

Функции систем биологического окисления

УДК 633.11:581.174.1:577.15:57.044

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОГО ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА НА АНТИОКСИДАНТНУЮ СИСТЕМУ ХЛОРОПЛАСТОВ У ПШЕНИЦЫ

Н.Г. ГАМБАРОВА¹, В.К. ГИНС²

У термоустойчивого сорта пшеницы Шарг изучали активность супероксидсмутазы (СОД), глутатионредуктазы (ГР) и глутатионтрансферазы (ГТ) в хлоропластах из 14-суточных проростков в присутствии разных концентраций (1 мМ и 10 мМ) экзогенного пероксида водорода H_2O_2 . Выявлена индукция активности ГР на начальном этапе окислительного стресса. Показано усиление активности СОД и ГТ в условиях, исключающих возможность их синтеза, что обуславливает дополнительную защиту пластид в ранние сроки действия экстремальных факторов.

Ключевые слова: хлоропласты, пероксид водорода, супероксидсмутаза, глутатионредуктаза, глутатионтрансфераза.

Keywords: chloroplast, hydrogen peroxide, superoxide dismutase, glutathione reductase, glutathione-S-transferase.

Антиоксидантные (АО) системы сдерживают продукцию активных форм кислорода (АФК) и предотвращают накопление макромолекул в клетках, подвергшихся окислительной модификации под действием неблагоприятных факторов различной природы (1). Адаптивное увеличение антиоксидантной активности может служить показателем степени устойчивости защитных систем организма. Усиление функционирования АО-системы при отсутствии изменений в окислительных процессах указывает на развитие окислительного стресса в клетках и свидетельствует о нарушении прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза (2).

Ответ антиоксидантной системы на действие стрессоров обладает рядом неспецифических черт. Так, для стрессовой реакции растений характерно усиление активности антиоксидантных ферментов и увеличение пула низкомолекулярных антиоксидантов на фоне роста их окисленности. При действии на растения экстремальных температур (3), засоления (4), засухи (5) получен сходный антиоксидантный ответ. Однако можно предположить существование иного механизма действия экзогенной H_2O_2 на содержание и активность антиоксидантов.

В настоящее время пероксид водорода рассматривают не только как стрессовый фактор в модельных исследованиях (6), но и как сигнальный мессенджер (7), регулятор развития защитных реакций (8). Показана его способность индуцировать устойчивость растений табака к окислительному стрессу посредством увеличения активности и(или) количества АО-ферментов (9).

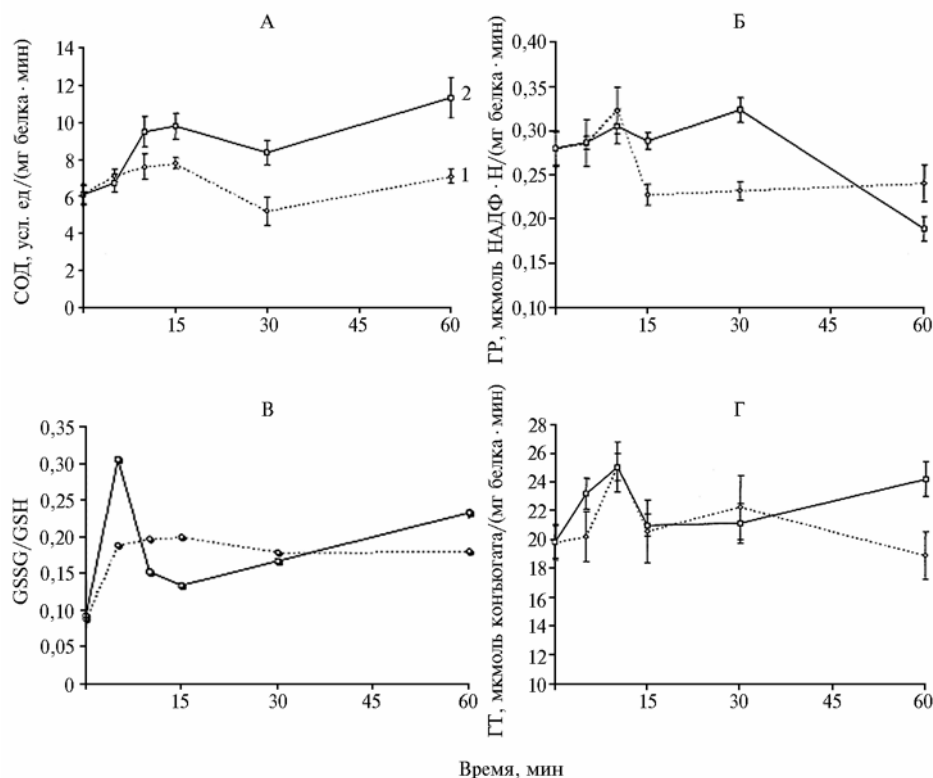
Целью настоящей работы стало изучение влияния экзогенно введенного пероксида водорода на антиоксидантную систему изолированных хлоропластов пшеницы.

