

В. В. ПЕТРУНЯКА, Н. Н. КУВШИНОВ, В. Н. КАРНАУХОВ

ОСОБЕННОСТИ ДЫХАНИЯ ТКАНЕЙ МОЛЛЮСКОВ

(Представлено академиком Г. М. Франком 22 VII 1974)

Исследование гигантских нейтронов легочного моллюска *Limnaea stagnalis* методами микроспектрального анализа позволило установить, что одной из особенностей энергетики этих клеток является участие каротиноидов в их окислительном метаболизме (^{1, 2}). Было показано, что каротиноиды совместно с гемопротейнами типа миоглобина локализованы в специальных цитоплазматических гранулах (³), называемых цитосомами (⁴). При этом предполагалось (⁵), что каротиноидсодержащие гранулы — цитосомы представляют собой внутриклеточный органоид (³), способный осуществлять энергообеспечение клеток в гипоксических условиях, функционально замещая митохондрии (⁶). Особый интерес к дальнейшему изучению роли каротиноидсодержащих гранул в окислительном метаболизме клеток моллюсков вызван тем обстоятельством, что эти гранулы по своей ультраструктурной организации, химическому составу и выполняемым функциям аналогичны, по-видимому, гранулам липофусцина — желтого пигмента старения теплокровных (^{7, 8}). Такого же типа гранулы являются характерным компонентом клеток ряда тканей ныряющих животных.

В связи с этим представлялось интересным исследовать особенности потребления кислорода тканями моллюска, содержащими высокие концентрации каротиноидов.

В качестве объекта исследования были использованы ткани надпочечного узла ганглиев и слюнной железы моллюска *Limnaea stagnalis* (^{1, 6, 9}). Ткани гомогенизировались на холоду в стеклянном гомогенизаторе в 1 мл среды, содержащей сахарозу (250 мМ), КСl (15 мМ), NaHCO₃ (6 мМ), MgCl₂ (3 мМ), трис-HCl (50 мМ) с рН 7,5. Та же среда, разработанная с учетом ионного состава гемолимфы моллюска (¹⁰), использовалась и при регистрации скорости дыхания гомогенатов.

Скорость потребления кислорода гомогенатами определяли полярографически закрытым платиновым электродом с тефлоновой мембраной. Измерения производили с помощью полярографа LP-7 при рабочем напряжении 0,7 в. Калибровку электрода проводили биологическим методом по Чансу (¹¹) с использованием в качестве тест-объекта суспензии миксомицета *Physarum polyseriatum*, интенсивно поглощающего кислород. Скорость потребления кислорода гомогенатами тканей выражалась в микроатомах кислорода за 1 мин. на 1 мг сухого веса ткани.

Измерения производили в специальной термостатированной (22° С) ячейке, в которую вводили по 0,2 мл гомогената, что в пересчете на сухой вес соответствовало 2,7 мг нервной ткани и 8,7 мг ткани слюнной железы. Эксперименты проводили в феврале — марте на животных, содержащихся при +2°, а также на животных в течение нескольких дней адаптированных к комнатной температуре.

Гомогенаты исследованных тканей обладают достаточно высоким уровнем эндогенного дыхания. Причем скорость потребления кислорода гомогенатом нервной ткани более чем в два раза превышает таковую слюнной железы; ткани моллюсков, адаптированных к комнатной температуре,

обладают несколько сниженным уровнем дыхания. (В мкат. O_2 /мин на 1 мг сухого веса для нервных ганглиев неадаптированных моллюсков $0,0018 \pm 0,0003$, адаптированных $0,0014 \pm 0,0002$; для слюнной железы неадаптированных моллюсков $0,0008 \pm 0,0005$, адаптированных $0,0006 \pm 0,0002$).

Результаты действия некоторых субстратов и ингибиторов окисления на скорость потребления кислорода гомогенатами тканей моллюсков сведены в табл. 1. Полученные данные показывают, что НАД-Н сильнее стимулирует дыхание слюнной железы, в то время как НАДФ-Н и сукцинат, наоборот, оказывают большее действие на дыхание гомогената ганглиев. Следует при этом отметить, что стимулирующее действие перечисленных субстратов на ткани животных, адаптированных к комнатной температуре, выражено более слабо. Амитал и цианистый калий в значительной мере ингибируют дыхание гомогенатов. В то же время малонат почти не влияет на скорость потребления кислорода.

Таблица 1

Действие субстратов и ингибиторов окислительного метаболизма на скорость потребления кислорода гомогенатами тканей моллюска (% к исходному уровню)

Соединение	Концен-трация, мМ	Ганглии	Слюнная железа	Соединение	Концен-трация, мМ	Ганглии	Слюнная железа
НАД-Н	1	50	80	Амитал	1,8	-60	-40
НАДФ-Н	1	104	80	KCN	1	-36	-36
Сукцинат	1	36	8	KCN	5	-48	-28
α -кетоглютарат	1	0	0	Малонат	5	5	-10

Полное подавление эндогенного дыхания тканей (до уровня дрейфа записи) могло быть достигнуто при совместном действии малоната, амитала и цианистого калия в концентрации 5 ммол/л. Цианид в концентрации 1 ммол/л, применяемый вместе с малонатом и амиталом, ингибирует дыхание нервной ткани только на 84% и слюнной железы — на 44%.

