

ЭНЗИМОЛОГИЯ

Б. А. РУБИН и Е. В. АРЦИХОВСКАЯ

**О ЗНАЧЕНИИ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ ДЛЯ НАПРАВЛЕНИЯ ДЕЙСТВИЯ ИНВЕРТАЗЫ В РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКЕ**

(Представлено академиком А. Н. Бахом 10 II 1940)

Согласно концепции, выдвинутой несколько лет тому назад Опариным<sup>(1)</sup>, синтетическое действие в живой растительной клетке способна осуществлять лишь та часть гидролитических ферментов, которая адсорбирована активными поверхностями внутриклеточных структур. Данная точка зрения в настоящее время достаточно прочно обоснована экспериментально в серии работ Опарина и его сотрудников и послужила одновременно руководящей идеей при решении ряда вопросов общепроцессуального значения. Являясь обязательной для проявления ферментами синтетического действия, адсорбция в то же время не исчерпывает всех необходимых для данной цели условий. В частности, не снимается вопрос о роли и значении энергии, потребление которой, как это довольно единодушно сейчас принимается, является одной из наиболее характерных сторон ферментативных синтезов, осуществляющихся в живой ткани.

Несмотря на общепризнанность данного положения, мы все же еще очень далеки от понимания того, какие именно формы энергии используются при ферментативных синтезах и каков механизм ее передачи.

Одним из основных экзотермических процессов, присущих всякой живой клетке, является дыхание. Как показали опыты Daye<sup>(2)</sup> и Molliard<sup>(3)</sup>, во время дыхания в виде тепла освобождается лишь некоторая часть энергии, образующейся при сжигании сахара, вследствие чего эти авторы считали вероятным, что оставшая часть энергии потребляется внутри клетки на какие-то эндотермические реакции.

Многочисленные указания на то, что потребителем энергии, образующейся при дыхании, как и вообще при ряде других окислительных процессов, как раз и являются ферментные синтезы, могут быть найдены в ряде работ. Из исследований позднейшего времени отметим хотя бы наблюдения Рубина и Арциховской<sup>(4)</sup>, Рубина и Лутиковой<sup>(5)</sup>, Арциховской и Спиридоновой<sup>(6)</sup>, в которых было показано, что формы растений, обладающие повышенной активностью окислительных ферментов и, в частности, более интенсивным дыханием, характеризуются более высоким содержанием веществ со сложными молекулами по отношению к веществам простым (например отношение  $\frac{\text{сахароза}}{\text{монозы}}$  ,  $\frac{\text{белок}}{\text{аминокислоты}}$  ).

В качестве вероятных передатчиков энергии окисляемых веществ для использования при ферментных синтезах привлекли внимание ряда исследователей

дователей обратимые окислительно-восстановительные системы, имеющие в живой клетке, и в первую очередь система цистин  $\rightleftharpoons$  цистеин или (что идентично) окисленный глутатион  $\rightleftharpoons$  восстановленный глутатион. Согласно исследованиям Grassmann (7), Waldschmidt-Leitz (8), Schulze (9), Mothes (10) и ряда других авторов соотношение между окисленной и восстановленной формой глутатиона, отражающее собой величину rH клетки, определяет в свою очередь положение равновесия между синтезирующим и гидролизующим действием протеиназ. Аналогичное предположение было высказано Рубиным и Арциховской (11) по поводу аскорбиновой кислоты. Как показали опыты названных исследователей, инфильтрация витамина С в живую растительную ткань вызывала сдвиги в равновесии между синтезом и гидролизом у инвертазы, причем направление этих смещений и их размеры находились в зависимости как от формы аскорбиновой кислоты, так и от окислительных условий, имеющих в клетке. Эти данные хорошо увязываются с более ранними наблюдениями Рубина и Страичицкого (12), впервые показавших, что инфильтрация аскорбиновой кислоты в живые листья значительно повышает интенсивность дыхания последних.

Все изложенное позволило выдвинуть взгляд на аскорбиновую кислоту как на один из активаторов инвертазы живой клетки\* и заставило одновременно предпринять дальнейшие исследования данной проблемы.

Задача излагаемых ниже опытов состояла в изучении (в динамике) влияния, оказываемого различными окислительно-восстановительными системами как на газовый обмен ткани, так, одновременно, и на равновесие  $\frac{\text{синтез}}{\text{гидролиз}}$  у гидролаз.

