

## СОПОСТАВЛЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ДЕЙСТВИЯ ВЫСОКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ И ЭКЗОГЕННОЙ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА НА АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ХЛОРОПЛАСТОВ ПШЕНИЦЫ

*Аннотация.* Исследованы особенности действия высокой температуры и экзогенной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на процесс использования глутатиона, а также содержание каротиноидов в хлоропластах пшеницы сорта Шарг в течение 5, 10, 15, 30, 60 мин. В результате исследований была выяснена значительная роль глутатиона в поддержании функциональной активности хлоропластов при действии как высокой температуры, так и экзогенной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Адаптивное увеличение содержания в хлоропластах каротиноидов уже через 5-10 мин. после начала действия исследуемых стрессоров говорит о важной роли данных соединений в защите фотосинтетических мембран.

*Ключевые слова:* антиоксидантная система (АО), глутатион, каротиноиды, экспозиция, стресс, адаптация.

© N. Gambarova

## COMPARISON OF PECULIARITY OF ACTION OF THE HEAT AND OF EXTERNAL INTRODUCTION H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ON ACTIVITY OF ANTIOXYDANT SYSTEM CHLOROPLASTS OF WHEAT

*Abstract.* Peculiarity action of a heat and of external introduction H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on process use of glutation are investigated, and also the content carotinoids in chloroplasts of wheat of a grade of Sharg within 5, 10, 15, 30, 60 minutes. As a result of researches has been found out a considerable role of glutation in support of functional activity chloroplasts at action as heat, and of external introduction H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The adaptive increase of content in chloroplasts of carotinoids already through 5-10 mines after the beginning of action investigated stressors confirmation about the important role of the given substances in protection of photosynthetic membranes.

*Key words:* antioxydant system (joint-stock company), glutation, carotinoids, exposition, stress, adaptation.

*Введение.* В настоящее время показано, что при действии на растения различных неблагоприятных факторов внешней среды развивается окислительный стресс, характеризующийся усилением продукции активных форм кислорода (АФК), действие которых в значительной степени ограничивается за счет работы антиоксидантной (АО) системы, с помощью которой активные формы кислорода (АФК) ликвидируются без образования каких-либо других токсичных соединений. Гидроксилрадикал очень реакционно способен, и бороться с ним, по-видимому, невозможно, поэтому системы антиоксидантной защиты нейтрализуют и обезоруживают более ранние формы АФК – синглетный кислород, супероксидрадикал и перекись водорода. Среди соединений-антиоксидантов различают высокомолекулярные – ферменты и низкомолекулярные соединения, к которым по своей важности относят восстановленный глутатион, способствующий неферментативно или с помощью ферментов нейтрализации АФК, возникающих в результате контакта с мембранами [9, 329-330; 2, 130].

Восстановленный глутатион представляет собой пептид, состоящий из остатков трёх аминокислот (глутамат, цистеин, глицин). Содержание глутатиона в растительных клетках составляет от 0,2 -10 мМ [3, 188-193]. У растений этот пептид является источником восстановленной серы, донором атомов водорода. Основной пул глутатиона в растительной клетке находится в восстановленном состоянии и только в покоящихся семенах – в окисленном. Редокс-превращения глутатиона играют очень важную роль в поддержании клеточного окислительно-восстановительного баланса. В частности, он необходим для активации реакций аскорбат-глутатионного цикла, связанного с нейтрализацией перекиси водорода.

К соединениям-антиоксидантам относят и каротиноиды, которые есть у всех фототрофных организмов. Помимо участия в поглощении световой энергии они выполняют уникальную роль в тушении синглетного кислорода, а также благодаря комплексообразованию их боковых ненасыщенных углеводородных хвостов с полиеновыми кислотами они служат каналами выведения свободнорадикальных состояний из мембран [3, 188-193].

В последние годы появились публикации, в которых проведено сопоставление ответных реакций растений на различные экстремальные факторы [8, 157-164]. Однако, несмотря на большое количество публикаций, посвященных этой теме, вопрос о механизмах, лежащих в основе ответа на действие стрессоров, а также о степени неспецифичности реакции растительного организма и возможных специфических чертах, зависящих от природы и интенсивности воздействия, остается слабо изученным. В связи с этим, целью представленного исследования явилось сопоставление общих и специфических проявлений нарушения окислительно-восстановительного равновесия в хлоропластах пшеницы при действии различных по природе стрессов. С этой целью были изучены характерные черты и индивидуальные особенности динамики активности низко-молекулярных антиоксидантов (глутатион и каротиноиды) хлоропластов пшеницы теплоустойчивого сорта Шарг в течение 15, 45, 30, 60 минут, при действии высокой температуры (42°C) и различных концентраций экзогенной  $H_2O_2$  (1мМ и 10 мМ).

