

УДК 581.1

УЧАСТИЕ ДИССИПАТИВНЫХ СИСТЕМ В КОНТРОЛЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЫХАНИЯ В МИТОХОНДРИЯХ ЭТИОЛИРОВАННЫХ ПРОРОСТКОВ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ

© 2011 г. **Й. Р. Абдрахимова***, **И. М. Андреев****, **А. Г. Шугаев****

*Биолого-почвенный факультет Казанского федерального (Приволжского) университета, Казань

**Учреждение Российской академии наук Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, Москва

Поступила в редакцию 13.10.2010 г.

Исследовано влияние цианид-резистентной альтернативной оксидазы (АО) и модуляторов активности разобщающих белков (PUMP) на скорость дыхания и генерацию трансмембранного электрического потенциала ($\Delta\psi$) при окислении различных субстратов митохондриями этиолированных колосптилей озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). Митохондрии пшеницы характеризовались достаточно высокой эффективностью процесса окислительного фосфорилирования при окислении малата и сукцината (высокими значениями ДК по Чансу, отношения АДФ/О и скорости синтеза АТФ), которая однако в значительной степени модулировалась активностью диссипативных систем. С использованием сафранина выявлено частичное рассеивание $\Delta\psi$ при действии ингибиторов цитохромного пути (цианида, антимицина А) на окисление малата и наличие компенсаторного механизма по его поддержанию при функционировании АО. Установлена превалирующая роль комплекса I электрон-транспортной цепи в поддержании $\Delta\psi$ и синтеза АТФ при функционировании АО на фоне ингибирования переноса электронов по цитохромному пути. Изучено влияние активатора PUMP – линолевой кислоты (ЛК) в физиологически низких концентрациях ($4 \times 10 \mu\text{M}$) на дыхание и генерацию $\Delta\psi$ митохондриями. Показано, что разобщающий эффект ЛК, который выявлялся по активации дыхания в состоянии 4 и рассеиванию $\Delta\psi$, снимался БСА, но не пуриновыми нуклеотидами. Обнаружено также, что разобщающее действие ЛК сопровождалось обратимым подавлением активности АО. Полученные результаты обсуждаются исходя из возможной физиологической роли энерго-диссипативных систем митохондрий в регуляции процесса запасаания энергии в растительных клетках в стрессовых условиях.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* – митохондрии – мембранный потенциал – субстраты окисления – ингибиторы дыхания – линолевая кислота

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время отмечается повышение интереса к изучению энерго-диссипативных систем митохондрий растений, функционирование которых снижает энергетическую эффективность процесса окислительного фосфорилирования путем рассеивания в виде тепла части энергии, генерируемой электрон-транспортной цепью (ЭТЦ), как до, так и после преобразования ее в энергию трансмембранного протонного градиента ($\Delta\mu\text{H}^+$). Наряду с исследованием альтернативных путей

переноса электронов, в первую очередь, CN-резистентной оксидазы (АО), шунтирующей два из трех пунктов энергетического сопряжения в ЭТЦ [1, 2], большое внимание уделяется изучению термогенин-подобных разобщающих белков (PUMP), способных существенно увеличить протонную проводимость внутренней мембраны митохондрий и, тем самым, приводить к снижению на ней мембранного потенциала ($\Delta\psi$) [3, 4]. Учитывая широкое распространение АО и PUMP, представляется важным выяснение физиологической роли этих систем в нетермогенных тканях растений. Постулируется, в частности, что диссипативные системы функционируют как “мягкие” разобщители, контролируемо снижающие величину $\Delta\psi$ и зависящую от нее скорость образования активных форм кислорода (АФК), обладающих токсическим действием на мембраны, белки и другие полимеры клетки и самих митохондрий [5]. Это подтверждается в основном экспериментальными данными о повышении активности

Сокращения: АО – альтернативная оксидаза; ДК – дыхательный контроль; ЛК – линолевая кислота; СГК – салицилгидроксамовая кислота; СЖК – свободные жирные кислоты; СКФ – скорость фосфорилирования; ЦРД – цианид-резистентное дыхание; $\Delta\psi$ – мембранный потенциал; FCCP – карбонилцианид-(*n*)-трифторметоксибензилгидразон; PUMP – разобщающие белки митохондрий растений.

Адрес для корреспонденции: Абдрахимова Йолдыз Раисовна. 420008 Казань, ул. Кремлевская, 18. Казанский федеральный (Приволжский) университет. Факс: 007 (843) 238-71-21; электронная почта: yoldez@mail.ru

этих систем под влиянием экзогенных АФК, а также в условиях абиотического стресса и сопровождающего его окислительного стресса [2, 3, 6–9]. Кроме того, в последнее время АО отводится важная роль в оптимизации дыхательного метаболизма в ходе роста и развития растений, его интеграции с фотосинтезом и другими важнейшими метаболическими процессами [2, 10, 11]. Вместе с тем, следует отметить, что большинство гипотез, касающихся физиологической роли АО, PUMP и других диссипативных систем в митохондриях растений, нуждается в дополнительной экспериментальной проверке.

Хотя в последние годы достигнуты значительные успехи в молекулярной идентификации рассматриваемых диссипативных систем, идентификации генов, кодирующих соответствующие им белки, а также в выяснении факторов, контролируемых их функциональную активность, многие аспекты их функционирования остаются еще неясными [10, 12]. В частности, открытыми остаются вопросы о том, все ли факторы эндогенной природы, участвующие в активации/инактивации таких систем, выявлены к настоящему времени, и как осуществляется их взаимодействие и координация их функциональных активностей в ходе регуляции энергетической эффективности дыхания митохондрий.