Работа осуществлялась следующим образом. В отобранные навески листьев производилась инфильтрация водных растворов ряда веществ, испытываемых как окислительно-восстановительные системы. Контрольные пробы инфильтрировались водой.

После доведения инфильтрированных навесок до первоначального веса они помещались во влажную камеру при 30°. Через соответствующие промежутки времени отбирались пробы, которые поступали для изучения дыхательного газообмена (в приборе Смирнова), а также и для исследования направленности действия фермента.

В связи с принятыми нами интервалами в отборе проб число последних было настолько велико, что мы не имели возможности осуществлять инфильтрацию проб сахарами, как это необходимо в соответствии с методом Курсанова (13), и в силу этого судили об изменениях равновесия фермента по перегруппировкам внутри собственных запасов сахара (отношение  $\frac{\text{биозы}}{\text{монозы}}$ ). Прием этот был предложен Е. В. Арциховской, причем проведенное нами специальное сопоставление его с методом вакуум-инфильтрации показало, как и следовало ожидать, хорошее совпадение. Следует, однако, отметить, что, используя этот прием, мы получаем возможность судить лишь о направлении смещений в равновесии фермента без учета скорости этих превращений как по линии синтеза, так и по линии гидролиза.

Испытанию был подвергнут ряд систем, инфильтрация которых в большинстве случаев производилась как в окисленном, так и в восстановленном виде (аскорбиновая кислота, глутатион, хлорогеновая кислота, метиленовая синька, дихлорфенолиндофенол и некоторые другие).

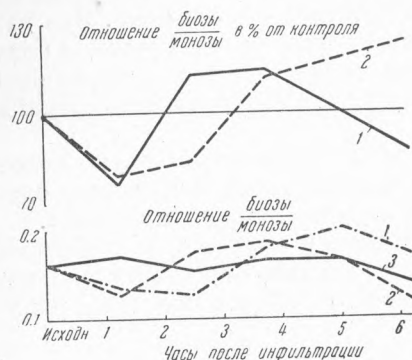
По каждому из испытывавшихся нами веществ было проведено по 3—4 и больше опытов, давших весьма хорошие совпадения результатов. В связи с однотипностью данных, полученных при испытании различных окислительно-восстановительных систем, а также из-за недостатка места мы приводим ниже лишь данные по одному для аскорбиновой кислоты (фиг. 1—2) и глутатиону (фиг. 3—4). И витамин С и глутатион применялись в концентрации 1 мг в 1 мл. Окисление аскорбиновой кислоты осуществлялось с помощью форменных элементов хрена (Гудлет и Кардо-Сысоева).

Как видно из фиг. 1 и 2, формы аскорбиновой кислоты, введенные в ткани, вызывают непосредственно после инфильтрации значительное сниже-

\* Интересно отметить близкую аналогию, которая существует между данной системой и системой цистин-цистеин. Аналогия эта состоит в том, что в обоих случаях регуляторами превращений веществ определенной группы являются соединения, генетически непосредственно с ними связанные (цистеин с белковой молекулой, а витамин С с молекулой сахара).

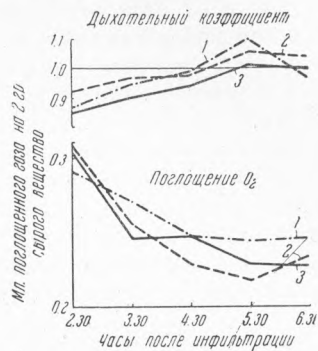
ние отношения  $\frac{\text{сахароза}}{\text{моноза}}$  (1-й час).<sup>7</sup> Затем наблюдается повышение этого отношения, вначале более быстрое для восстановленной формы. Примерно через  $3\frac{1}{2}$ —4 часа действие восстановленной формы ослабевает, кривая же действия дегидроформы к этому времени поднимается выше кривой восстановленной формы. Стимулирование синтеза сахарозы дегидроформой аскорбиновой кислоты достигает к 5 часам величины большей, чем максимальное действие, оказываемое восстановленной формой.

Рассмотренные данные по динамике отношения  $\frac{\text{биозы}}{\text{монозы}}$ , отражающего равновесие между синтезом и гидролизом у сахаразы, находятся в очень хорошем соответствии с результатами изучения газообмена как контрольной, так и инфильтрированной ткани (см. фиг. 2). Инфильтрация аскорбиновой кислоты повышает интенсивность дыхания, которая является



Фиг. 1. Влияние инфильтрации аскорбиновой кислоты на величину отношения  $\frac{\text{биозы}}{\text{монозы}}$  в живой ткани капусты.

