

Член-кореспондент НААН України С. Д. Мельничук, С. В. Хижняк,
О. А. Нардід, Я. О. Черкашина, В. С. Морозова, С. В. Репіна,
В. М. Войціцький

Застосування методу електронного парамагнітного резонансу для оцінки функціональної активності дихального ланцюга мітохондрій гепатоцитів щурів за умов штучного гіпобіозу

(Представлено членом-кореспондентом НААН України Є. О. Гордієнком)

Досліджено активність окисно-відновлювальних реакцій дихального ланцюга мітохондрій гепатоцитів щурів методом електронного парамагнітного резонансу спінового зонда (ТЕМПОН). Встановлено, що за величиною константи швидкості відновлення спінового зонда температурна залежність функціонування дихального ланцюга мітохондрій за умов штучного гіпобіозу подібна контролю. Зменшення константи швидкості при виході зі стану гіпобіозу вказує на зниження активності окисно-відновлювальних реакцій дихального ланцюга, можливо, в результаті структурних модифікацій внутрішньої мембрани мітохондрій гепатоцитів за цих умов.

Метод електронного парамагнітного резонансу (ЕПР) спінового зонда широко використовується для оцінки життєдіяльності та функціональної активності біологічних систем за різних умов впливу, у тому числі температури, рН, іонної сили, іонізуючого випромінювання тощо [1, 2]. Враховуючи той факт, що водорозчинний спіновий зонд ТЕМПОН піддається відновленню в біологічних мембранах і клітинних органелах, доведено можливість його використання для оцінки функціональної активності електрон-транспортного ланцюга мітохондрій [3]. В еукаріотичних клітинах мітохондрії є основним постачальником акумульованої в АТФ енергії, що забезпечує їх внутрішня мембрана, яка містить компоненти електрон-транспортного (дихального) ланцюга. Це є визначальним чинником для виконання клітиною специфічних функцій, у тому числі формування реакції-відповіді на зовнішній вплив [4]. За умов штучного гіпобіозу при одночасній дії гіперкалнії, гіпоксії і гіпотермії у щурів відбувається зниження ректальної температури, зменшення частоти серцевих скорочень і дихальної активності — розвивається гіпометаболічний стан, який супроводжується зниженням енергозабезпечення гомойотермного організму [5, 6].

Ми ставили за мету оцінити в залежності від температури функціональну активність електрон-транспортного ланцюга мітохондрій гепатоцитів щурів за умов штучного гіпобіозу методом ЕПР спінового зонда.

Матеріали і методи. У дослідах використано білих безпородних щурів-самців масою 180–220 г. Експерименти проводилися відповідно до вимог “Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою” (Страсбург, 1985).

© С. Д. Мельничук, С. В. Хижняк, О. А. Нардід, Я. О. Черкашина, В. С. Морозова, С. В. Репіна,
В. М. Войціцький, 2015

Введення щурів у стан штучного гіпобіозу здійснювали за методикою Бахметьєва–Джайя–Анжуса як детально описано в роботах [5, 7]. Тварин (загальна кількість 22 особи) розділили на чотири групи: I — контрольна (інтактні тварини); II — стан штучного гіпобіозу (ГП); III — через 2 год (ГП2), IV — через 24 год (ГП24) після припинення дії чинників штучного гіпобіозу (гіперкапнії, гіпоксії і гіпотермії). Тварин декапітували в стані штучного гіпобіозу (при ректальній температурі 16,5 °С) та у відповідні терміни після виходу з гіпобіозу (при ректальній температурі, як і в контролі, 37,0 °С).

Препарати внутрішньої мембрани мітохондрій (ВММх) гепатоцитів отримували за допомогою диференційного центрифугування згідно з методом [8], а вміст білка визначали згідно з [9].

