

Е. А. АКУЛОВА, Г. Д. МИРОНОВА, Е. Н. МУХИН, Р. Х. РУЗИЕВА,
С. В. МУРЗАЕВА, С. П. САЛЬНИКОВА

ФЛАВОНОИДЫ И ЭНЕРГЕТИКА ИЗОЛИРОВАННЫХ ХЛОРОПЛАСТОВ И МИТОХОНДРИЙ

(Представлено академиком М. Х. Чайлаханом 13 I 1972)

Об участии веществ фенольной природы в энергетическом обмене высших растений известно немного. В настоящее время в модельных системах с хлоропластами и митохондриями применяется в качестве ингибиторов синтеза АТФ ряд искусственно синтезированных и природных фенольных соединений (¹⁻³). Тем не менее неясно, какое отношение имеют естественные фенолы к биохимическим процессам, имеющим место *in vivo* в клеточных органеллах. Однако интересно уже то, что, как показано в последние годы, метаболизм фенольных соединений связан с хлоропластами и митохондриями (^{4, 8}). Нам, в частности, удалось обнаружить, выделить и идентифицировать несколько веществ фенольной природы из хлоропластов гороха.

Ранее сообщалось о выделении низкомолекулярных веществ из гороха и их воздействии на перенос электрона хлоропластами, зависящий и не зависящий от фосфатакцептирующей системы (⁹).

В настоящее время доказано, что эти вещества имеют фенольную природу и относятся к обширной группе природных фенольных красителей — флавоноидов. Учитывая тот факт, что обнаруженные нами фенольные соединения локализованы в хлоропластах, можно было предположить, что они участвуют в метаболизме последних путем воздействия на энергетический обмен. Для выяснения характера и места включения флавоноидов в метаболизм высших растений и, в частности, в их энергетический обмен, были проведены исследования по влиянию этих веществ на фотофосфорилирование изолированных хлоропластов гороха и дыхательную цепь митохондрий печени крысы, сопряженную с фосфорилированием (мы не располагали возможностью использовать в опытах растительные митохондрии).

В качестве объекта исследования использовали 10—12-дневные проростки гороха сорта «Неистощимый». Растения выращивали в теплице при естественном освещении. Хлоропласты выделяли по обычной, принятой нами методике в сахарозно-фосфатном буфере (¹⁰). Флавоноиды извлекали из листьев гороха экстракцией метанолом (¹¹). Индивидуальные вещества из суммарного экстракта очищали методом препаративной хроматографии на бумаге. Экстракт наносили в виде сплошной полосы на стандартные листы бумаги и хроматографировали. Вещества с бумаги элюировали диэтилэтированной водой. Изучали два вещества: кэмпферол-гликозид (КГ), кэмпферол-гликозид-кумарат (КГК). Концентрация КГК и КГ выражена в отн. ед. по величине оптической плотности (е.о.п.) растворов при λ 260 мμ. Исследовали два типа фотофосфорилирования: физиологический с ферредоксином и НАДФ (нециклический) и нефизиологический с феназинметасульфатом (ФМС). Количество синтезированной АТФ определяли биoluminesцентным методом (¹²). Скорость фосфорилирования рассчитывали в μ молях АТФ на 1 мг хлорофилла в 1 час. Ферредоксин получали из листьев гороха, как описано (¹³). Митохондрии выделяли из печени

крысы в среде, содержащей 0,3 М сахарозу, 0,01 М трис-НСl-буфер (рН 7,5). Поглощение кислорода определяли полярографически с вращающимся платиновым электродом. АТФазную активность измеряли потенциометрически по выходу протонов. Активность пероксидазы определяли люминесцентным методом по изменению напряжения в милливольтках при добавке в пробу $6 \cdot 10^{-9}$ мол. H_2O_2 .

На рис. 1 представлена зависимость скорости образования АТФ изолированными хлоропластами гороха в ФМС-катализируемом и нециклическом фотофосфорилировании от концентрации КГК в среде инкубации.