*Методы исследований.* Объектом исследования служили хлоропласты, выделенные из средней части листьев 14-дневных проростков пшеницы (*Triticum aestivum L*) теплоустойчивого сорта Шарг проростков по методике [6, 499].

Для создания теплового шока суспензия помещалась в увлажненный термостат при 42 °С. Контролем служила суспензия, выдерживаемая при комнатной температуре (22-23°C).

Направленное увеличение содержания  $H_2O_2$  в хлоропластах достигалось введением его экзогенно в конечных концентрациях 1 или 10 мМ, где 1 мМ  $H_2O_2$  соответствует физиологическим концентрациям пероксида водорода, в то время как 10 мМ  $H_2O_2$  можно рассматривать в качестве стрессирующего воздействия, приводящего к изменению работы фотосинтетического аппарата хлоропластов.

Определение глутатионового статуса хлоропластов проводилось по анализу содержания восстановленной и окисленной форм глутатиона, которое оценивалось титриметрически по методу [4].

Содержание каротиноидов оценивалось спектрофотометрически в суммарной вытяжке пигментов, согласно описанной методике, приведенной в работе [1].

*Результаты и обсуждение.* Помещение суспензии хлоропластов в условия 42°C приводило к постепенному окислению пластидного пула глутатиона на фоне неизменного общего содержания данного антиоксиданта, выраженного в GSH-эквивалентах (табл. 1).

Таблица 1

**Содержание глутатиона в суспензии хлоропластов пшеницы сорта Шарг при действии теплового стресса**

Время обра-ботки, мин	GSH, мкМоль/мг белка	GSSG, мкМоль/мг белка	GSH+GSSG (GSH-эквиваленты), мкМоль/ мг белка
0	11,55 ±0,14	2,0 ± 0,2	15,8 ±0,2
5	11,42 ±0,26	1,9 ±0,3	15,5 ±0,3
10	11,05 ±0,12	2,1 ±0,6	15,3 ±0,6
15	10,59 ±0,19	2,3 ± 0,4	15,1 ±0,3
30	10,62 ±0,20	2,5 ±0,6	15,5 ±0,6
60	9,74 ± 0,27	3,2 ± 0,3	16,1 ±0,3

При этом соотношение GSSG/GSH, отражающее общий redox-статус пластид, увеличивалось от 0,17 до 0,34 через 60 минут прогрева (рис.1).

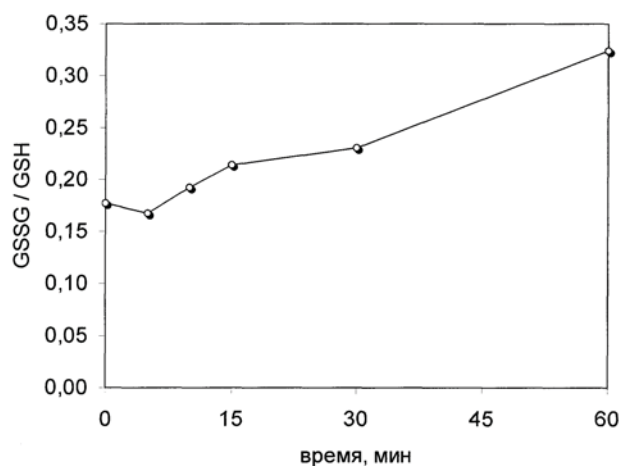


Рис. 1. Динамика отношения GSSG/GSH в хлоропластах пшеницы сорта Шарг при действии 42 °C.

Относительно медленный, линейный рост данного показателя свидетельствует о последовательном развитии при высокотемпературной обработке окислительного стресса, способного модифицировать метаболизм органелл в соответствии с изменившимися условиями среды [11, 1191-1212].

Действие теплового воздействия приводило также к увеличению концентрации каротиноидов в хлоропластах уже через 10 минут прогрева (табл. 2). К 15 минуте теплового воздействия их содержание достигало максимума, а впоследствии постепенно снижалось к исходному уровню.

