

В. А. Брыков, И. П. Генерозова, А. Г. Шугаев,
член-корреспондент НАН Украины **Е. Л. Кордюм**

Метаболическая активность митохондрий корней гороха в условиях моделированной микрогравитации

*Наведено дані досліджень впливу кліностативування на метаболічну активність митохондрий, ізольованих із коренів 5-добових проростків гороху (*Pisum sativum* L.). Встановлено збільшення швидкості окиснення в стані з малату + глутамату та екзогенного НАДН, а також значення коефіцієнта дихального контролю одночасно зі зниженням відношення АДФ/О порівняно з контролем. Висловлено припущення, що такі зміни характеру дихання є наслідком адаптації метаболічної системи митохондрий до умов кліностативування.*

Известно, что реальная микрогравитация в космическом полете или ее моделирование в лабораторных условиях существенно влияют на структурно-функциональную организацию митохондрий клеток животных организмов, что ведет к серьезным нарушениям клеточного метаболизма. Так, в условиях микрогравитации происходят нарушения ультраструктуры митохондрий деструктивного характера в клетках сердечной мышцы [1], снижение окислительной активности органелл в клетках желтого тела яичников за счет снижения трансмембранного потенциала митохондрий [2], уменьшение внутриклеточного уровня АТФ в лимфоцитах [3], изменения в экспрессии генов митохондриальных белков [4], а также выход цитохрома С в цитоплазму [5], что в конечном счете может приводить в действие механизм апоптоза [2, 5]. Наблюдаемые эффекты варьируют в зависимости от типа исследуемых клеток и условий эксперимента. Что касается митохондрий растительных клеток, то имеющиеся данные в основном освещают ультраструктурные перестройки органелл, диапазон которых значительно варьирует в зависимости от вида растения, исследуемой ткани, условий эксперимента, и зачастую носят противоречивый характер [6–8].

Принимая во внимание высокую лабильность процесса окислительного фосфорилирования митохондрий, обеспечивающего энергетические потребности клетки в измененных условиях среды, мы провели исследование влияния клиностаивирования на функциональное состояние митохондрий, изолированных из растительных клеток, по таким показателям, как интенсивность окисления экзогенных субстратов и основных параметров, характеризующих сопряженность процессов окисления и фосфорилирования.

Материалы и методы исследования. Условия прорастания семян и роста проростков гороха (*Pisum sativum* L. сорт Альфа) описаны раньше [9]. Моделирование микрогравитации проводили с помощью медленного горизонтального клиностаивирования (2 об/мин). Выделение митохондрий из корней 5-суточных проростков осуществляли по методу [10] в нашей модификации, которая в основном заключалась в составах сред выделения митохондрий, а также сокращении общего времени выделения, которое в нашем случае не превышало 40 мин.

Поглощение кислорода митохондриальной фракцией измеряли полярографически, используя электрод конструкции Шольца и Островского [11]. Реакционная среда (1 мл) содержала 0,4 М сахарозу, 20 мМ трис-НСI-буфер (рН 7,4), 5 мМ MgCl, 10 мМ К-РО₄, 0,1% обез-

