

М. Г. ЗАЙЦЕВА, Е. А. ВОРОБЬЕВА

ВНУТРИМИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ ФОНД ОКСАЛОАЦЕТАТА И УСТОЙЧИВОСТЬ ДЫХАНИЯ К ЦИАНИДУ

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 29 XII 1973)

Устойчивость дыхания некоторых растительных тканей к цианиду представляет собой давно известный факт. Это явление, впервые обнаруженное у аroidных, оказалось широко распространенным у многих растений. Дыхание тканей плодов, стареющих срезов запасных органов, листьев и многих других объектов не подавлялось достаточно высокими концентрациями цианида (¹). Для объяснения отсутствия чувствительности к яду был предложен ряд гипотез, ни одна из которых не получила убедительного экспериментального подтверждения, хотя работы в этом направлении велись достаточно интенсивно с широким применением всех современных методов исследования (¹, ²). Наиболее трудно было объяснить часто наблюдавшийся факт повышения скорости окисления под влиянием ингибитора.

Результаты изучения зависимости торможения дыхания от концентрации цианида указывали на возможность существования наряду с подавлением цитохромоксидазы какого-то второго эффекта ингибитора (², ³). Одним из возможных эффектов могло быть взаимодействие цианида с оксалоацетатом, часто обнаруживающимся в значительных количествах в тканях некоторых растений и присутствующим внутри митохондрий в концентрациях, способных тормозить окисление (⁴). Оксалоацетат, как известно, является активным ингибитором сукциндегидрогеназы (⁵), и его удаление должно обеспечивать увеличение скорости окисления, если только не полностью блокирована цитохромоксидаза или присутствует неподдаваемый альтернативный путь окисления, который был показан у ряда объектов (⁴). Возможность взаимодействия цианида с кетокислотами, оксикислотами и сахарами достаточно широко известна и послужила основой для одной из гипотез о природе устойчивости дыхания к цианиду (⁶). Эта способность ингибитора используется в некоторых методах определения активности дегидрогеназ для устранения оксалоацетата (⁷).

Таким образом, следует предположить, что присутствие оксалоацетата в митохондриях может обеспечивать стимуляцию окисления под влиянием цианида и повышенную устойчивость к яду. Если это предположение справедливо, то любое воздействие, способное устранять оксалоацетатное торможение, должно приводить к повышению чувствительности дыхания к ингибитору, и, наоборот, условия, способствующие накоплению оксалоацетата, должны обеспечивать увеличение устойчивости. Целью настоящей работы являлась проверка указанного выше предположения.

Устранение оксалоацетата осуществляется различными путями, но наиболее простым воздействием может быть введение в среду инкубации глутамата, обеспечивающего переаминирование (⁸), или введение АТФ, способствующего удалению оксалоацетата от активных центров сукциндегидрогеназы (⁹⁻¹¹). Увеличение содержания оксалоацетата достигается преинкубацией митохондрий с малатом, поскольку последний является непосредственным предшественником оксалоацетата в цикле Кребса.

Объектами исследований служили митохондрии корней яровой пшеницы *Triticum aestivum* L., ярового сорта Московская Краснозерная и М2453.

Растения, выращивались на полной питательной смеси Кнопа и брались для опытов в возрасте 6—8 дней. Методика выращивания и получения митохондрий описана нами ранее (12). Среда гомогенизации содержала сахарозу 0,5 М, калийно-фосфатный буфер $1/15$ М, цистеин 4,6 мМ и ЭДТА 2 мМ при pH 7,4. Промывка митохондрий производилась той же средой, но без цистеина. Средой ресуспендирования служила сахароза 0,48 М, содержащая 1 мг/мл альбумина и 0,027 мМ ЭДТА. В среде инкубации присутствовала сахароза 0,48 М, калийный фосфат 18 мМ, альбумин 2 мг/мл и субстрат окисления в комбинации с глутаматом 1,7 мМ или без него (сукцинат 17—26 мМ). Определение скорости поглощения кислорода проводилось в полярографической ячейке, объемом 1,35 мл с помощью закрытого совмещенного платинового электрода типа Кларка с мембраной из полипропилена или полиэтилена. В качестве регистрирующего прибора служил полярограф LP 7 с самописцем EZ 7.