Метод ЕПР спінового зонда застосовували як описано в роботах [10, 11]. Як іміноксильний радикал використовували зонд ТЕМПОН (2,2,6,6-тетра-метил-4-оксопіперидин-1-оксил) фірми “Aldrich” (США), який добре розчинний у воді та інших полярних розчинниках. Кінцева концентрація зонда в зразках становила $0,8 \cdot 10^{-4}$ М. Спектри ЕПР реєстрували на спектрометрі “Брукер” ER 100D (Німеччина) зі стандартною термоприставкою. Розгортка магнітного поля становила 100 Гс, постійна часу — 0,5 с, час розгорнення — 100 с. У дослідженнях використовували скляні капіляри з внутрішнім діаметром 500 нм і об’ємом 0,1 см³.

Для стандартизації умов експерименту одночасно із сигналом ЕПР зонда реєстрували сигнал стандарту, що являє собою кристал, решітка якого вміщує іони хрому. Як параметр відновлення спінових зондів використовували відносні зміни амплітуди (I) середньопольового компонента спектра ЕПР спінового зонда залежно від часу.

У дослідженнях використовували препарати з однаковою концентрацією білка (однаковою кількістю активних центрів) при надлишку субстрату окиснення, оскільки швидкість відновлення даного спінового зонда залежить від концентрації білка [3]. Враховуючи те, що препарати являють собою суспензії ВММх, для запуску каскаду окисно-відновних реакцій за участю електрон-транспортного ланцюга використовували екзогенний субстрат — сукцинат (у кінцевій концентрації 40 мМ).

Статистичну обробку експериментальних даних проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики. Вірогідність різниці показників оцінювали за t -критерієм Стьюдента.

Результати та їх обговорення. Результати по відновленню спінового зонда в динаміці свідчать про те, що для ВММх гепатоцитів відновлення спінового зонда сповільнюється зі зниженням температури від 37 до 16 °С (рис. 1). Це підтверджується попередніми результатами [1, 12]. Слід відзначити, що для препаратів ВММх гепатоцитів як у контролі, так і в разі гіпобіозу (ГП) та виходу із цього стану (ГП2 та ГП24) спостерігається подібна закономірність.

З урахуванням того, що величина максимальної амплітуди центральної компоненти спектра ЕПР зонда за інших рівних умов пропорційна концентрації зонда, стало можливим обчислити константу швидкості відновлення зонда. Тобто в досліджуваних препаратах константа швидкості відновлення зонда обчислена за тангенсом кута нахилу відповідних логарифмічних анаморфоз в координатах ($\lg I$, t), де I — відносні зміни амплітуди середньопольового компонента спектра ЕПР зонда (від. од.), t — час (хв).

Величини констант швидкості відновлення спінового зонда для препаратів ВММх гепатоцитів наведено в табл. 1. Враховуючи те, що відновлення спінового зонда в препаратах