Исследования диссипативных систем в митохондриях растений проводятся в основном на уровне изолированных органелл, и выявление их действия часто осложняется тем обстоятельством, что оно требует оптимизации условий выделения этих органелл и анализа их функциональной активности. В настоящей работе, проведенной на митохондриях, выделенных из этиолированных проростков озимой пшеницы в условиях, которые были тщательно оптимизированы, мы попытались оценить влияние различных диссипативных систем на процесс окислительного фосфорилирования и генерацию мембранного потенциала.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследований служили 3-дневные этиолированные проростки мягкой пшеницы озимой расы (*Triticum aestivum* L., сорт Мироновская 808), выращенные гидропонным способом на водопроводной воде при комнатной температуре.

Митохондрии выделяли по методу Войникова [13] в нашей модификации. Побеги (колеоптили с зародышевыми листьями) длиной 1.5–2.0 см (15–20 г) предварительно охлаждали, нарезали и растирали в ступке со средой выделения в соотношении не менее 1 : 4 со средой выделения (гомогенизации), содержащей 0.3 М сахарозу, 18 мМ K_2HPO_4 (pH 7.9), 1 мМ MgCl_2 , 5 мМ ЭДТА, 5 мМ

дителиотрейтол (ДДТ) и 0.1% бычий сывороточный альбумин (БСА), свободный от жирных кислот (ЖК). Гомогенат фильтровали через бязь и центрифугировали при 8000 g в течение 5 мин. Для осаждения митохондрий полученный супернатант центрифугировали при 20000 g в течение 4 мин. Выделенные митохондрии ресуспендировали в малом объеме среды, содержащей 0.3 М сахарозу, 18 мМ K_2HPO_4 (pH 7.2) и 0.1% БСА, свободный от ЖК. Суспензию митохондрий хранили на льду. Все операции проводили в холодной комнате при 4–5°C.

За генерацией $\Delta\psi$ следили по изменению разности поглощения при 511 и 533 нм ($\Delta A_{511-533}$) сафранина О по методу Moore и Bonner [14] на спектрофотометре Hitachi-557 (Япония). Среда инкубации (2 мл) содержала: 0.3 М сахарозу, 18 мМ K_2HPO_4 (pH 7.2), 1 мМ MgCl_2 , 5 мМ ЭДТА, 5 мкМ сафранин О и 0.2 мг/мл митохондриального белка. В большинстве случаев среда инкубации содержала 0.1% БСА, за исключением опытов с активацией PUMP. Активацию PUMP линолевой кислотой (ЛК) проводили в присутствии 10 мкМ олигомицина и 25 мкМ атрактилозида, исключив из состава реакционной среды БСА.

Определение скорости поглощения кислорода митохондриями проводили амперометрически, используя полярограф LP-7 (Чехия) и кислородный электрод [15] при 25°C. Среда инкубации (1 мл) содержала 0.3 М сахарозу, 18 мМ K_2HPO_4 (pH 7.2), 1 мМ MgCl_2 , 5 мМ ЭДТА, 0.1% БСА, а также оптимальное количество (0.4–0.5 мг) митохондриального белка. Скорость дыхания в состоянии 3 и 4, величину отношения АДФ/О, коэффициент дыхательного контроля (ДК) и скорость фосфорилирования (СКФ) рассчитывали, согласно Chance и Williams [16]. Для ингибирования основного (цитохромного) дыхания использовали 0.5–2.0 мМ KCN или 3 мкМ антимицин А, альтернативного (цианид-резистентного) – 3 мМ салицилгидроксамовую кислоту (СГК). Содержание митохондриального белка в пробах определяли по методу Lowry с БСА в качестве стандарта.

Каждый опыт проводили в 4–5 биологических и 2–3 аналитических повторностях. На рисунках представлены результаты характерных опытов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика функциональной активности изолированных органелл

На рис. 1 приведены типичные полярографические кривые, отражающие кинетику поглощения кислорода митохондриями этиолированных проростков озимой пшеницы при окислении ими малата или сукцината в присутствии глутамата. Можно видеть, что выделенные митохондрии характеризуются достаточно интенсивным дыхани-

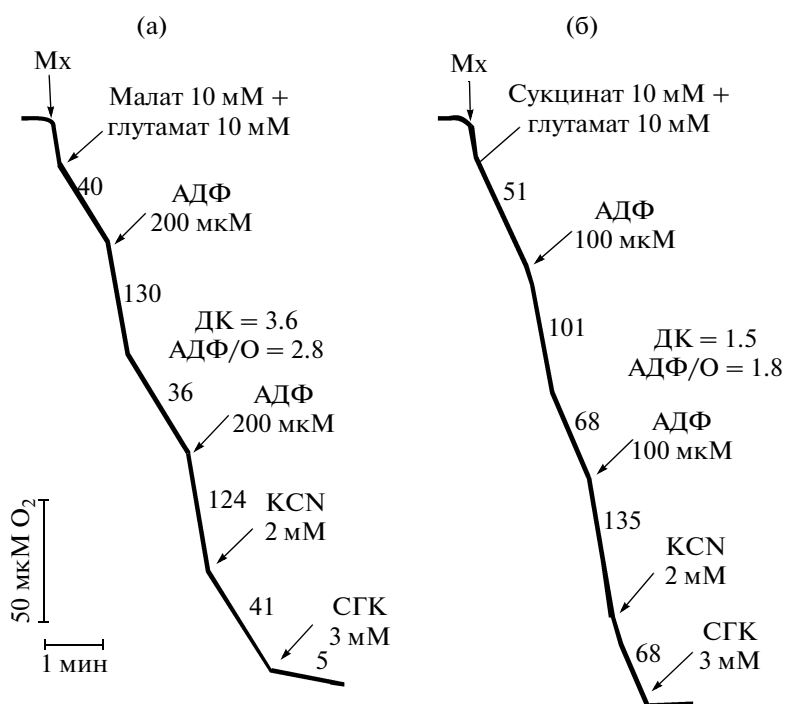


Рис. 1. Полярографические кривые поглощения кислорода при окислении малата (а) и сукцината (б) митохондриями, выделенными из этиолированных проростков озимой пшеницы.