Методика. Объектом исследования служили 14-суточные проростки пшеницы (*Triticum aestivum* L.) теплоустойчивого сорта Шарг. Хлоропласты выделяли из средней части листьев (10). При определении активности ферментов 0,2 мл хлоропластов, обработанных 1 мМ или 10 мМ H_2O_2 , помещали в реакционную среду. Оценивали активность супероксидсмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1) (12), глутатионредуктазы (ГР, КФ 1.6.4.2) (12) и глутатион-S-трансферазы (ГТ, КФ 2.5.1.18) (13) через 5, 10, 15, 30 и

60 мин. Концентрацию белка в суспензии хлоропластов определяли по Лоури (14), содержание восстановленного (GSH) и окисленного (GSSG) глутатиона — методом, предложенным Н.В. Шалыго с соавт. (15). Всего проведено 2 опыта в 3 повторностях ($n = 6$).

Данные представлены в виде средних значений и их стандартных ошибок (16).

Результаты. Введение в суспензию хлоропластов пероксида водорода в концентрациях 1 и 10 мМ вызывало сходную динамику активности СОД, что позволяет говорить о наличии прямого дозозависимого эффекта (рис., А). При этом доза 1 мМ H_2O_2 приводила к увеличению показателя до 120 % от исходных значений с последующим снижением, в то время как при добавлении 10 мМ H_2O_2 активность фермента возрастала до 150-160 % и оставалась в этих пределах до конца эксперимента (175 % к 60-й мин).



Динамика активности супероксидсмутазы (СОД, А), глутатионредуктазы (ГР, Б) и глутатион-трансферазы (ГТ, Г), а также показателя GSSG/GSH (соотношение количества окисленного и восстановленного глутатиона) (В) в хлоропластах из 14-суточных проростков у пшеницы *Triticum aestivium* L. термоустойчивого сорта Шарг при обработке экзогенным пероксидом водорода (1 и 2 — соответственно 1 мМ и 10 мМ H_2O_2).

Полученные данные свидетельствуют о способности H_2O_2 регулировать активность СОД в хлоропластах вне зависимости от ее синтеза *de novo*. Усиление работы фермента под действием микромолярных концентраций H_2O_2 описывалось ранее для эритроцитарной СОД животных и противопоставлялось быстрой деструкции фермента миллимолярными концентрациями пероксида (17). В качестве возможного механизма действия H_2O_2 предполагалось его взаимодействие с активным центром фермента.

Активность ГР при обработке хлоропластов 1 мМ H_2O_2 снижалась до 80 % от исходной через 15 мин после введения пероксида и не изменя-

лась до конца эксперимента (см. рис., Б). При этом дальнейшее повышение величины GSSG/GSH приводило к падению активности ГР — фермента, поддерживающего внутриклеточный пул глутатиона в восстановленном состоянии. При увеличении концентрации пероксида (10 мМ) фермент проявлял большую устойчивость к действию стрессора: его активность уменьшалась до 70 % от первоначальной только к 60-й мин после обработки. Снижение активности ГР, участвующей в восстановлении GSH из GSSG в НАДФ·Н-зависимой реакции, через разный промежуток времени свидетельствует о недостатке субстрата для эффективного образования GSH в присутствии стресс-фактора. Известно, что GSH в защитных реакциях не разрушается, а превращается в окисленную форму, что приводит к увеличению соотношения GSSG/GSH в стрессовых условиях.

Причиной снижения активности фермента, по-видимому, стал дефицит восстановительных эквивалентов в хлоропластах в условиях окислительного стресса (18), а большая устойчивость ГР при действии 10 мМ H_2O_2 могла быть следствием работы регуляторных механизмов, обуславливающих адаптивное поддержание защитных АО-систем в экстремальных условиях. В частности, сохранение более высокой активности ГР при обработке хлоропластов 10 мМ H_2O_2 в течение 30 мин подтверждалось увеличением отношения GSSG/GSH (см. рис., В).