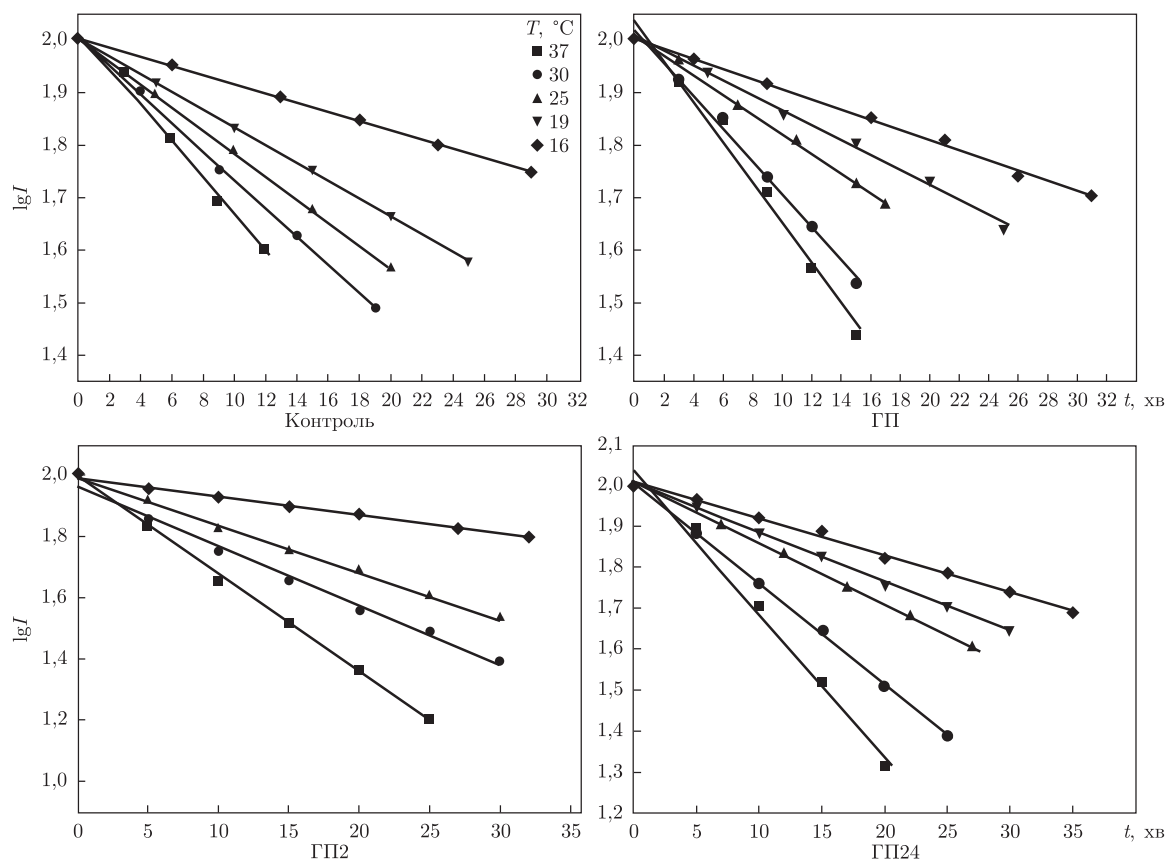


Рис. 1. Відновлення спінового зонда ТЕМПОН залежно від часу для препаратів внутрішньої мембрани мітохондрій гепатоцитів щурів у температурному діапазоні 16–37 °С: ГП — гіпобіоз, ГП2 — через 2 год, ГП24 — через 24 год після припинення впливу гіпобіотичних чинників. I — відносні зміни амплітуди середньопольового компонента спектра ЕПР зонда (від. од.)

ВММх описується кінетикою реакції першого порядку, а умови досліджень (вміст білка, зонда тощо) ідентичні для всіх препаратів, можна припустити, що константа швидкості відновлення спінового зонда залежить від виду і особливостей метаболізму досліджуваного об'єкта і відображає його структурно-функціональні особливості [3].

Аналізуючи отримані результати, відзначимо, що для препаратів ВММх гепатоцитів, отриманих за умов штучного гіпобіозу, константа швидкості відновлення спінового зон-

Таблиця 1. Константа швидкості (хв^{-1}) відновлення спінового зонда для препаратів внутрішньої мембрани мітохондрій гепатоцитів щурів у стані гіпобіозу ($M \pm m$, $n = 5$)

Температура, °С	Контроль	ГП	ГП2	ГП24
37	$0,0347 \pm 0,0024$	$0,0382 \pm 0,0020$	$0,0318 \pm 0,0022$	$0,0327 \pm 0,0021$
30	$0,0269 \pm 0,0019$	$0,0311 \pm 0,0018$	$0,0194 \pm 0,0014^*$	$0,0235 \pm 0,0019$
25	$0,0217 \pm 0,0021$	$0,0188 \pm 0,0013$	$0,0155 \pm 0,0011^*$	$0,0148 \pm 0,0012^*$
19	$0,0169 \pm 0,0013$	$0,0141 \pm 0,0014$	—	$0,0119 \pm 0,0012^*$
16	$0,0088 \pm 0,0006$	$0,0097 \pm 0,0007$	$0,0058 \pm 0,0004^*$	$0,0075 \pm 0,0006^*$

Примітка. ГП — гіпобіоз, ГП2 — через 2 год, а ГП24 — через 24 год після припинення впливу гіпобіотичних чинників.