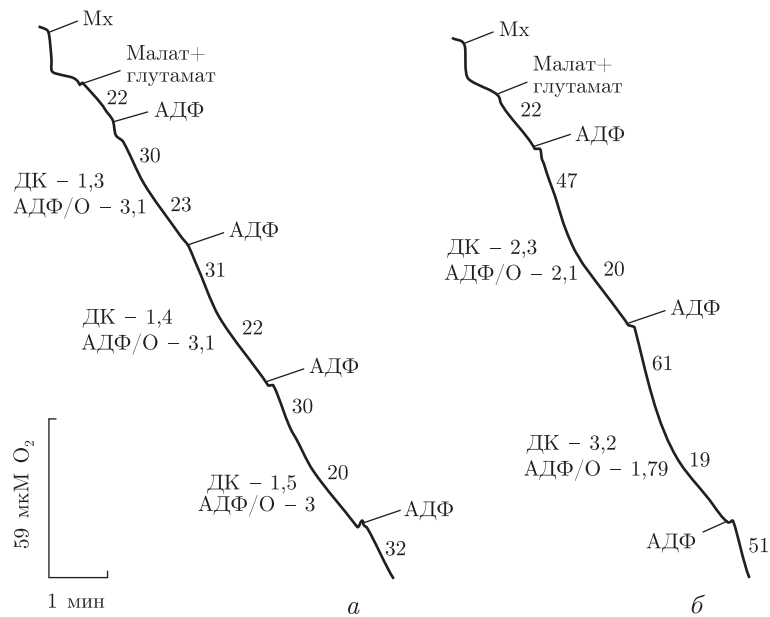


Рис. 1. Полярографические кривые поглощения кислорода при окислении малата + глутамата митохондриями в контроле (а) и после клиностаტიрования (б). В ячейку дополнительно к компонентам реакционной среды, описанной в методике, вносили (указано линиями) суспензию митохондрий (Мх, 0,5–0,7 мг белка), 10 мМ малата, 18 мМ глутамата, 110 мкМ АДФ. Цифры у кривых — скорость поглощения кислорода (нмоль $\text{O}_2/(\text{мг} \cdot \text{мин})$)

жиренный бычий сывороточный альбумин (БСА). Исследовали окисление малата и НАДН как экзогенных субстратов для митохондриального окисления, последовательно внося в инкубационную среду суспензию митохондрий (0,3–0,7 мг белка), один из перечисленных субстратов и АДФ, который вносили повторно в ячейку после его израсходования. Скорость поглощения кислорода в состояниях 3 (V_3) и 4 (V_4) измеряли по Chance и Williams [12], где V_3 — активное (фосфорилирующее) окисление субстратов митохондриями в присутствии АДФ, которое переходит в состояние V_4 после истощения АДФ в ходе синтеза АТФ. Также рассчитывали величину дыхательного контроля (ДК), как отношение V_3/V_4 , которое характеризует степень сопряженности процессов окисления и фосфорилирования, и отношения АДФ/О, показателя эффективности (КПД) процесса окислительного фосфорилирования [12]. Количество белка определяли по методу Лоури [13], используя БСА в качестве стандарта.

Результаты исследования и их обсуждение. Согласно полученным данным, имеют место некоторые статистически значимые различия в характере дыхания митохондрий при окислении малата и экзогенного НАДН в экспериментальных условиях. Как следует из рис. 1, при 5-суточном клиностаტიровании повышалась скорость активного (фосфорилирующего) окисления субстрата (состояние 3). Кроме того, при окислении малата+глутамата увеличивалась величина ДК при второй добавке АДФ от 1,4 до 3,2 соответственно в контроле и после клиностаტიрования. Наблюдаемое также снижение отношения АДФ/О, по-видимому, не приводит к снижению скорости синтеза АТФ, поскольку в данном случае оно компенсируется увеличением скорости окисления субстрата в состоянии 3.

Для митохондрий 5-суточных зародышевых корней гороха характерна высокая скорость окисления экзогенного НАДН в состоянии 3 (рис. 2) по сравнению с другими субстрата-