Обработка пероксидом водорода в обеих использованных дозах приводила к повышению активности ГТ (до 125 % от исходных значений) через 10 мин после внесения в суспензию экзогенного H_2O_2 (см. рис., Г). Затем активность фермента снижалась. В случае обработки хлоропластов 10 мМ H_2O_2 отмечался повторный рост активности ГТ через 60 мин. Аналогичные данные были получены при изучении реакции суспензии хлоропластов в ответ на высокотемпературное воздействие (19). Несмотря на некоторые различия (максимум активности ГТ при тепловом шоке наблюдался через 5 мин), сходная динамика ответной реакции позволяет предположить существование единых механизмов в регуляции активности глутатион-S-трансферазы при действии этих стрессоров. Возможно, влияние высокой температуры на фермент опосредуется через увеличение содержания в хлоропластах активных форм кислорода, в частности H_2O_2 . Правомочность такого предположения подтверждается способностью ГТ к аллостерической регуляции. При этом сама H_2O_2 может рассматриваться как возможный индуктор ГТ.

Таким образом, при действии различных концентраций экзогенно введенного пероксида водорода антиоксидантная система защиты хлоропластов у пшеницы проявляла значительную чувствительность и лабильность, адаптивный ответ наблюдался уже через 5 мин после появления стрессора. При введении H_2O_2 в модельную систему хлоропластов непосредственным ответом на действие стрессора была активация супероксиддисмутазы и глутатион-S-трансферазы. При этом СОД хлоропластов пшеницы способна к индукции ферментативной активности в условиях, исключающих синтез дополнительного количества фермента. Динамика активности ГР — ключевого фермента аскорбат-глутатионового цикла свидетельствует об его участии в регуляторных реакциях, связанных с развитием неспецифического ответа на действие окислительного стресса. Глутатион играет значительную роль в поддержании функциональной активности хлоропластов в экстремальных условиях за счет как собственных антиоксидантных свойств, так и работы ферментных систем. При действии H_2O_2 возрастает использование глутатиона в реакциях с участием ГТ, в то время как возможности его рециклирования ГР достаточно

ограничены. По-видимому, повышение концентрации H_2O_2 до 10мМ активирует перекисное окисление липидов и в то же время индуцирует активность ГТ как фермента, участвующего в реакции защиты липидов. Полученные результаты указывают на возможность использования ответной реакции антиоксидантной системы в качестве маркера развития окислительного стресса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Полесская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода. М., 2007.
2. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Tr. Plant Sci., 2002, 7(9): 405-410.
3. Chaitanya K.V., Sundar D., Masilamani S., Ramachandra R.A. Variation in heat stress-induced antioxidant enzyme activities among three mulberry cultivars. Plant Growth Reg., 2002, 36(2): 175-180.
4. Hernandez J.A., Jimenez A., Mulleniaux P.M., Sevilla F. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defenses. Plant Cell Environ., 2000, 23: 853-862.
5. Fu J., Huang B. Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. Environ. Exp. Bot., 2001, 45(2): 105-114.
6. Neill S.J., Desikan R., Clarke A., Hurst R.D., Hancock J.T. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. J. Exp. Bot., 2002, 53(372): 1237-1247.
7. Bowler C., Fluhr R. The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. Tr. Plant Sci., 2000, 3(6): 241-244.
8. Чевари С., Чабан И., Секей И. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах. Лабораторное дело, 1985, 11: 578-681.
9. Bilang J., Sturm A. Cloning and characterization of glutathione S-transferase that can be photolabeled with 5-azido-indole-3-acetic acid. Plant Physiol., 1995, 109: 253-260.
10. Arnott D.L., Allen M.B., Whately L.B. Photosynthesis by isolated chloroplasts. Genetic concept and comparison of free photochemical reactions. Biochim. Biophys. Acta, 1956, 20(2): 449.
11. Lopez-Delgado H., Dat J.F., Foyer C.H., Scott I.M. Induction of thermotolerance in potato microplants by acetylsalicylic acid and H_2O_2 . J. Exp. Bot., 1998, 49(321): 713-720.
12. Iavata J., Tanaka U. Glutathione reductases «positive» spectro-photometre assays. Colled. Cresh. Chem. Commun., 1977, 42(3): 1086-1089.
13. Habig W.H., Pabst M.V., Jacoby W.B. Glutathione S-transferases. J. Biol. Chem., 1974, 249: 7130-7135.
14. Lowry O.N., Rosenbrough N.J., Tarr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 1951, 193(1): 265-275.
15. Шалыго Н.В., Шербакова Р.А., Доманская И.Н., Радюк М.С. Спектрофлуориметрический метод определения окисленного и восстановленного глутатиона в растениях. Физиол. и биохим. культурных растений, 2007, 39(3): 1-7.
16. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. Изд. 5-е, доп. и перераб. М., 1985.
17. Kosenko E.A., Kaminsky Y.G., Stavrovskaya I.G., Sirota T.V., Kondrashova M.N. The stimulatory effect of negative air ions and hydrogen peroxide on the activity of superoxide dismutase. FEBS Letters, 1997, 410: 309-312.
18. Pastori G., Mullineaux P., Foyer C. Post-transcriptional regulation prevents accumulation of glutathione reductase protein and activity in the bundle sheath cells of maize. Plant Physiol., 2000, 122: 667-675.
19. Гамбарова Н.Г. Сравнительное изучение антиоксидантного статуса различных сортов пшеницы при действии высокой температуры. Изв. АН Азербайджанской Республики, 2009, 1-2: 136-140.