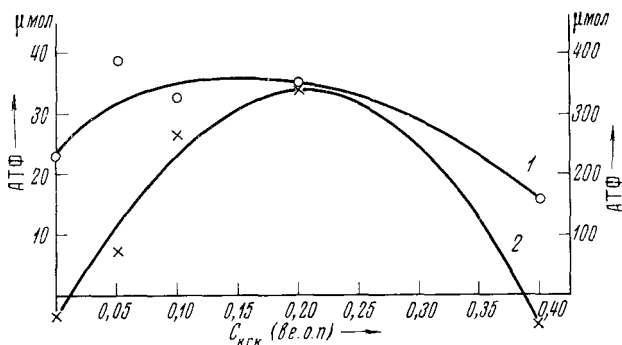


Рис. 1. Зависимость скорости синтеза АТФ хлоропластами гороха от концентрации кэмпферол-глюкозид-кумарата. 1 — фосфорилирование с ФМС (правая ордината), состав смеси: трис 40 $\mu\text{мол.}$, MgCl_2 5 $\mu\text{мол.}$, KH_2PO_4 4 $\mu\text{мол.}$, АДФ 4 $\mu\text{мол.}$, ФМС 0,1 $\mu\text{мол.}$, остальные условия как в варианте 2; 2 — физиологический тип фосфорилирования с НАДФ и ферредоксином (левая ордината), состав смеси: трис 40 $\mu\text{мол.}$, MgCl_2 5 $\mu\text{мол.}$, KH_2PO_4 4 $\mu\text{мол.}$, АДФ 4 $\mu\text{мол.}$, НАДФ 0,5 $\mu\text{мол.}$, ферредоксин 100 $\mu\text{г.}$; общий объем смеси 1,5 мл, освещение 30 тыс. лк, экспозиция 5 мин., температура 23° , хлоропласты соответствуют 50 $\mu\text{г}$ хлорофилла

Как видно из рисунка, малые концентрации КГК увеличивают скорость синтеза АТФ и в том, и другом типе фотофосфорилирования, при этом максимально эффективны примерно одни и те же концентрации КГК. При возрастании содержания КГК в среде наблюдается подавление фосфорилирования, причем сильнее подавляется нециклическое фосфорилирование с НАДФ и ферредоксином.

На рис. 2 изображена зависимость скорости синтеза АТФ от концентрации флавоноида КГ. Характер зависимости в этом случае отличен от рассмотренной выше, но одинаков для исследуемых типов фосфорилирования. Все испытанные концентрации КГ подавляют оба типа фосфорилирования. Максимальное ингибирование достигается уже при малых концентрациях этого флавоноида. Дальнейшее увеличение концентрации не влияет на фосфорилирование, и кривая идет практически параллельно оси абсцисс. Следует подчеркнуть, что и КГК менее эффективно ингибирует фосфорилирование с ФМС (максимальное ингибирование составляет 40%), чем нециклический тип (наибольшая величина подавления 90%). Таким образом, КГ не угнетает полностью фосфорилирование, а сохраняет довольно высоким постоянный уровень образования АТФ с ФМС и низкий, но тоже постоянный уровень синтеза АТФ при нециклическом фосфорилировании (все данные были получены с хлоропластами и флавоноидами, выделенными в осенне-зимние месяцы 1970—1971 г.).

Анализируя изложенные выше результаты, можно отметить, что флавоноиды оказывают на фотофосфорилирование обоих типов регуляторное действие, отличающееся по своему характеру: КГ является ингибитором при всех испытанных концентрациях, а КГК — активатором при малых и ингибитором при больших концентрациях. Интересно отметить, что зависимости такого рода, как показано для КГ, характерны для аллостериче-

ских регуляторов ферментов. Поскольку КГ и КГК локализованы в хлоропластах, то весьма вероятно, что *in vivo* тоже имеет место их участие в регуляции синтеза АТФ, аналогичное обнаруженному в модельных системах. К тому же противоположная направленность действия этих веществ открывает более широкий диапазон регуляции образования АТФ. Представляет интерес относительно меньшая эффективность действия КГ и КГК на нефизиологический тип фотофосфорилирования с ФМС, однако причина этого различия неясна.