* $p \leq 0,05$ відносно відповідного контролю при кожному значенні температури.

да вірогідно не змінюється при досліджуваних значеннях температури відносно відповідного контролю (див. табл. 1). Ймовірно, за умов гіпобіозу не відбувається температурної компенсації функціональної активності дихального ланцюга мітохондрій гепатоцитів. Слід враховувати, що температурні компенсації можливі не для всіх систем клітини, а значні зміни швидкості окремих стадій метаболічних процесів вимагають модифікацій структури ферментів та надмолекулярних структур. При зниженні температури тіла може відбуватися температурна компенсація метаболічних процесів за рахунок, зокрема, змін активності ферментів (компонентів) дихального ланцюга, що спостерігалось у попередніх дослідженнях [13].

Для препаратів ВММх гепатоцитів, отриманих за умов виходу зі стану штучного гіпобіозу, константа швидкості відновлення спінового зонда зменшується при кожному значенні температури в середньому на 30% відносно відповідного контролю як для ГП2, так і ГП24 (див. табл. 1).

Зменшення константи швидкості при виході зі стану гіпобіозу може свідчити про зниження активності окисно-відновлювальних реакцій дихального ланцюга мітохондрій, можливо, в результаті структурних модифікацій ВММх за цих умов.

Низка процесів, у яких задіяні мембранні структури, супроводжуються конформаційними перебудовами, які можливі при цілому ряді фізико-хімічних процесів і зміні умов середовища, у тому числі температури [3]. Це стосується і ферментних систем, що беруть участь у перенесенні електронів і протонів [14]. Оскільки спіновий зонд безпосередньо контактує з певними ділянками дихального ланцюга, приймаючи у них електрон, структурні перебудови ВММх, які відбуваються за умов виходу зі стану штучного гіпобіозу, можуть впливати на процес відновлення спінового зонда при його взаємодії з дихальним ланцюгом мітохондрій.

Таким чином, для ВММх гепатоцитів за умов штучного гіпобіозу не виявлено відмінностей у швидкості відновлення зонда відносно відповідного контролю (у досліджуваному діапазоні температур). Зменшення величини константи швидкості відновлення зонда при виході зі стану гіпобіозу, можливо, пов'язано зі структурними модифікаціями мембрани за цих умов. Ініціаторами структурної перебудови в мембранах мітохондрій можуть виступати білкові структури, що не виключає зміни структурної організації ліпідного бішару [3].

Отже, за результатами досліджень відновлення спінового зонда ТЕМПОН у препаратах ВММх гепатоцитів методом ЕПР спінового зонда в динаміці при різних значеннях температури встановлено, що температурна залежність функціонування дихального ланцюга мітохондрій за величиною константи швидкості відновлення спінового зонда за умов гіпобіозу подібна контролю. Виявлене зменшення константи швидкості відновлення ТЕМПОН у препаратах ВММх після припинення дії чинників штучного гіпобіозу може свідчити про зниження активності окисно-відновлювальних реакцій дихального ланцюга, можливо, в результаті структурних модифікацій ВММх при виході зі стану гіпобіозу.

1. *Нардід О. А.* Відновлення спінового зонда в оцінці життєздатності біологічних об'єктів // *Фізика живого*. – 2008. – **16**, № 1. – С. 44–49.
2. *Вилков Л. В., Пентин Ю. А.* Физические методы исследования в химии. Резонансные и электрооптические методы. – Москва: Высш. шк., 1989. – 288 с.
3. *Нардід О. А.* Особливості температурних залежностей відновлення спінового зонда в суспензії мітохондрій // *Фізика живого*. – 2008. – **16**, № 1. – С. 50–55.
4. *Скулачев В. П., Богачев А. В., Каспаринский Ф. О.* Мембранная энергетика. – Москва: Изд-во Моск. ун-та, 2010. – 368 с.