Условия измерений описаны в разделе МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Митохондрии (Mx) добавляли в среду (pH 7.2), содержащую 0.3 M сахарозу, 18 мМ KН₂РO₄, 1 мМ MgCl₂, 5 мМ ЭДТА и 0.1% БСА. Цифры около кривых – скорость поглощения кислорода, нмоль O₂/(мг белка мин).

ем, которое существенно стимулируется в присутствии АДФ (состояние 3), а также обнаруживает значительную величину ДК по Чансу, особенно при окислении НАД-зависимых субстратов.

Как следует из данных, приведенных на рис. 1, митохондрии, выделенные из этиолированных проростков, обнаруживали выраженную способность к цианид-резистентному дыханию (ЦРД), которое практически полностью подавлялось салицилгидроксамовой кислотой (СГК), специфическим ингибитором АО. Согласно нашим оценкам, максимальная активность АО при окислении митохондриями малата и сукцината составляла 40 и 70 нмоль O₂/(мг белка мин) соответственно. Следует также отметить, что такая достаточно высокая активность АО выявлялась в исследованных органеллах только после включения 5 мМ ДТТ в среду гомогенизации, причем скорость ЦРД оставалась практически неизменной при добавлении ДТТ как в среду промывания выделенных митохондрий, так и в инкубационную смесь, в которой тестировали их функциональную активность.

Действие дыхательных ингибиторов на генерацию Δψ и синтез АТФ митохондриями проростков озимой пшеницы

Высокая функциональная активность изолированных органелл подтверждается и их способностью к быстрой генерации Δψ на внутренней мембране при окислении дыхательных субстратов, в частности, малата (рис. 2). Обращают на себя внимание высокая скорость этого процесса и достигаемая значительная величина (амплитуда) Δψ, отражаемая в существенном увеличении абсорбционного сигнала сафранина, которая стабильно сохранялась в течение длительного времени. Данные, представленные на рис. 2, показывают также, что добавление АДФ к митохондриям инициировало некоторое временное снижение Δψ, который в последующем восстанавливался до своего исходного значения после исчерпания АДФ в процессе окислительного фосфорилирования. Можно также видеть, что степень и длительность деполяризации Δψ, запускаемой АДФ, прямо зависели от его концентрации. Вместе с тем, наблюдаемое действие АДФ исчезало в присутствии олигомицина, ингибитора митохондриальной АТФ-синтетазы (данные не приведены).