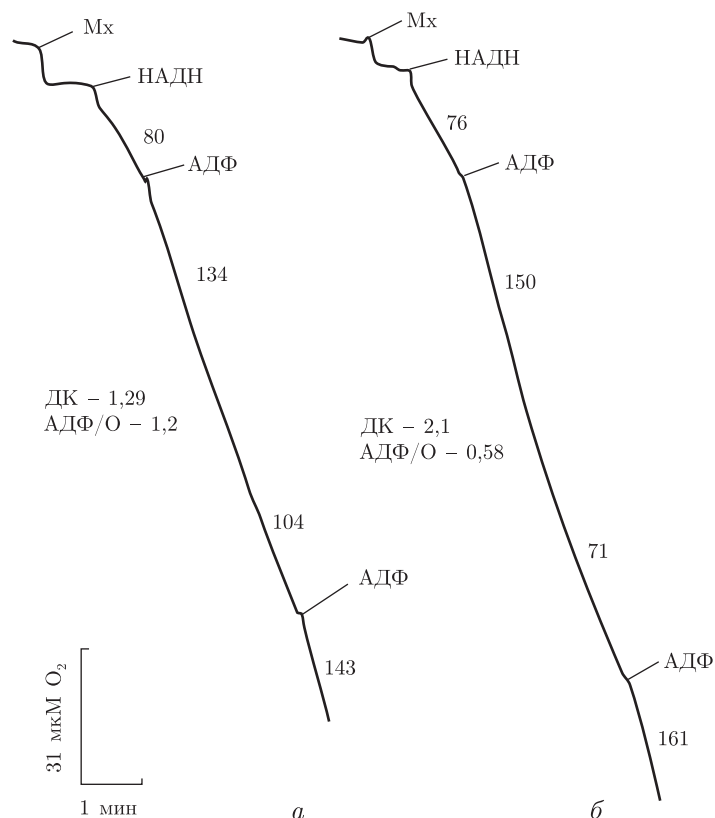


Рис. 2. Полярографические кривые поглощения кислорода при окислении экзогенного НАДН митохондриями в контроле (а) и после клиностативирования (б). В ячейку дополнительно к компонентам реакционной среды, описанной в методике, вносили (указано линиями) суспензию митохондрий (Мх, 0,3–0,5 мг белка), 10 мМ НАДН, 110 мкМ АДФ. Цифры у кривых — скорость поглощения кислорода (нмоль O_2 /(мг · мин))

ми митохондриального окисления. Также характерны закономерно невысокие значения ДК и АДФ/О в процессе окисления этого субстрата. Под воздействием клиностативирования наблюдаются те же тенденции, что и при окислении малата + глутамата, хотя они выражены в меньшей степени.

Существует малое количество данных относительно энергетических аспектов функционирования растительных митохондрий в условиях микрогравитации и клиностативирования. При изучении дыхательной активности митохондрий корней кукурузы в условиях клиностативирования, которые несколько отличались от использованных нами, не наблюдалось каких-либо значимых отличий в скорости окисления различных субстратов между контрольными и опытными образцами [14]. Однако низкие скорости окисления субстратов митохондриями, а также очень низкие показатели ДК в контроле могут свидетельствовать о существенном подавлении метаболической активности митохондрий в процессе их выделения. Имеются и другие данные, которые можно сопоставить с полученными нами. Так, при исследовании уровня дыхания клеток водоросли *Chlorella* было показано, что клиностативирование вызывало повышение уровня поглощения кислорода на всех фазах роста культуры клеток, что также коррелировало с ультраструктурными изменениями митохондрий [15].

Таким образом, полученные нами результаты четко свидетельствуют о том, что клиностативирование не оказывает сколько-нибудь заметного негативного влияния на окисление

субстратов, функционирование электрон-транспортной цепи и фосфорилирующую активность митохондрий корней гороха, иными словами, не препятствует выполнению митохондриями своих основных физиологических функций. Вместе с тем наблюдаемые изменения, на наш взгляд, заключаются не в общей стимуляции окислительной активности митохондрий и увеличении продукции АТФ, а в регуляции электрон-транспортной цепи митохондрий, что позволяет обеспечить постоянный уровень АТФ, необходимый для полноценного функционирования клеток в условиях клиностатирования. Конечно, данное предположение требует более детального анализа биоэнергетических процессов растительных митохондрий в условиях клиностатирования и, что более важно, в условиях реальной микрогравитации. Представляют несомненный интерес явные различия в действии микрогравитации на функционирование митохондрий в клетках растений и животных, а также механизмы, которые позволяют растительным митохондриям и клеткам в целом избегать столь негативных последствий воздействия микрогравитации.