Увеличение скорости потребления кислорода, стимулированное экзогенными субстратами, может сниматься соответствующими ингибиторами. Так, малонат, почти не влияя на уровень эндогенного дыхания гомогенатов, полностью снимает усиление дыхания, стимулированное сукцинатом. Как было отмечено выше, экзогенный НАД-Н увеличивает скорость потребления кислорода гомогенатами тканей. Этот эффект снимается амиталом. Влияние же на него цианистого калия носит более сложный характер. Оказалось, что добавление KCN к гомогенату, содержащему экзогенный НАД-Н, приводит к дальнейшему увеличению скорости потребления кислорода (рис. 1). Причем величина этого дополнительного увеличения зависит от концентрации KCN. Кривая, отражающая эту зависимость (рис. 2), имеет минимум при концентрации цианистого калия 2 ммол/л и максимум — при концентрации 5 ммол/л с последующим пологим спадом.

Эффект стимуляции дыхания гомогенатов не зависит от очередности введения добавок KCN и НАД-Н (рис. 3а). Интересно при этом отметить, что стимуляция дыхания гомогенатов ганглиев адаптированных к комнатной температуре моллюсков в 2—2,5 раза ниже, чем в случае неадаптированных животных. Гомогенаты слюнной железы реагируют на добавки в этих условиях практически одинаково. Эффект стимулирующего действия KCN наблюдается при использовании НАД-Н в качестве субстрата только в свежеприготовленных гомогенатах и снимается при хранении гомогенатов в холодильнике в течение суток или после нагрева их до температуры 90—100°. Замена НАД-Н на НАДФ-Н приводит к уменьшению эффекта стимуляции дыхания цианистым калием. В случае использования в

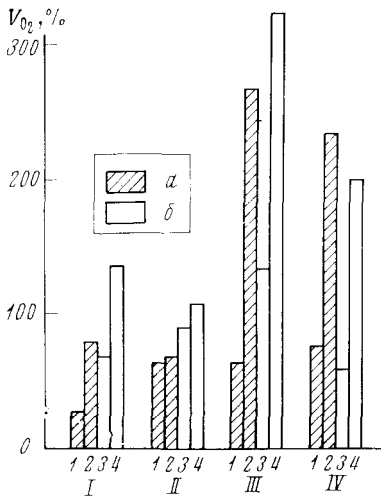


Рис. 1

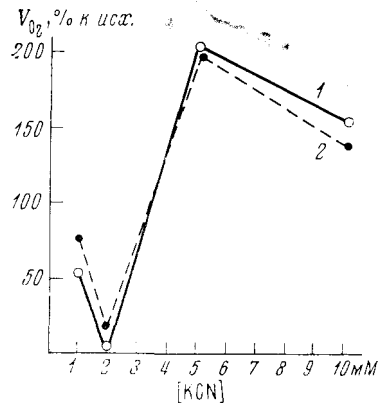


Рис. 2

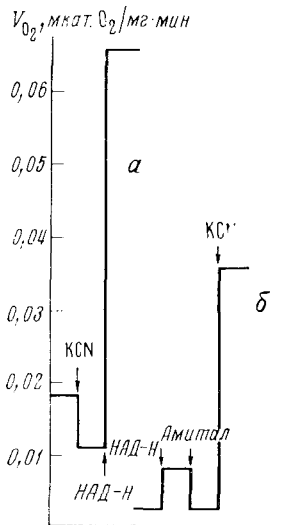


Рис. 3

Рис. 1. Изменение скорости потребления кислорода гомогенатами нервной ткани (а) и ткани слюнной железы (б) (в % по отношению к исходному уровню эндогенного дыхания) при последовательной добавке НАД-Н (1, 3) в концентрации 1 мМ и KCN (2, 4) в концентрации 1 (I), 2 (II), 5 (III) и 10 (IV) мМ

Рис. 2. Зависимость усиления НАД-Н-стимулируемого дыхания гомогенатов нервной ткани (1) и ткани слюнной железы (2) от концентрации добавленного KCN

Рис. 3. Изменение скорости потребления кислорода гомогенатом нервной ткани моллюска. а — при действии KCN (5 мМ) и НАД-Н (1 мМ); б — при действии НАД-Н (1 мМ), амитала (1,8 мМ) и KCN (5 мМ)

качестве субстрата сукцината или α -кетоглутарата, добавка KCN (5 мМ) вызывает, как обычно, подавление дыхания гомогенатов тканей.