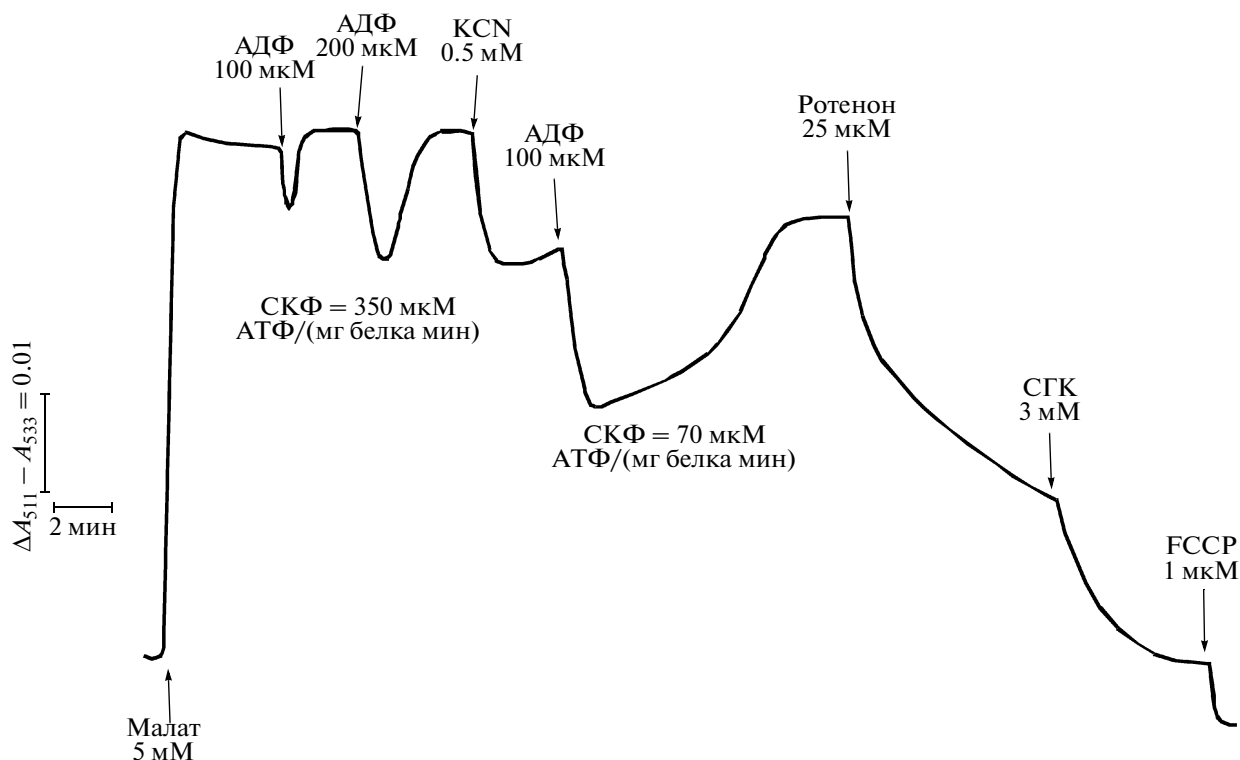


Рис. 2. Генерация мембранного потенциала на внутренней мембране митохондрий проростков пшеницы при окислении малаата и его деполяризация при внесении АДФ и ингибиторов ЭТЦ. Условия измерений – в разделе МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

Далее было обнаружено, что добавление к суспензии митохондрий цианида в концентрации, достаточной для полного подавления активности цитохромоксидазы, инициировало лишь небольшое снижение величины $\Delta\psi$ (рис. 2). Важно, что при этом способность митохондрий к окислительному фосфорилированию сохранялась, о чем свидетельствовало обратимое снижение $\Delta\psi$ в ответ на добавление к ним АДФ (рис. 2). Скорость фосфорилирования, рассчитанная по наблюдаемым изменениям $\Delta\psi$, составляла приблизительно 70 нмоль АТФ/(мг белка мин), что соответствовало более 20% от скорости синтеза АТФ в отсутствие цианида. Последующее добавление к митохондриям ротенона приводило уже к существенному снижению величины $\Delta\psi$, указывая на доминирующую роль ротенон-чувствительной НАД·Н-дегидрогеназы (комплекса I) в поддержании $\Delta\psi$ (рис. 2). Следует также отметить, что во многом подобная картина изменений $\Delta\psi$ наблюдалась нами и при действии на митохондрии проростков пшеницы антимицина А, ингибирующего активность цитохромного пути на уровне комплекса III (данные не приведены).

Как уже отмечалось выше, скорость ЦРД в митохондриях проростков пшеницы существенно зависела от природы дыхательного субстрата. В свете этих данных представлялось необходимым

выяснить чувствительность процесса генерации $\Delta\psi$ митохондриями, окисляющими малаат или сукцинат, к ингибиторам цитохромного и альтернативного путей переноса электронов. Как показано на рис. 3, хотя почти полное подавление генерации $\Delta\psi$ митохондриями, окисляющими сукцинат, имело место под действием ингибиторов цитохромного пути (антимицина А или цианида), значительное обращение этого процесса наблюдалось после добавления к ним НАД-зависимого субстрата (малаата), и оно также полностью снималось в присутствии СКГ. Этот результат еще раз подтверждает важную роль комплекса I в поддержании $\Delta\psi$ в условиях торможения цитохромного пути окисления и функционирования АО. Важно, что при этом окисление малаата в состоянии 4 (в отсутствие АДФ) происходило при более низкой величине $\Delta\psi$, что может иметь важное значение для предотвращения образования АФК митохондриями (см. ОБСУЖДЕНИЕ).

Чувствительность процесса генерации $\Delta\psi$ митохондриями проростков озимой пшеницы к модуляторам активности разобщающих белков

На основании результатов, описанных выше, представлялось необходимым выяснить также, участвуют ли PUMP в контроле энергетической

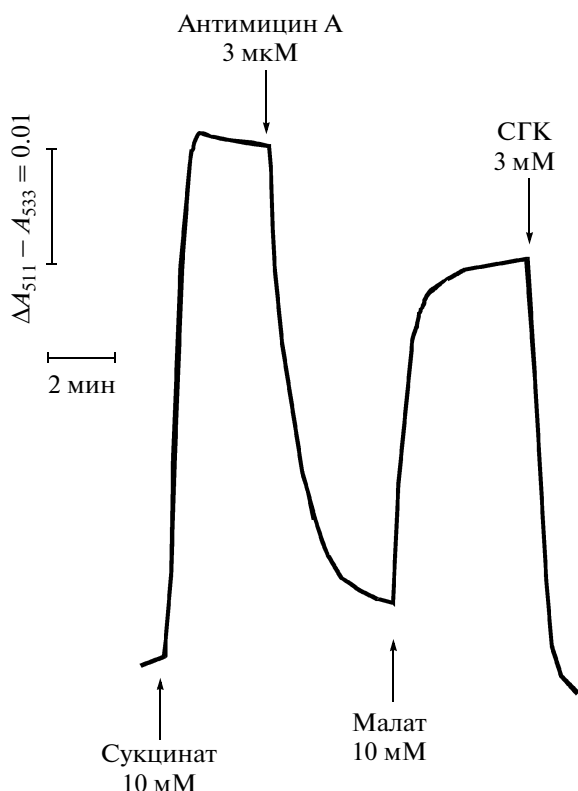


Рис. 3. Способность окисления различных дыхательных субстратов поддерживать генерацию мембранного потенциала при ингибировании цитохромного пути.