— · — · — окисленная аскорбиновая кислота, — — — — — восстановленная аскорбиновая кислота, — — — — — контроль.



Фиг. 2.—Влияние инфильтрации аскорбиновой кислоты на дыхательный газообмен листьев капусты.

— · — · — окисленная аскорбиновая кислота, — — — — — восстановленная аскорбиновая кислота, — — — — — контроль.

сначала более высокой у проб, инфильтрированных восстановленным витамином. Через 3— $3\frac{1}{2}$  часа после инфильтрации дыхание проб с окисленной формой витамина С обгоняет таковое для проб с восстановленной аскорбиновой кислотой. Вызванный последней подъем дыхания удерживается около 4 час., после чего исчезает.

Таким образом в этих опытах в полном соответствии с нашими более ранними наблюдениями (<sup>11</sup>, <sup>12</sup>) показано, что аскорбиновая кислота, инфильтрированная в живую ткань растения, вызывает одновременно: а) усиление дыхания ткани и б) смещение равновесия между биозами и монозами, отвечающего равновесию между синтезом и гидролизом у инвертазы, в сторону синтеза.

Характер хода кривых, отражающих обе группы процессов, позволяет рассматривать эти процессы, как находящиеся в причинной друг от друга зависимости.

Более быстрое после инфильтрации наступление эффекта вызывает восстановленная аскорбиновая кислота, размеры же смещений в сторону синтеза, как и по линии повышения дыхания, оказываются неизменно более высокими у дегидроформы витамина. По истечении известного срока эффект исчезает, причем у гидрированной формы раньше, чем у второй.

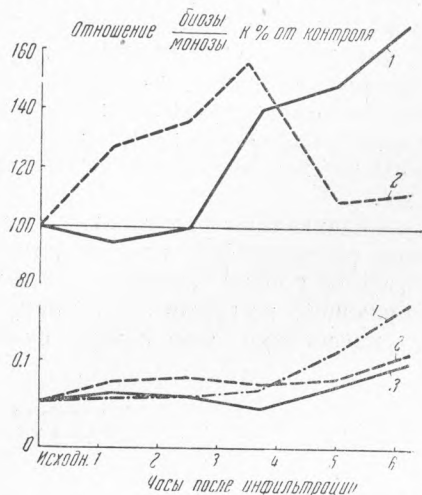
Следует отметить, кроме того, вызываемые аскорбиновой кислотой качественные смещения в дыхании ткани. При инфильтрации витамина С мы неизменно наблюдали повышение величины дыхательного коэффи-

циента, порою весьма значительное. Таким образом аскорбиновая кислота, повидимому, способствует мобилизации внутренних запасов кислорода, имеющих в клетке, обращая его на окисление дыхательного материала.

Инфильтрация глутатиона вызывает, в общем, картину, близкую к только что рассмотренной, за исключением лишь того, что ни восстановленная, ни окисленная форма глутатиона не приводили подобно витамину С к подавлению синтетического действия инвертазы в первый час после инфильтрации их в ткань (фиг. 3 и 4).

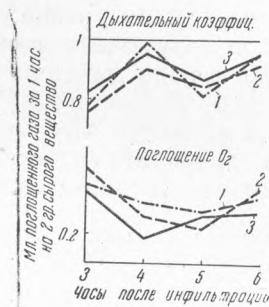
Обе формы глутатиона вызывают в дальнейшем повышение отношения биозы монозы и интенсивности дыхания. Эффект от GS—SG формы наступает позднее, чем от формы GSH, но конечный размер первого значительно выше, чем второго.

В ы в о д ы. Приведенный выше экспериментальный материал свидетельствует о сильном влиянии, которое оказывают окислительно - восстановитель-



Фиг. 3.—Влияние инфильтрации глутатиона на величину отношения биозы монозы в листьях капусты.

..... окисленный глутатион, ----- восстановленный глутатион, ————— контроль.



Фиг. 4.—Влияние инфильтрации глутатиона на дыхательный газообмен листьев капусты

..... окисленный глутатион, ----- восстановленный глутатион, ————— контроль.