Опыты проводились следующим образом: в варианте инкубации с глутаматом последний вводился в ячейку до внесения суспензий митохондрий. Через 2—2,5 мин. после суспензии добавлялся сукцинат, еще через 2—2,5 мин. вносили АДФ и, наконец, спустя 2 мин. делалась первая добавка цианида. Таким образом, исследовалось торможение окисления в состоянии третьем по Чансу (13). Всего за время инкубации одной и той же порции суспензии проводилось 6—7 добавок ингибитора. На основании полученных данных строились кривые, характеризующие торможение дыхания ядом, и по этим кривым определялась величина концентрации цианида, необходимая для торможения дыхания на 50% (14).

Окисление сукцината в наших опытах практически нацело тормозилось концентрациями ингибитора, равными 0,3—0,4 мМ. Таким образом, наш объект не содержал устойчивых к цианиду оксидаз альтернативных путей окисления. При последовательных титрованих суспензий ингибитором можно было видеть снижение подавляющей концентрации в области более низких величин, если только обеспечивались условия, необходимые для удаления оксалоацетата (табл. 1). Можно было также обнаружить

Таблица 1

Изменение устойчивости дыхания к цианиду при удалении оксалоацетата глутаматом (опыты №№ 1—11)

	Концентрация KCN, вызывающая торможение дыхания на 50% (10^{-3} М)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	Московская						Краснозерная				
	М 2453										
Инкубация без глутамата	3,90	5,80	4,30	1,90	2,84	3,06	3,00	2,65	2,49	3,40	2,20
с глутаматом	2,40	2,50	1,35	1,05	2,25	1,82	0,95	1,64	0,72	2,57	1,90

небольшую стимуляцию окисления под влиянием низких концентраций цианида (рис. 1). Это наблюдалось также в присутствии глутамата, однако при меньших концентрациях ингибитора и в менее широком диапазоне. Сама по себе форма кривой была характерной для изменений в скоростях дыхания под влиянием возрастающих концентраций яда. Аналогичной формы кривые получались при исследовании влияния цианида на дыхание целых корней и кусочков листьев пшеницы. В полном соответствии с вышесказанным выше предположением в присутствии АДФ, так же как глутамата, наблюдалось повышение чувствительности дыхания к цианиду (рис. 2). Таким образом, оба агента, способствующие удалению оксалоацетата, действовали совершенно аналогично.

Введение малата в среду инкубации митохондрий, окисляющих сукцинат, должно было приводить к повышению концентрации оксалоацетата внутри органелл, а это в свою очередь вызывать увеличение устойчивости дыхания к яду. Правда, малат, содержащий оксигруппу, сам по себе способен реагировать с цианидом, тем самым снижая его концентрацию в ячейке, что приводит к кажущемуся повышению устойчивости окисления

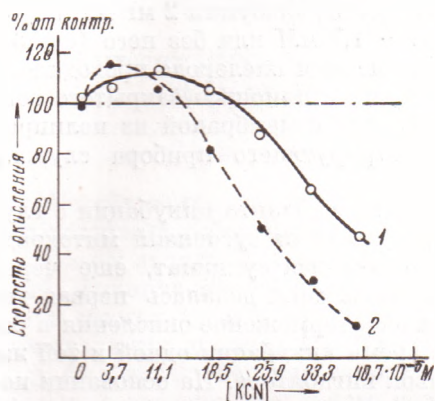


Рис. 1. Изменение скорости окисления сукцината под влиянием возрастающих концентраций цианида. 1 — без глутамата, 2 — с глутаматом

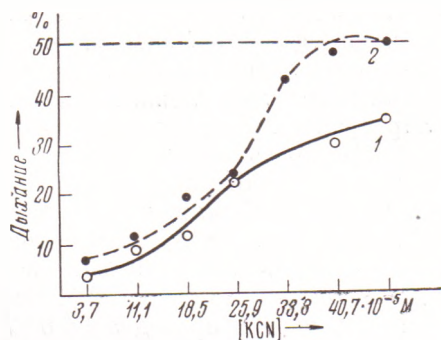


Рис. 2. Изменение тормозящего действия цианида под влиянием АТФ. 1 — без АТФ, 2 — с АТФ