Таблица 2

**Содержание каротиноидов в суспензии хлоропластов пшеницы сорта Шарг при действии 42 °C**

Время обработки, мин	Содержание каротиноидов, мг/л	% от контроля
0	19,17 ±0,28	100
5	20,15 ±0,16	105
10	21,08 ±0,27	109
15	22,41 ± 0,27	116
30	20,3 ±0,3	106
60	19,1 ±0,3	99

Полученные результаты свидетельствуют о способности хлоропластов к адаптивной активации синтеза данных соединений и их существенной роли в защите фотосинтетических мембран при действии повышенной температуры.

При введении в суспензию хлоропластов экзогенного  $H_2O_2$  в обеих концентрациях сохранялся исходный размер общего пула глутатиона, хотя и наблюдалась тенденция к некоторому снижению, но она не носила достоверного характера (табл. 3).

Таблица 3

**Содержание глутатиона в суспензии хлоропластов пшеницы сорта Шарг при действии экзогенной  $H_2O_2$**

Время обработки, мин	GSH, мкМоль/мг белка	GSSG, мкМоль/мг белка	GSH+GSSG (GSH-эквиваленты), мкМоль/мг белка
1 мМ пероксид водорода			
0	18,0 ± 0,3	1,6 ± 0,6	21,1 ± 0,5
5	15,2 ± 0,3	2,9 ± 0,5	20,9 ± 0,4
10	14,1 ± 0,2	2,8 ± 0,4	19,6 ± 0,3
15	15,1 ± 0,2	3,0 ± 0,3	21,1 ± 0,3
30	14,1 ± 0,3	2,5 ± 0,5	19,1 ± 0,4
60	14,4 ± 0,3	2,6 ± 0,4	19,6 ± 0,3
10 мМ пероксид водорода			
0	16,3 ± 0,3	1,5 ± 0,4	19,3 ± 0,6
5	11,4 ± 0,3	3,5 ± 0,5	18,6 ± 0,4
10	14,4 ± 0,5	2,1 ± 0,6	18,3 ± 0,6
15	13,9 ± 0,2	1,9 ± 0,3	17,7 ± 0,2
30	12,9 ± 0,3	2,2 ± 0,5	17,3 ± 0,4
60	12,1 ± 0,3	2,8 ± 0,5	17,8 ± 0,4

В отличие от теплового воздействия, снижение абсолютной и относительной концентрации восстановленного глутатиона и рост отношения GSSG/GSH (рис. 2) происходили уже через 5 минут после обработки. В течение всего эксперимента (60 минут) не отмечалось возвращения степени окисленности глутатиона к исходным значениям. При действии 1 мМ  $H_2O_2$  показатель GSSG/GSH возрастал в 2 раза и оставался в пределах

0,35-0,4 в течение всей последующей экспозиции (рис.2). Большая концентрация  $H_2O_2$  вызывала более сложную ответную реакцию глутатионовой системы: резкий пик отношения GSSG/GSH через 5 минут после внесения  $H_2O_2$  (в 3 раза выше контроля), последующее снижение к 10-15 минутам и повторное постепенное увеличение к часу после обработки (до 0,45). Как видно из рис.2, за исключением первоначального пика, показатель GSSG/GSH при введении 10 мМ  $H_2O_2$  превысил таковой для 1 мМ  $H_2O_2$  только через 60 минут экспозиции.

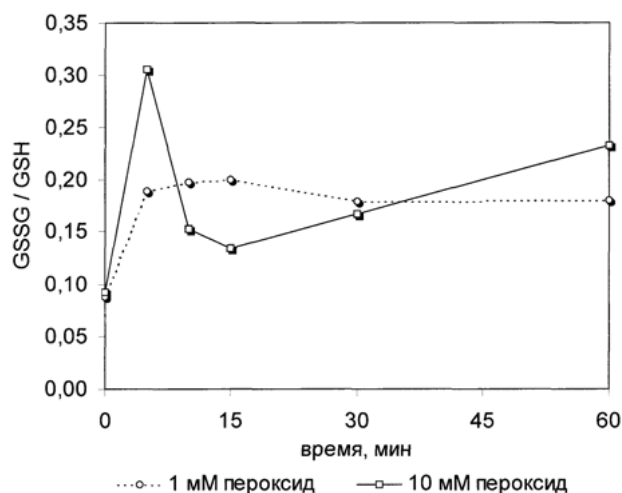


Рис.2. Динамика показателя GSSG/GSH в хло-ро-пластах пшеницы сорта Шарг при обработке экзогенным H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Что касается содержания в мембранах хлоропластов каротиноидов, то их концентрация при действии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> оставалась неизменной (табл. 4). Ни 1, ни 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> не приводили к адаптивному увеличению либо наоборот, деструкции каротиноидов, что может обуславливаться зависимостью их синтеза в первую очередь от состояния фотосистем или электрон-транспортной цепи (ЭТЦ), но не от содержания АФК как такового. Подобное предположение подтверждается тем, что к настоящему времени показана зависимость биосинтеза данных соединений в развивающихся хлоропластах от организации светособирающих антенных комплексов и реакционных центров фотосистем [10, 1409-1417]. Кроме того, установлена тесная зависимость работы ферментов синтеза каротиноидов от пластохинонового биосинтетического пути [7, 1027-1038].