Условия измерений – в разделе МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

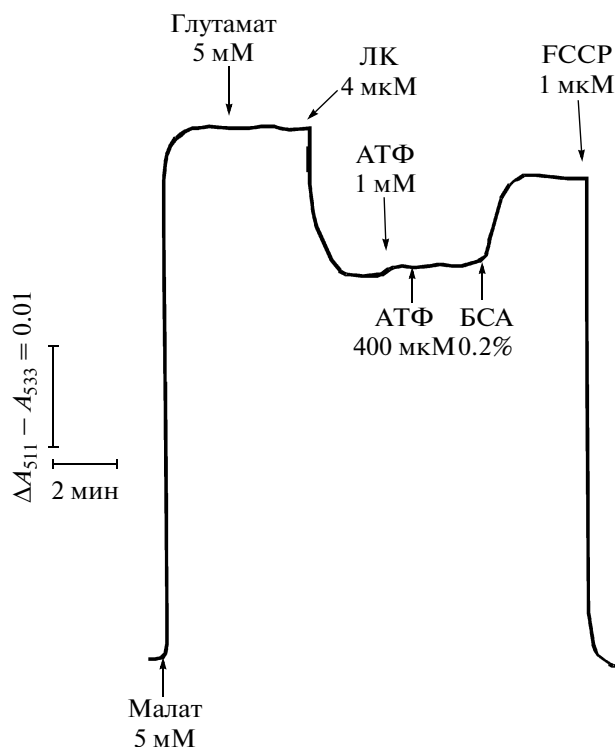


Рис. 4. Разобшающее действие экзогенной линолевой кислоты на генерацию мембранного потенциала при окислении малата митохондриями проростков пшеницы и его обращение в присутствии БСА.

Среда инкубации (pH 7.2) митохондрий содержала 0.3 М сахарозу, 18 мМ K_2HPO_4 , 1 мМ MgCl_2 , 5 мМ ЭДТА, 5 мкМ сафранин, 10 мкМ олигомицин и 25 мкМ атрактилозид; из состава среды исключен БСА.

эффективности митохондриального дыхания. С этой целью мы протестировали действие ЛК, известного потенциального стимулятора активности таких белков, на скорость дыхания митохондрий и генерацию $\Delta\psi$. Эти эксперименты были проведены в присутствии олигомицина, а также атрактилазида, ингибиторов АТФ-синтетазы и АДФ/АТФ-антипортера в митохондриальной мембране, соответственно, чтобы исключить возможное участие последнего в трансмембранном переносе ЖК [17, 18]. Кроме того, из состава реакционной среды был исключен БСА, который способен подавлять активность разобшающих белков путем связывания свободных жирных кислот (СЖК).

На рис. 4. показан эффект экзогенной ЛК, взятой в низкой, физиологической концентрации (4 мкМ), на величину $\Delta\psi$ митохондрий, окисляющих малат. Наблюдаемое здесь снижение $\Delta\psi$ зависело от концентрации добавленной ЛК и, в отличие от действия карбонилцианид-(*n*)-трифторметоксифенилгидразона (FCCP), было обратимым. Добавление пуриновых нуклеотидов (АТФ, АДФ, ГТФ) к митохондриям, испытывающим действие ЛК, не

оказывало заметного влияния на величину $\Delta\psi$. Напротив, добавление к органеллам БСА инициировало ясно выраженный ре-сопрягающий эффект (рис. 4).

Согласно данным полярографического анализа, стимуляция скорости дыхания митохондрий, наблюдаемая в присутствии ЛК, оказалась сравнимой с ускорением этого процесса, вызываемым FCCP, причем эффект ЛК был обратимым и полностью снимался в результате последующего добавления к митохондриям БСА (рис. 5). В отличие от БСА, другой известный ингибитор разобшающих белков в митохондриях растений, АТФ, практически не оказывал влияния на действие ЛК. Оценка прироста скорости дыхания митохондрий за счет активации PUMP, проведенная, как описано в [7], по разнице между величинами данного параметра в присутствии их активатора (ЛК) и ингибиторов (БСА + пуриновые нуклеотиды), показала, что для митохондрий этиолированных проростков пшеницы при окислении малата она составляет 20 нмоль O_2 /(мг белка мин) (рис. 5а). Одновременно вклад ЦРД в общую скорость потребления O_2 митохондриями возрастал с