5. Мельничук С. Д., Мельничук Д. О. Гіпобіоз тварин (молекулярні механізми та практичне значення для сільського господарства і медицини). – Київ: Видавничий центр НАУ, 2007. – 220 с.
6. Мельничук С. Д., Вихованець В. І. Вплив умов штучного гіпобіозу на енергетичний обмін у щурів // Укр. біохім. журн. – 2005. – **77**, № 3. – С. 131–135.
7. Мельничук С. Д. Основні показники кислотно-основного стану крові та обмінних процесів у щурів у разі гіпобіозу та загальної анестезії за ампутації кінцівки // Укр. біохім. журн. – 2001. – **73**, № 6. – С. 104–107.
8. Практикум по биохимии: Уч. пособие / Под. ред. С. Е. Северина, Г. А. Соловьевой. – Москва: Изд-во Моск. ун-та, 1989. – 509 с.
9. Greenberg C. S., Craddock P. R. Rapid single-step membrane protein assay // Clin. Chem. – 1982. – **28**, No 7. – P. 1725–1726.
10. Жданов Р. И. Парамагнитные модели биологически активных соединений. – Москва: Наука, 1981. – 280 с.
11. Кольтовер В. К. Применение метода спинового зонда в исследовании биологических мембран // Усп. биол. химии. – 1974. – № 15. – С. 232–254.
12. Чумаков В. М. Идентификация и исследование методом ЭПР природных семихинонных свободных радикалов в биологических системах: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 0–91. – Москва, 1969. – 24 с.
13. Мельничук С. Д., Хижняк С. В., Морозова В. С., Войцицкий В. М. Активність NAD⁺-Н-генеруючих ензимів та вміст цитохромів у мітохондріях печінки та міокарда щурів за експериментального гіпобіозу // Укр. біохім. журн. – 2013. – **85**, № 4. – С. 75–81.
14. Белоус А. М., Бондаренко В. А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. – Київ: Наук. думка, 1982. – 256 с.

*Національний університет біоресурсів
і природокористування України, Київ
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
НАН України, Харків*

Надійшло до редакції 07.11.2014

**Член-корреспондент НААН України С. Д. Мельничук, С. В. Хижняк,
О. А. Нардид, Я. О. Черкашина, В. С. Морозова, С. В. Репина,
В. М. Войцицкий**

Применение метода электронного парамагнитного резонанса для оценки функциональной активности дыхательной цепи митохондрий гепатоцитов крыс при искусственном гипобиозе

Исследована активность окислительно-восстановительных реакций дыхательной цепи митохондрий гепатоцитов методом электронного парамагнитного резонанса спинового зонда (ТЕМПОН). Установлено, что по величине константы скорости восстановления спинового зонда температурная зависимость функционирования дыхательной цепи митохондрий при искусственном гипобиозе подобна контролю. Уменьшение константы скорости при выходе из состояния гипобиоза указывает на снижение активности окислительно-восстановительных реакций дыхательной цепи, возможно, в результате структурных модификаций внутренней мембраны митохондрий гепатоцитов в этих условиях.

Corresponding Member of the NAAS of Ukraine **S. D. Melnytchuk, S. V. Khyzhnyak, O. A. Nardid, Ya. O. Cherkashyna, V. S. Morozova, S. V. Repina, V. M. Voitsitsky**

Application of the electron paramagnetic resonance to assess the functional activity of the respiratory chain of rates' hepatocyte mitochondria under artificial hypobiosis

The activity of oxidation-reduction reactions of the electron transport chain of the hepatocytes mitochondria by the electron paramagnetic resonance spin probe (TEMPON) is investigated. It is established that the temperature dependence of the functioning of the mitochondria electron transport chain under the artificial hypobiosis is similar to the control by the constant value of recovery spin probe rate. The reducing of the recovery rate constant at the proceeding from the hypobiosis state indicates a decrease of the activity of oxidation-reduction reactions of the electron transport chain, perhaps, due to structural modifications of the inner mitochondria membrane of hepatocytes under these conditions.