ные процессы на работу инвертазы в живой клетке. Всякое изменение интенсивности дыхательного газообмена клетки вызывает смещение в равновесии между синтезом и гидролизом у этого фермента, причем усиленное поглощение кислорода, обычно сопровождающееся соответственно повышенным выделением углекислоты, вызывает усиление синтеза. С ослаблением газообмена синтезирующее действие инвертазы подавляется, что тотчас же находит свое отражение в уменьшении как абсолютных количеств, так и относительного содержания биоз по сравнению с монозами.

Строго согласованные (как во времени, так и в направлении) смещения в работе как окислительного, так и гидролитического аппарата клетки возникают, как мы видели, в результате инфильтрации в последнюю некоторых окислительно-восстановительных систем. Вызываемое инфильтрацией этих систем (могущих служить как донаторами, так и акцепторами водорода) более энергичное вовлечение в обмен молекулярного кислорода приводит к активированию окислительных процессов и соответственному повышению выходов энергии. Последняя (в известной части) и используется для синтезирующего действия инвертазы. Таким образом испытанные нами окислительно-восстановительные системы являются звеньями, связывающими в единую цепь окислительный и гидролитический аппараты клетки.

Остается пока неясным, в какой мере специфично действие той или иной окислительно-восстановительной системы для определенного фермента или группы ферментов, поскольку все эти системы функционально чрезвычайно тесно друг с другом связаны.

Мы видели, далее, что направление действия вещества не зависело от формы, в которой оно вводилось в клетку. Менялись лишь быстрота наступления эффекта и размеры последнего. Более медленное действие окисленных форм, наблюдавшееся в случае всех систем, должно быть объяснено значительно меньшей проницаемостью для них плазмы по сравнению с формами восстановленными. Более же высокие эффекты от окисленных форм связаны, по видимому, с более энергичным повышением pH клетки, вызванным их инфильтрацией.

Независимо от характера системы и формы вещества, в которой производилась инфильтрация, эффекты от них через определенный промежуток времени исчезали. Этот факт может быть объяснен только тем, что обратимость указанных систем ограничена определенными пределами. Благодаря этому в клетке идет постепенное разрушение введенных ивне систем, конечным пунктом которого является восстановление свойственного данной ткани уровня содержания их.

В свете полученных нами материалов значительно расширяются представления о роли дыхательных хромогенов растительной клетки, описанных впервые Палладиным<sup>(15)</sup>. Вещества эти не только активируют дыхание, но и являются передатчиками возникающей во время этого процесса энергии гидролитическим ферментам, способствуя тем самым осуществлению последними синтезам.

Институт биохимии  
Академия Наук СССР

Поступило  
10 II 1940

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> А. И. Опарин, *Ergebnisse der Enzymforschung*, **3**, 57 (1934). <sup>2</sup> L. C. Dayer, цитировано по С. П. Костычеву, *Физиолог. раст.*, **1** (1937). <sup>3</sup> M. Mollard, *C. R. Soc. Biol.*, **87**, 219; *Rev. Gen. de bot.*, **50**, 565 (1922). <sup>4</sup> Б. А. Рубин и Е. В. Арциховская, *Докл. ВАСХНИЛ*, № 1 и 5 (1937). <sup>5</sup> Б. А. Рубин и О. Т. Лутикова, *ДАН*, XVII, № 5 (1937). <sup>6</sup> Е. В. Арциховская и Н. С. Спиридонова, *ДАН*, XXIII, № 2 (1939). <sup>7</sup> H. Grassman, *Ergebnisse der Enzymforschung*, **1**, 129 (1932). <sup>8</sup> Z. Waldschmidt-Leitz, *Phys. Chemie*, **215**, 64 (1933). <sup>9</sup> T. Schulze, *Planta*, **16**, 116 (1932). <sup>10</sup> K. Mothes, *Ber. Bot. Ges.*, **51**, 31 (1933). <sup>11</sup> Б. А. Рубин и Е. В. Арциховская, *Биохимия*, II, 6 (1937). <sup>12</sup> Б. А. Рубин и К. И. Страцицкий, *Биохимия*, I, 642 (1937). <sup>13</sup> А. Л. Курсанов, *Биохимия*, I, 269 (1936). <sup>14</sup> Д. Л. Рубинштейн, *Биологическая проницаемость и механизм всасывания* (1939). <sup>15</sup> В. И. Палладин, *Bioch. ZS.*, **27**, 442 (1910); **60**, 171 (1914).