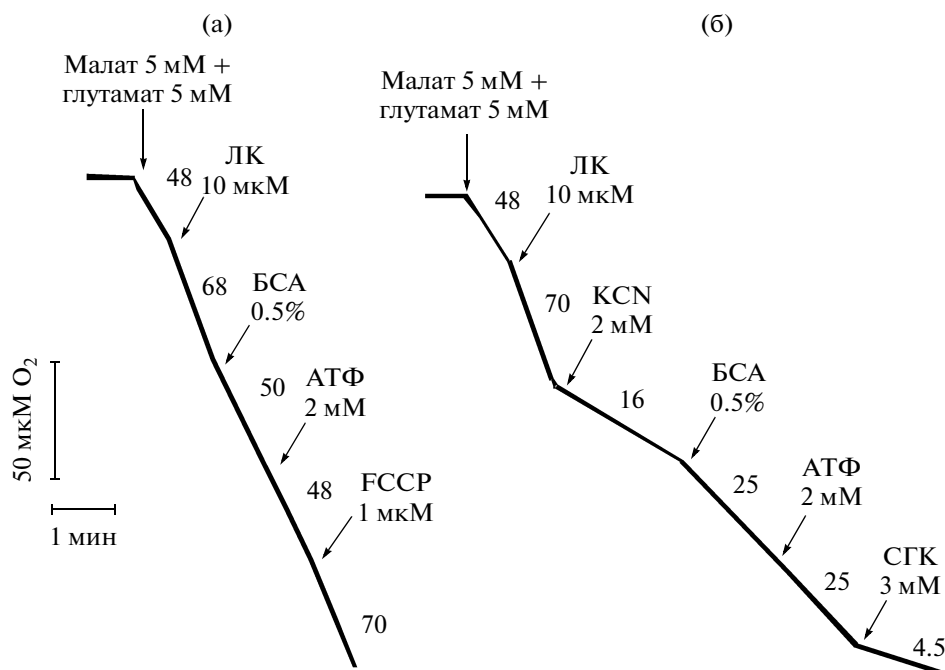


Рис. 5. Влияние линолевой кислоты на скорость общего (а) и цианид-резистентного (б) дыхания митохондрий. Условия измерений, что и на рис. 4. Цифры около кривых – скорость поглощения кислорода, $\text{нмоль O}_2/(\text{мг белка мин})$.

23% в присутствии ЛК до 36% после подавления активности разобщающих белков (рис. 5б), приближаясь в этих условиях к своей исходной величине, наблюдаемой в отсутствие ЛК (рис. 1а). Этот факт указывает на то, что разобщающий эффект ЛК сопровождался обратимым подавлением активности АО, что было показано ранее на митохондриях, выделенных из других растительных объектов [19].

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют, что митохондрии этиолированных проростков озимой пшеницы характеризуются высокой активностью альтернативной CN-резистентной оксидазы. Нами выявлена максимальная активность АО, которая могла достигать 50% от скорости окисления различных дыхательных субстратов в состоянии 3 (рис. 1). Ранее на митохондриях этиолированных проростков озимой пшеницы того же сорта Мироновская 808, выделенных по сходной методике, было показано, что активность ЦРД при окислении как малата, так и сукцината не превышала 21–23% [20]. Такая разница в оценке мощности ЦРД, по-видимому, была обусловлена присутствием в составе сред выделения митохондрий разных восстанавливающих агентов: более активного ДТТ в данном исследовании по сравнению с ранее использованным цистеином [20].

Известно, что в пост-трансляционной регуляции активности АО важное значение имеет редокс-состояние сульфгидрильно/дисульфидной связи между мономерами АО [1]. Показано, что поддержанию высокоактивной “восстановленной” формы димера АОХ способствует присутствие ДТТ в реакционной среде, либо во всех средах выделения органелл [21]. В наших опытах присутствие 5 мМ ДТТ только в среде гомогенизации было достаточным для поддержания максимальной активности АОХ, а последующее внесение 5 мМ ДТТ в среды ресуспендирования и инкубации митохондрий не имело дополнительного эффекта на величину ЦРД. Таким образом, подбор оптимальных условий выделения органелл, в первую очередь, использование достаточно высокой концентрации восстанавливающих агентов, является необходимым условием для выявления максимальной активности АО в митохондриях проростков пшеницы.

Несмотря на значительные успехи в расшифровке структуры и молекулярных механизмов регуляции активности АО, выяснение ее конкретной физиологической роли в нетермогенных тканях растений только начинается. При “включении” альтернативного пути оказываются не функционирующими два из трех (II и III) пунктов сопряжения дыхательной цепи, поэтому с точки зрения запаса энергии, как в форме АТФ, так и $\Delta\psi$, он считается малоэффективным. Действительно, добавление цианида к выделенным митохондри-

ям растений, в том числе митохондриям пшеницы, сопровождалось, как правило, значительным рассеиванием $\Delta\psi$ [7, 9]. В отличие от этого, в наших опытах цианид-индуцированные изменения $\Delta\psi$ при окислении малата были не столь выражены и сопоставимы с таковым при добавлении АДФ. При этом у митохондрий сохранялась способность, хотя и пониженная, к окислительному фосфорилированию (рис. 2). Ингибитор комплекса I дыхательной цепи – ротенон, вызывал практически полное рассеивание $\Delta\psi$ (рис. 2). Следовательно, в исследованных нами митохондриях озимой пшеницы, при “выключенном” цитохромном пути, функционирование ротенон-чувствительной НАД·Н-дегидрогеназы и высокоактивной АО может поддерживать генерацию $\Delta\psi$ при окислении НАД-зависимых субстратов на достаточно высоком уровне, чтобы частично компенсировать отсутствие активности двух пунктов сопряжения. Как и следовало ожидать, этого не наблюдалось при окислении сукцината, при котором первый пункт сопряжения не функционирует (рис. 3). В данной ситуации добавление в реакционную среду малата вызывало компенсаторное возрастание $\Delta\psi$, которое было чувствительно к СГК (рис. 3). Таким образом, полученные нами результаты являются прямым экспериментальным доказательством способности ЦРД при блокировании цитохромного пути поддерживать генерацию $\Delta\psi$ и синтез АТФ за счет функционирования в этих условиях первого пункта сопряжения (комплекса I) дыхательной цепи. Полученные данные также согласуются с предположением о важной роли альтернативного пути окисления в модуляции синтеза АТФ митохондриями растений [21].