Эти же флавоноиды были использованы для изучения их влияния на функционирование сопряженной с фосфорилированием дыхательной цепи.

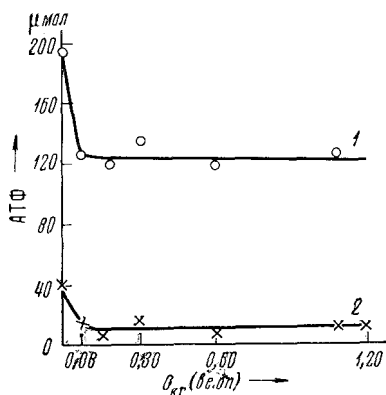


Рис. 2

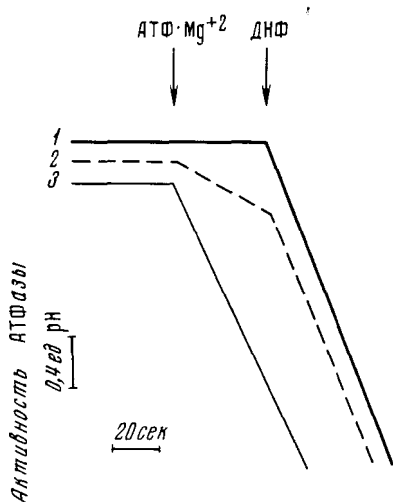


Рис. 4

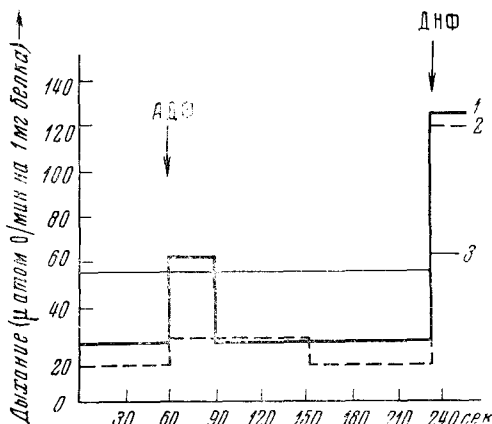


Рис. 3

Рис. 2. Зависимость образования АТФ хлоропластами гороха от концентрации кампферолгликозида. 1 — фосфорилирование с ФМС; 2 — фосфорилирование с НАДФ и ферредоксином. Состав смеси и условия проведения опыта см. рис. 1

Рис. 3. Влияние флавоноидов на дыхание и фосфорилирование митохондрий печени крысы. 1 — контроль; 50 $\mu\text{г}$ (2) и 300 $\mu\text{г}$ (3) флавоноидов на 1 мг белка в пробе; условия инкубации: сахараза 0,05 моля, КСl 0,05 моля, KH_2PO_4 0,003 моля, трис-НСl 0,002 моля, рН 7,5, белка митохондрий 3 $\mu\text{г}$. Добавки в среду инкубации: янтарной кислоты 0,005 моля, АДФ 200 $\mu\text{мол}$, динитрофенола (ДНФ) 50 $\mu\text{мол}$. Объем пробы 1,5 мл

Рис. 4. Влияние флавоноидов на АТФазную активность митохондрий печени крысы. 1 — контроль; 50 $\mu\text{г}$ (2) и 300 $\mu\text{г}$ (3) флавоноидов на 1 мг белка в пробе. Условия инкубации см. рис. 3. АТФ 1 ммоль, MgCl_2 1 ммоль, ДНФ 50 $\mu\text{мол}$.

При исследовании действия флавоноидов на окислительное фосфорилирование митохондрий печени крыс обнаружено, что эти вещества в концентрации 50—1000 $\mu\text{г}$ на 1 мг белка митохондрий вызывают снижение показателей сопряженности интактных митохондрий, что выражается в уменьшении скорости фосфорилирования и отношения АДФ / О, в то время как скорость разобщенного 2,4-динитрофенолом (ДНФ) дыхания практически не меняется (рис. 3). Эти же концентрации флавоноидов вызывают некоторую активацию латентной АТФазы (рис. 4).