к яду. Однако выяснить истинную природу эффекта можно, комбинируя внесение малата с глутаматом, который может служить в качестве теста на оксалоацетат. Действительно преинкубация суспензий с малатом (эксперимент I), а также введение малата в ячейку после внесения суспензии (эксперимент II) непосредственно перед субстратом окисления приводили к повышению концентраций цианида, необходимых для 50-процентного торможения скорости окисления (табл. 2). При этом введение глутамата вместе с малатом практически снимало эффект последнего, снижая подавляющую концентрацию до величин, близких к наблюдавшимся при инкубации в отсутствие малата. Последнее позволяло предполагать, что преобладающим в действии малата было не его взаимодействие с ингибитором, а влияние продукта его окисления — оксалоацетата. Таким образом, исследование показали, что внутримитохондриальный фонд оксалоацетата может существенно изменять чувствительность дыхания к цианиду. Накопление

Таблица 2

Изменение тормозящих концентраций цианида при инкубации митохондрий с малатом

№ опытов	Концентрация KCN, тормозящая окисление на 50% (10^{-5} M)					
	сукцинат	сукцинат + + глутамат	сукцинат +	сукцинат +	сукцинат +	сукцинат +
			+ малат	+ малат + + глутамат	+ малат	+ малат + + глутамат
			I		II	
1	3,62	3,0	4,27	—	3,94	2,92
2	—	2,83	3,87	2,0	3,99	—
3	2,59	0,62	2,03	1,40	—	—
4	2,39	0,82	2,96	1,07	—	—
5	—	1,35	—	2,09	—	—

Примечание. Среда инкубации: сукцинат 17,2 мМ, малат 17,2 мМ, глутамат 1,7 мМ.

этого метаболита, как можно было видеть, повышало эффективную концентрацию ингибитора нередко в 1,5—2 и даже 3—4 раза.

Накопление оксалоацетата в митохондриях связано с низкоэнергетическим состоянием органелл, которое может возникать в результате значительных затрат энергии на различные эндэргонические процессы, такие как транспорт ионов, процессы биосинтеза. Следует отметить, что малая чувствительность дыхания к цианиду отмечалась именно в тканях, характеризующихся активным метаболизмом — усиленным синтезом нуклеиновых кислот, липидов, белков и интенсивным поглощением фосфата (1). При этом отмечалось, что дыхание митохондрий отличается малыми величинами АДФ/О, что связывается с низкоэнергетическим состоянием митохондрий, обеспечивающим накопление оксалоацетата.

Все сказанное выше позволяет отнести известную роль внутримитохондриальному оксалоацетату в обеспечении устойчивости дыхания к цианиду.

Институт физиологии растений
им. К. А. Тимирязева
Академии наук СССР
Москва

Поступило
17 XII 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ H. Ikuma, Ann. Rev. Plant Physiol., v. 23, 419 (1972). ² R. T. Wedding, C. C. McCready, J. L. Harley, New Phytol., v. 72, 1 (1973). ³ D. S. Bendall, W. D. Bonner jr. Plant Physiol., v. 47, 236 (1971). ⁴ E. R. Waygood, Canad. J. Res., v. 28, (1), Sec. C, 7 (1950). ⁵ A. C. Hulme, M. J. C. Rhodes, In: Plant Organelles, London — N. Y., 1968, p. 99. ⁶ I. R. MacDonald, Ann. Bot., v. 23, 241 (1959). ⁷ H. A. Ells, Arch. Biochem. and Biophys., v. 85, 561 (1955). ⁸ М. Н. Кондрашова, Митохондрии. Структура и функция в норме и патологии, «Наука», 1971, стр. 25. ⁹ D. B. Tyler, J. Biol. Chem., v. 216, 395 (1955). ¹⁰ J. T. Wiskich, W. D. Bonner jr., Plant Physiol., v. 38, 594 (1963). ¹¹ R. E. Drury, J. P. McCollum, S. A. Carrison, Plant Physiol., v. 43, 248 (1968). ¹² М. Г. Зайцева, З. В. Тирова, ДАН, т. 194, № 5 (1970). ¹³ B. Chance, J. R. Williams, Adv. Enzymol., v. 17, 65 (1956). ¹⁴ Л. Уэбб, Ингибиторы ферментов и метаболизма, М., 1966, стр. 93.