Обращает на себя внимания тот факт, что синтез АТФ при окислении малата с участием комплекса I и АО происходил, при величине (амплитуде) $\Delta\psi$ заметно сниженной, по сравнению с таковой, наблюдаемой при работе основной цитохромной дыхательной цепи (рис. 2). Хотя природа этого феномена остается неизвестной, маловероятно, что он обусловлен разобщающим действием самого KCN, поскольку аналогичный характер изменений $\Delta\psi$ наблюдался в присутствии антимицина А (рис. 3). Учитывая зависимость продукции АФК дыхательной цепью от величины $\Delta\psi$ [5], можно предположить, что функционирование указанного выше альтернативного пути митохондриального окисления будет сопровождаться пониженной скоростью образования АФК. Это может иметь значение для предотвращения возникновения окислительного стресса, например, при действии на растения водного дефицита или пониженной температуры, сопровождающихся торможением цитохромного пути окисления и активацией АО [6]. Таким образом, на основании литературных и полученных нами

данных, можно заключить, что АО по сравнению с известными системами разобщения (PUMP, Рмито $K_{\text{АТФ}}$, анионные каналы) не является только энерго-диссипативной, но, при определенных условиях, играет, по-видимому, важную роль в поддержании генерации $\Delta\psi$ и синтеза АТФ в митохондриях растений. Несомненно, однако, необходимы дополнительные исследования для подтверждения справедливости данной гипотезы.

Как уже отмечалось во ВВЕДЕНИИ, считается, что активация PUMP, например, в условиях окислительного стресса, в присутствии длинноцепочечных ЖК, обеспечивает разобщение процессов окисления и фосфорилирования, вследствие чего снижается образование АФК дыхательной цепью по механизму обратной связи [4]. В опытах с митохондриями озимой пшеницы мы показали, что в присутствии низкой концентрации ЛК заметно увеличивалась скорость дыхания в состоянии 4 (рис. 5) и существенно снижался $\Delta\psi$ при окислении дыхательных субстратов, который восстанавливался после добавки БСА (рис. 4). Эти данные четко указывают на разобщающее действие СЖК, возможно, включающее в себя активность PUMP, из-за присутствия в этих экспериментах атрактилозида, ингибирующего активность переносчика адениновых нуклеотидов, способного также участвовать в разобщающем действии СЖК [18]. Наряду с разобщающим, ЛК оказывала ингибирующее действие на активность АО (рис. 5). Не исключено, что это может отражать действие особого механизма, регулирующего взаимодействие между АО и PUMP в митохондриях растений [19]. Вместе с тем, внесение в реакционную среду АТФ, АДФ и других нуклеотидов, ингибирующих активность разобщающих белков в митохондриях растений, в том числе митохондриях твердой пшеницы [9, 17], не оказывало заметного действия, как на величину $\Delta\psi$ (рис. 4), так и на скорость окисления субстратов в состоянии 4 (рис. 5). Поэтому для доказательства присутствия PUMP в этих митохондриях необходимы дополнительные, более детальные исследования, в частности, с использованием Вестерн-блот анализа.

Следует также отметить, что выявление активности PUMP в изолированных митохондриях растений (и животных) до сих пор представляет собой достаточно сложную проблему. Во-первых, как уже отмечалось, для выявления активности PUMP необходимо поддержание в митохондриях низкого уровня эндогенных СЖК, что достигается внесением БСА. При этом использование неоптимальной (завышенной или заниженной) концентрации БСА приводит к недооценке активности PUMP. Его выявление сильно осложняется также возможностью неспецифического разобщающего действия самих СЖК на дыхание и генерацию $\Delta\psi$ митохондриями без участия разоб-

шающих белков [18]. Наконец, еще одним фактором, затрудняющим трактовку получаемых данных, является значительное изменение чувствительности PUMP к пуриновым нуклеотидам при изменении функционального состояния митохондрий [18, 22], а также ее существенная вариабельность в митохондриях, выделенных из различных растительных объектов [23]. Например, упомянутый выше ГТФ, являющийся специфическим ингибитором разобщающих белков в митохондриях животных, не всегда оказывает аналогичное действие на PUMP, активность которого в митохондриях проростков твердой пшеницы сильнее ингибируется АТФ [9, 17] или вообще не ингибируется пуриновыми нуклеотидами в митохондриях, изолированных из термогенных початков *Symplocarpus renifolius* [24].

В заключение необходимо подчеркнуть, что в последнее время изучение механизмов регуляции запаса энергии в митохондриях животных вновь привлекает пристальное внимание исследователей. При этом особое внимание направлено на обнаружение новых механизмов, регулирующих величину Ду в разных метаболических состояниях, оказывающих влияние на важнейшие функции митохондрий, включая синтез АТФ и генерацию АФК [18, 25]. Для митохондрий растений, оснащенных более разветвленной и гибкой системой шунтов транспорта электронов и механизмов диссипации энергии, вопросы регуляции митохондриального дыхания и трансформации энергии являются еще более острыми и значимыми.