1. *Philpott D. E., Popova I. A., Kato K. et al.* Morphological and biochemical examination of Cosmos 1887 rat heart tissue: Part I – Ultrastructure // *FASEB J.* – 1990. – **4**, No 1. – P. 73–78.
2. *Yang H., Bhat G. K., Sridaran R.* Clinostat Rotation Induces Apoptosis in Luteal Cells of the Pregnant Rat // *Biol. Reprod.* – 2002. – **66**, No 1. – P. 770–777.
3. *Degan P., Sancandi M., Zunino A. et al.* Exposure of human lymphocytes and lymphoblastoid cells to simulated microgravity strongly affects energy metabolism and DNA repair // *J. Cell. Biochem.* – 2004. – **94**, No 3. – P. 460–469.
4. *Nikawa T., Ishidoh K., Hirasaka K. et al.* Skeletal muscle gene expression in spaceflown rats // *FASEB J.* – 2004. – **18**, No 3. – P. 522–524.
5. *Maccarrone M., Battista N., Meloni M. et al.* Creating conditions similar to those that occur during exposure of cells to microgravity induces apoptosis in human lymphocytes by 5-lipoxygenase-mediated mitochondrial uncoupling and cytochrome c release // *J. Leukoc. Biol.* – 2003. – **73**, No 4. – P. 472–481.
6. *Slocum R. D., Gaynor J. J., Galston A. W.* Cytological and ultrastructural studies on root tissues // *Ann. Bot.* – 1984. – **54**, No 2. – P. 65–76.
7. *Sytnik K. M., Popova A. F.* Changes in plant mitochondria ultrastructure and respiration intensity in altered gravity // *J. Gravit. Physiol.* – 1998. – **5**, No 1. – P. 169–170.
8. *Kordyum E. L.* Biology of plant cell microgravity and under clinostating // *Int. Rev. Cytology.* – 1997. – **171**. – P. 1–72.
9. *Бриков В. О.* Ультраструктура митохондрий у клітинах різних ростових зон кореня *Pisum sativum* L. при кліностауванні // *Укр. ботан. журн.* – 2009. – **66**, № 5. – С. 722–729.
10. *Генерозова И. П., Маевская С. Н., Шугаев А. Г.* Ингибирование метаболической активности митохондрий этиолированных проростков гороха, подвергнутых водному стрессу // *Физиология растений.* – 2009. – **56**, № 1. – С. 1–8.
11. *Шольц К. Ф., Островский Д. Н.* Ячейка для амперометрического определения кислорода // *Методы современной биохимии* / Под ред. В. Л. Креговича. – Москва: Наука, 1975. – С. 52–58.
12. *Chance B., Williams G. R.* The respiratory chain and oxidative phosphorylation // *Adv. Enzymol.* – 1956. – **17**, No 1. – P. 65–134.
13. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – **193**. – P. 265–275.
14. *Таирбеков М. Г., Маилян Э. С., Розов А. Н.* Дыхательная активность митохондрий в клетках корней кукурузы, выращенных в условиях измененной силы тяжести // *Докл. АН СССР.* – 1978. – **241**, № 5. – С. 238–241.
15. *Попова А. Ф.* Уровень дыхания и ультраструктура клеток *Chlorella* при длительном клиностатировании // *Доп. НАН України.* – 1999. – № 5. – С. 183–187.

Институт ботаники им. М. Г. Холодного
НАН Украины, Киев
Учреждение РАН Институт физиологии растений
им. К. А. Тимирязева, Москва

Поступило в редакцию 27.12.2010

V. O. Brykov, I. P. Generozova, A. G. Shugaev,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine **E. L. Kordyum**

Metabolic activity of pea root mitochondria under simulated microgravity conditions

The effect of clinorotation on the respiration of mitochondria isolated from roots of pea 5-day-old seedlings has been examined. An increase in the rate of oxidation of malate and NADH in state 3 is detected. A respiratory control ratio is also increased simultaneously with a decrease in the efficiency of oxidative phosphorylation. Such character of mitochondrial respiration under simulated microgravity is supposed to be a consequence of the adaptation to these conditions.