]. Сразу после выделения определенное количество осадка митохондрий помещалось в специальную

форму, которая погружалась в жидкий азот [5]. Получаемая таким образом таблетка служила образцом для измерения на ЭПР-спектрометре типа ЭПР-В X-диапазона с частотой модуляции 100 кГц при температуре паров жидкого азота. Внутренним стандартом служил поликристаллический MgO с микропримесью Mn<sup>2+</sup>. Стандарт помещался в специальный держатель и постоянно находился в резонаторе радиоспектрометра. Сигнал ЭПР исследуемых свободных радикалов записывался между третьей и четвертой линиями сверхтонкой структуры стандарта. Концентрация свободных радикалов в образцах выражалась в относительных единицах, вычисляемых по формуле

$$A = \frac{I_1 \cdot I_3}{I_2 \cdot c}$$

где A—концентрация свободных радикалов в относительных единицах; I<sub>1</sub>—амплитуда сигнала ЭПР образца в мм; I<sub>2</sub>—амплитуда сигнала ЭПР 3-й линии эталона в мм; I<sub>3</sub>—амплитуда сигнала ЭПР 4-й линии эталона в мм; c—количество белка в каждом образце в мг, определяемое по Лоури.

Полученные результаты обрабатывались статистически с применением критерия достоверности Фишера-Стьюдента.

*Результаты и обсуждение.* Замороженные суспензии митохондрий печени интактных крыс дают сигнал ЭПР, представленный на рисунке. Этот сигнал имеет g-фактор = 2,005 ± 0,004, расстояние между точками наклона равно 12,38 ± 3,0 э. Амплитуда сигналов устойчива и не изменялась даже после хранения образцов в жидком азоте в течение нескольких суток.

Величины сигналов ЭПР митохондрий после воздействия ЭСП приведены в таблице. Прежде всего надо отметить, что при всех исследуемых

Таблица

Амплитуда сигналов ЭПР замороженных митохондрий после воздействия ЭСП (в относительных единицах)

Контроль	Часовое воздействие	Суточное воздействие	6—суточное воздействие
8,80	10,56	7,29	5,50
11,21	6,59	4,81	11,45
13,74	7,78	5,85	8,45
13,69	5,73	4,80	8,68
7,61	7,84	8,70	11,90
10,62	13,83	4,42	7,66
10,66	19,95	4,68	6,61
12,65	5,63	4,01	6,07
14,75	11,91	3,13	9,84
13,54	9,24	9,79	5,67
22,70	13,26	4,99	11,20
14,9		8,10	
7,34			
13,71			
7,85			
n	15	12	11
M <sub>ср</sub>	12,26	10,21	8,46
σ	3,94	4,32	2,40
m	1,02	1,30	0,72
t	—	1,34	3,04

мых экспозициях ЭСП выявлена качественно однородная реакция со стороны уровня свободнорадикальных центров митохондрий—снижение их количества. Однако это снижение имело свои особенности при раз-

личных экспозициях. Так, если после часовой экспозиции ЭСП уменьшение амплитуды сигнала было статистически недостоверным, то суточная экспозиция поля уменьшила величину сигнала почти в два раза. Аналогичные изменения наблюдались после недельной экспозиции, хотя и в меньших масштабах, чем после суточной.

Полученные данные свидетельствуют о том, что наибольшие изменения сигнал ЭПР претерпевает после суточной экспозиции поля. Эти данные хорошо коррелируют с результатами наших предыдущих исследований [7, 8], когда максимальные изменения энергетического аппарата митохондрий также наблюдались после суточного воздействия ЭСП. Это еще раз подтверждает наличие тесной взаимосвязи между продолжительностью действия ЭСП и функциональным состоянием митохондрий. Несколько меньший эффект длительного воздействия ЭСП, очевидно, можно объяснить включением определенных адаптационных механизмов, не успевающих сработать при более кратковременных воздействиях.