Авторы благодарят проф. Donato Pastore (Университет г. Фоггия, Италия) за ценные предложения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 10-04-00665), а также частично поддержана индивидуальным грантом Правительства и Министерства образования и науки Республики Татарстан, предоставленным для стажировок преподавателей вузов РТ в ведущих научных школах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Van Aken O., Giraud E., Clifton R., Whelan J. Alternative Oxidase: A Target and Regulator of Stress Responses // *Physiol. Plant.* 2009. V. 137. P. 354–361.
2. Vanlerberghe G.C., Cvetkovska M., Wang J. Is the Maintenance of Homeostatic Mitochondrial Signaling during Stress a Physiological Role for Alternative Oxidase // *Physiol. Plant.* 2009. V. 137. P. 392–406.
3. Smith A.O., Ratcliff R.G., Sweetlove L.J. Activation and Function of Mitochondrial Uncoupling Protein in Plants // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 51 944–51 952.
4. Vercesi A.E., Borecky J., Maja I.D., Arruda P., Cuccovia I.M., Chaimovich H. Plant Uncoupling Mitochondrial Proteins // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2006. V. 57. P. 383–404.
5. Skulachev V.P. Membrane-Linked Systems Preventing Superoxide Formation // *BioSci. Rep.* 1997. V. 17. P. 347–366.
6. Wagner A.M., Moore A.L. Structure and Function of the Plant Alternative Oxidase: Its Putative Role in the Oxygen Defence Mechanism // *BioSci. Rep.* 1997. V. 17. P. 319–333.
7. Calegario F.F., Cosso R.G., Fagian M.M., Almeida F.V., Jardim W.F., Jezek P., Arruda P., Vercesi A.E. Stimulation of Potato Tuber Respiration by Cold Stress Is Associated with an Increased Capacity of Both Plant Uncoupling Mitochondrial Protein (PUMP) and Alternative Oxidase // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2003. V. 35. P. 211–220.
8. Clifton R., Lister R., Parker K.L., Sappl P.G., Elhafez D., Millar A.H., Day D.A., Whelan J. Stress-Induced Co-Expression of Alternative Respiratory Chain Components in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Mol. Biol.* 2005. V. 58. P. 193–212.
9. Pastore D., Trono D., Laus M.N., Fonzo N.D., Flagella Z. Possible Plant Mitochondria Involvement in Cell Adaptation to Drought Stress // *J. Exp. Bot.* 2007. V. 58. P. 195–210.
10. Ho L.H.M., Giraud E., Lister R., Thirkettle-Watts D., Low J., Clifton R., Howell K.A., Carrie C., Whelan J. Characterization of the Regulatory and Expression Context of Alternative Oxidase Gene Provides Insights into Cyanide-Insensitive Respiration during Growth and Development // *Plant Physiol.* 2007. V. 143. P. 1519–1533.
11. Noguchi K., Yoshida K. Interaction between Photosynthesis and Respiration in Illuminated Leaves // *Mitochondrion.* 2008. V. 8. P. 87–99.
12. Sluse F.E., Jarmuszkiewicz W., Navet R., Douette P., Mathy G., Sluse-Goffard C.M. Mitochondrial UCPs: New Insights into Regulation and Impact // *Biochim. Biophys. Acta.* 2006. V. 1757. P. 480–485.
13. Войников В.К. К вопросу о выделении интактных растительных митохондрий // *Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. биологических наук.* 1980. № 10. С. 121–126.
14. Moore A.L., Bonner W.D. Measurements of Membrane Potentials in Plant Mitochondria with the Safranin Method // *Plant Physiol.* 1982. V. 70. P. 1271–1276.
15. Шольц К.Ф., Островский Д.Н. Ячейка для амперометрического определения кислорода // *Методы современной биохимии / Под. ред. Кретовича В.Л., Шольца К.Ф. М.: Наука, 1975. С. 52–58.*
16. Chance B., Williams G.R. The Respiratory Chain and Oxidative Phosphorylation // *Adv. Enzymol.* 1956. V. 17. P. 65–134.
17. Pastore D., Fratiani A., di Pede S., Passarella S. Effects of Fatty Acids, Nucleotides and Reactive Oxygen Species on Durum Wheat Mitochondria // *FEBS Lett.* 2000. V. 470. P. 88–92.
18. Мохова Е.Н., Хайлова Л.С. Участие анионных переносчиков внутренней мембраны митохондрий в разобщающем действии жирных кислот // *Биохимия.* 2005. Т. 70. С. 197–202.
19. Sluse F.E., Almeida A.M., Jarmuszkiewicz W., Vercesi A.E. Free Fatty Acids Regulate the Uncoupling

- Protein and Alternative Oxidase Activities in Plant Mitochondria // FEBS Lett. 1998. V. 433. P. 237–240.
20. *Abdrakhimova Y.R., Khokhlova L.P.* Substrate Regulation and Cyanide-Resistance of Mitochondrial Respiratory Chain under Cold Acclimation of Plants // Proc. V Int. Youth Symp. "Plant Metabolism Regulation". Varna, Bulgaria, 1990. P. 368–371.
 21. *McDonald A.E., Sieger S.M., Vanlerberghe G.C.* Methods and Approaches to Study Plant Mitochondrial Alternative Oxidase // *Physiol. Plant.* 2002. V. 116. P. 135–143.
 22. *Navet R., Douette P., Puttine-Marique F., Sluse-Goffard C.M., Jarmuszkiewicz W., Sluse F.E.* Regulation of Uncoupling Protein Activity in Phosphorylating Potato Tuber Mitochondria // FEBS Lett. 2005. V. 579. P. 4437–4442.
 23. *Jezek P., Zackova M., Kosarova J., Rodrigues E.T.S., Madeira V.M.C., Vicente J.F.* Occurrence of Plant-Uncoupling Mitochondrial Protein (PUMP) in Divers Organs and Tissues of Several Plants // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2000. V. 32. P. 549–561.
 24. *Ito-Inaba Y., Hida Y., Ichikawa M., Kato Y., Yamashita T.* Characterization of the Plant Uncoupling Protein, SrUCPA, Expressed in Spadix Mitochondria of the Thermogenic Skunk Cabbage // *J. Exp. Bot.* 2008. V. 59. P. 995–1005.
 25. *Kadenbach B., Ramzan R., Wen L., Vogt S.* New Extension of the Mitchell Theory for Oxidative Phosphorylation in Mitochondria of Living Organisms // *Biochim. Biophys. Acta.* 2010. V. 1800. P. 205–212.