Таблица 4

Содержание каротиноидов в суспензии хлоропластов пшеницы сорта Шарг при действии экзогенного H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Время обра-ботки, мин.	1 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		10 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
	Содержание каротиноидов, мг/л	% от контроля	Содержание каротиноидов, мг/л	% от контроля
0	19,14 ± 0,09	100	19,3 ± 0,3	100
5	18,42 ± 0,27	96	19,01 ± 0,13	99
10	18,46 ± 0,28	96	19,02 ± 0,29	100
15	18,9 ± 0,3	99	19,61 ± 0,25	102
30	18,78 ± 0,15	98	19,9 ± 0,3	104
60	18,8 ± 0,4	98	19,6 ± 0,4	102

Полученные результаты свидетельствуют о значительной роли глутатиона в поддержании функциональной активности хлоропластов в условиях действия изученных стрессов. Увеличивающиеся потребности в восстановленной форме данного соединения обеспечиваются за счет работы системы рециклирования глутатиона на фоне неизменного общего пула данного соединения.

Возможность адаптивного увеличения содержания в хлоропластах каротиноидов через 5-10 минут после действия изучаемых стрессорирующих воздействий также говорит о важной роли данных соединений в защите фотосинтетических мембран. Регуляция

синтеза каротиноидов осуществляется, по-видимому, с участием фотосистем или электрон транспортной цепи (ЭТЦ) хлоропластов, но не содержания АФК в хлоропластах. В связи с этим увеличение их содержания отмечалось только при действии высокой температуры, но не при обработке экзогенной  $H_2O_2$ .

Таким образом, из вышепредставленных результатов можно заключить о некоторой универсальности немедленного ответа низкомолекулярной АО-системы защиты хлоропластов на действие исследованных неблагоприятных факторов ( $42^{\circ}C$ , 1 и 10 мМ  $H_2O_2$ ). В то же время индивидуальные ответы на каждое неблагоприятное воздействие обладают определенной специфичностью. В частности, активность глутатионового потенциала зависела от интенсивности воздействия, а в случае каротиноидов – от состояния фотосинтетического аппарата.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Методы биохимического исследования растений / Под ред. А.И. Ермакова. – Л.: Агропромиздат, 1987.
2. Полеская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода. – М., 2007. – С. 139.
3. Стржалка К., Костецка-Гугала А., Латовски Д. Каротиноиды растений и стрессовое воздействие окружающей среды: роль модуляции физических свойств мембраны каротиноидами // Физиол. раст., 2003. – Т. 50. № 2.
4. Удинцев Г.Н., Бланк В.Б., Кравец Д.А., Тимесков И.С. Пособие по лабораторным методам исследования. – М.: Медицина, 1982.
5. Фрайкин Г.Я., Страховская М.Г., Рубин А.Б. Индуцированные светом процессы защиты клеток от фотоповреждений // Биохимия, 2000. – Т. 65, вып. 6.
6. Arnon D.L., Allen M.B., Whatley L.B. Photosynthesis by isolated chloroplasts. Genetic concept and comparison of free photochemical reactions // Biochim. Biophys. Acta, 1956. Vol. 20. № 2.
7. Bartley G.E., Scolnik P.A. Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health // The Plant Cell, 1995. – Vol. 7.
8. Clarke S.F., Guy P.L., Burritt D.J., Jameson P.E. Changes in the activities of antioxidant enzymes in response to virus infection and hormone treatment // Physiol. Plant, 2002. – Vol. 114.
9. Conklin P.L. Vitamin C: a new pathway for an old antioxidant // Tr. Plant Sci., 1998. – Vol. 3, № 9.
10. Cunningham F.X. Regulation of carotenoid synthesis and accumulation in plants // Pure Appl. Chem., 2002. – Vol. 74. № 8.
11. Schafer F.Q., Buettner G.R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple // Free Rad. Biol. Med., 2001. – Vol. 30. № 11.