Рис. Сигнал ЭПР митохондрий печени крыс

Согласно современным представлениям о природе стабильных свободных радикалов в митохондриях с  $g$ -фактором 2,004, их подразделяют на два типа: возникающие в результате транспорта электронов по дыхательной цепи и образующиеся в ходе АТФ-синтетазной реакции [6]. В первом случае это скорее всего семихиноны флавиновых коэнзимов и коэнзима  $Q_{10}$ , т. е. переносчиков, локализующихся на начальных участках электронтранспортной цепи. И понятно, что блокировка этих участков (особенно сукцинатдегидрогеназы) ведет к уменьшению концентрации свободных радикалов вследствие быстрого окисления

семихинонов [1]. Опираясь на наши данные о снижении активности комплекса II—III дыхательной цепи, что, очевидно, является причиной вялости процесса дыхания в митохондриях после воздействия ЭСП [7, 8], можно предположить, что в данном случае происходит именно ингибирование начальных звеньев электронтранспортной цепи, ведущее к уменьшению количества свободных радикалов. Этот эффект может иметь место вследствие возможных структурных перестроек в мембране под действием ЭСП [3], влекущих за собой изменение окислительно-восстановительных потенциалов дыхательных переносчиков, а следовательно, и нарушение равновесной концентрации их семихинонных форм.

Как указывалось, вторым, не менее важным, источником свободных радикалов в митохондриях являются процессы синтеза АТФ. Не исключено, что замедление этих процессов после действия ЭСП играет определенную роль в снижении свободнорадикальной активности митохондрий, тем более что ЭСП является отрицательным модулятором не только свободного окисления, но и активного дыхания [7]. Однако вклад этого процесса в механизм вышеописанных изменений сигнала ЭПР представляется нам незначительным, вследствие того, что настоящие исследования велись в первом метаболическом состоянии по Чансу, т. е. в отсутствие экзогенных субстратов и акцепторов фосфата. А так как интактные митохондрии печени крыс все-таки богаты эндогенными субстратами, то наблюдаемый сигнал ЭПР скорее относится к электропереносящей системе (а не АТФ-синтезирующей), в которой, очевидно, и происходят наибольшие изменения при воздействии ЭСП.

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

Поступило 13.VI 1979 г.

ՄԻՏՈՔՈՆՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ԱԶՍՏ ՌԱԴԻԿԱԼԱՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ  
ԷԼԵԿՏՐՍՏԱՏԻԿ ԴԱՇՏԻ ԱԶԴԵՅՈՒԹՅՈՒՆԻՑ ՀԵՏՈ

Գ. Գ. ԱՐՏՐՈՆՅԻ, Ս. Լ. ՄԿՐՏՉՅԱՆ

Հետազոտվել է առնետներէ լյարդի միտոքոնդրիաների էՊՐ ազդանշանի ինտենսիվությունը էլեկտրաստատիկ դաշտի ազդեցությունից հետո: Ցույց է տրված, որ էլեկտրաստատիկ դաշտի ազդեցությունը հանգեցնում է ազատ ռադիկալների կոնցենտրացիայի իջեցմանը միտոքոնդրիաներում:

FREERADICAL ACTIVITY OF MITOCHONDRION AFTER  
THE ELECTROSTATIC FIELD EFFECT

G. G. ARTSRUNY, S. I. MKRTCHIAN

The intensity of electronic paramagnetic resonance signal of rat liver mitochondrion after the effect of electrostatic field has been studied. It has been shown that the effect of electrostatic field leads to the decrease of free radical concentration in mitochondrion.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бржевская О. Н., Каюшин Л. П., Кондрашова М. Н., Неделина О. С., Шекшеев Э. М. Биофизика, 11, 6, 1076, 1966.
2. Бржевская О. Н., Неделина О. С., Шекшеев Э. М., Маринов Б. С., Кондрашова М. Н., Каюшин Л. П. Биофизика, 12, 839, 1967.
3. Гольдштейн Н. И. В кн.: Проблемы клинической биофизики. 10, Рига, 1977.
4. Калмансон А. Э., Чумаков В. М. В кн.: Механизмы дыхания, фотосинтез и фиксация азота. М., 1967.
5. Коваленко О. А., Анфалова Т. В., Соколов В. С., Чибрикин В. М. Биофизика, 16, 4, 663, 1971.
6. Козлов Ю. Г. Свободные радикалы и их роль в нормальных и патологических процессах. 34, М., 1973.
7. Мкртчян С. Л., Арцруни Г. Г. Биолог. ж. Армении, 31, 7, 750, 1978.
8. Мкртчян С. Л. Биолог. ж. Армении, 32, 2, 1979.
9. Мосолова И. М., Горская И. А., Шольц К. Ф., Котельникова А. В. Методы современной биохимии, 45, М., 1975.
10. Commoner B., Townsend J., Pake A. Nature, 174, 689, 1954.