Амитал не снимает вызываемого KCN усиления потребления кислорода гомогенатом в присутствии НАД-Н (рис. 3б). При совместном действии амитала (1,8 мМ) и малоната (5 мМ) на гомогенаты в присутствии НАД-Н наблюдается некоторое подавление дыхания. Динитрофенол (50 мкМ) и АДФ (1 мМ) в присутствии фосфата не приводят к усилению дыхания, что согласуется с полученным ранее данными (16).

Обсуждение. Совокупность полученных результатов указывает на то, что в тканях моллюсков помимо хорошо известной митохондриальной системы присутствует иная система окисления НАД-Н. Возможно, что эта система окисления локализована в каротиноидсодержащих гранулах (3, 6) — цитосомах, в которых ранее было показано наличие гемопротеинов, а также ряда дыхательных ферментов (1, 3, 12). В поддержку этого предположения свидетельствует то обстоятельство, что изменение интенсивности полос поглощения каротиноидов в спектре ослабления гранул про-

исходит при действии на живые нейроны KСN и не наблюдается при ингибировании дыхательной цепи амталом (¹, ⁶).

Локализованная в цитосомах система окисления имеет общий с митохондриями субстрат — НАД-Н, и связана с ними неизвестными пока механизмами регуляции. Действие этих регуляторных механизмов проявляется в том, что в условиях нормального функционирования митохондрий цитосомальная система окисления малоактивна. Прекращение функционирования митохондрий, например, путем блокирования цитохромоксидазы цианистым калием, приводит к активации цитосомной системы окисления НАД-Н.

Эти представления находятся в соответствии с результатами исследования энергозависимого накопления стронция в нервных клетках моллюсков (¹³). Было показано, что в условиях нормальной аэрации стронций накапливается преимущественно в митохондриях и слабо — в цитосомах. В анаэробных условиях ситуация резко меняется — накопление стронция наблюдается в основном в цитосомах, в то время как митохондрии демонстрируют весьма малую активность. На наличие в тканях моллюсков системы окисления НАД-Н, не подавляемой цианидом и амталом, неоднократно указывалось ранее (¹⁴, ¹⁵).

С другой стороны, полученные данные поддерживают предположения о близком сходстве каротиноидсодержащих гранул клеток моллюсков с гранулами липофусцина — желтого пигмента старения (⁶, ⁹). Бьеркерудом ранее было показано (¹⁶) значительное поглощение кислорода суспензией липофусциновых гранул, стимулированное добавкой НАД-Н в 7—11 раз сильнее, чем в суспензии равного (по белку) количества митохондрий в тех же условиях.

Институт биологической физики
Академии наук СССР
Пушкино-на-Оке

Поступило
13 VII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ V. N. Karnaukhov, *Exp. Cell. Res.*, v. 64, 301 (1974). ² В. Н. Карнаухов, ДАН, т. 196, 1221 (1971). ³ В. Н. Карнаухов, С. С. Вартошь, *Цитология*, т. 13, 1088 (1971). ⁴ A. Nolte, H. Breusker, D. Kuhlmann, *Zs. Zellforsch.*, B. 68, 1, (1965). ⁵ В. Н. Карнаухов, Тез. II Всесоюз. биохим. съезда, секц. 8, Ташкент, 1969, стр. 30. ⁶ В. Н. Карнаухов, Функции каротиноидов в клетках животных, «Наука», 1973. ⁷ V. N. Karnaukhov, *Exp. Cell Res.*, v. 80, 479 (1973). ⁸ V. N. Karnaukhov, T. B. Tataryunas, V. V. Petrunyaka, *Mech. Age and Dev.*, v. 2, 210 (1973). ⁹ H. H. Boer, S. E. Wendelaar Bonda, N. van Rooijen, *Zs. Zellforsch.*, B: 76, 228 (1967). ¹⁰ З. А. Сорокина, В. С. Зеленская, *Журн. эволюцион. биохим. и физиол.*, т. 3, № 1, 125 (1967). ¹¹ Руководство по изучению биологического окисления позитрографическим методом, Г. М. Франк, М. Н. Кондрашова и др. «Наука», 1973. ¹² I. Zs-Nagy, *Ann. biol. Tihany (Hung.)*, v. 34, 25 (1967). ¹³ I. Zs-Nagy, Kerpel — Fronicus, *Abstr. VII Congr. Intern. Micr. Electron.*, Grenoble, 1970, p. 155. ¹⁴ V. A. Ryan, T. E. King, *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 85, 450 (1962). ¹⁵ А. З. Шапиро, Н. А. Вержбинская, В сб. Физиология и биохимия беспозвоночных. «Наука», 1968, стр. 233. ¹⁶ S. Björkerud, J. T. Cummins, *Exp. Cell. Res.*, v. 32, 510 (1963).