Повышение концентрации флавоноидов в пробе до 300—500 $\mu\text{г}$ на 1 мг белка митохондрий приводит к разобщающему эффекту, что выражается

в резкой стимуляции дыхания при инкубации митохондрий с субстратом, так что скорость дыхания в этом случае приближается к скорости дыхания в присутствии АДФ (рис. 3). Одинаковое действие испытуемых флавоноидов на окислительное фосфорилирование митохондрий можно объяснить тем, что в опытах с митохондриями исследовались более высокие концентрации этих веществ, чем с хлоропластами.

Исследование АТФазной активности при инкубации митохондрий с высокими концентрациями флавоноидов показало, что они вызывают сильную стимуляцию латентной АТФазы (рис. 4).

Получены также данные о влиянии флавоноидов на пероксидазную активность митохондрий. Оказалось, что пероксидазная функция митохондрий подавляется флавоноидами и ингибирование увеличивается с возрастанием их концентрации. Без добавок флавоноидов величина напряжения составляет 5,7 мВ, ингибирование равно 0; при добавке 50 мкг флавоноидов на 1 мг белка напряжение равно 1,7 мВ, ингибирование 71%; при добавке 300 мкг флавоноидов на 1 мг белка напряжение 0,2 мВ, ингибирование составляет 97%. Этот факт представляет интерес в связи с выяснением места и механизма действия флавоноидов в реакциях образования высокоэнергетического соединения хлоропластами и митохондриями, так как установлена функциональная связь между пероксидазной активностью и окислительным фосфорилированием митохондрий.

Аналогично флавоноидам на сопряженность и латентную АТФазу митохондрий сердца голубя и печени крысы действует ингибитор каталазы 3-амино-1,2,4-триазол. Известно, что аминотриазол является гербицидом, который, как и флавоноиды, ингибирует рост растений.

Изложенные выше результаты, по нашему мнению, подтверждают предположение о регуляции энергетического обмена растений физиологически активными веществами фенольной природы, возможно, по аллостерическому механизму. Кроме того, эти данные свидетельствуют в пользу точки зрения о том, что одним из путей регуляции роста растений фенольными ингибиторами является, в частности, их воздействие на энергетику растений. Однако механизм действия флавоноидов при функционировании хлоропластов и митохондрий нуждается в дополнительном исследовании.

Институт фотосинтеза
Академии наук СССР
Пушкино-на-Оке

Поступило
12 I 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. П. Скулачев, Аккумуляция энергии в клетке, М., 1969. ² G. Stenlid, *Phytochemistry*, 9, 2251 (1970). ³ S. Izawa, G. D. Winget, N. E. Good, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 22, 223 (1966). ⁴ М. Н. Запрометов, С. В. Колонкова, ДАН, 176, 470 (1967). ⁵ M. Satō, *Phytochemistry*, 6, 1363 (1967). ⁶ G. Weisenböck, M. Tevini, H. Reznik, *Zs. Pflanzenphysiol.*, 64, 274 (1971). ⁷ Биохимия фенольных соединений, под ред. Дж. Харборна, М., 1968. ⁸ Фенольные соединения и их биологические функции, «Наука», 1968. ⁹ Е. А. Акулова, Е. Н. Мухин, ДАН, 198, 956 (1971). ¹⁰ Z. Keister, O. San Pietro, F. S. Stolzenbach, *Arch. Biochem. and Biophys.*, 94, 187 (1961). ¹¹ R. Turetskaya, V. Kefeli et al., *Biologia plantarum*, 10, 205 (1968). ¹² H. U. Bergmeyer, *Methods of Enzymatic Analysis*, 1963, p. 553. ¹³ Е. Н. Мухин, Е. А. Акулова, ДАН, 169, 699 (1969). ¹⁴ Г. Д. Мпронова, Материалы колебательного симпозиума, Пушкино, 1971.