¹Бакинский государственный университет,
AZ 1148 Азербайджанская Республика, г. Баку, AZ-1073/1,
ул. Академика Захид Халилова, 23,
e-mail: physiol@inbox.ru;

²ГНУ Всероссийский НИИ селекции и семеноводства
овощных культур Россельхозакадемии,
143080 Московская обл., Одинцовский р-н, пос. ВНИИССОК,
e-mail: lab308@vniissok.ru

Поступила в редакцию
13 июля 2010 года

INFLUENCE OF EXOGENOUS HYDROGEN PEROXIDE ON ANTIOXIDANT SYSTEM OF WHEAT CHLOROPLAST

N.G. Gambarova¹, V.K. Gins²

S u m m a r y

The effect of different concentrations (1 mM and 10 mM) of exogenous H₂O₂ on activity of superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase (GR) and glutathione transferase (GT) was studied using isolated chloroplasts of 14-day seedlings of heat stable wheat of the Sharg variety. It was shown, that under conditions, which exclude synthesis of SOD and GT, their activities increase and this causes additional protection of plastids at the early stage of the extreme factors' action. The rise of H₂O₂ dose results in the increase of GR stability.

Конференции

**МЕЖДУНАРОДНАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
«ИННОВАЦИОННЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ В АГРОТЕХНИКЕ САДОВЫХ КУЛЬТУР»,
посвященная 110-летию со дня рождения доктора сельскохозяйственных наук,
профессора З.А. Метлицкого
(г. Москва, 14 февраля 2012 года)**

Конференция прошла во Всероссийском селекционно-технологическом институте садоводства и питомниководства. Представленные 22 доклада были посвящены памяти выдающегося ученого, а также обсуждению роли и современного развития идей З.А. Метлицкого.

Информация: <http://www.vstisp.org>

**3-я МЕЖДУНАРОДНАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
«СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ В СЕЛЕКЦИИ И СЕМЕНОВОДСТВЕ ОВОЩНЫХ
КУЛЬТУР. ТРАДИЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ»,
посвященная 125-летию со дня рождения Н.И. Вавилова
(г. Москва, Всероссийский НИИ селекции и семеноводства овощных культур, 8-9 августа 2012 года)**

Информация: <http://www.vniissok.ru>

Новые книги

В о й н и к о в В.К. Митохондрии растений при температурном стрессе. Новосибирск: Академическое изд-во «Гео», 2011, 63 с.

Монография посвящена исследованиям по важной проблеме современной биологии — выяснению физиологических и биохимических механизмов адаптации растений к флуктуациям температуры. Проведены исследования реакции митохондрий растительной клетки на действие неблагоприятной температуры. Установлено, что в ответ на температурные стрессы в растениях происходит синтез стрессовых белков. Среди них — белки, разобщающие окислительное фосфорилирование, и ряд других. Температурные стрессы приводят к серьезным изменениям в энергетической системе, что связано в первую очередь с изменениями редокс-состояния митохондрий. Рассматриваемые в работе вопросы регуляции энергетического обмена тесно связаны с изменениями в экспрессии генома, что указывает на взаимодействие энергетической и информационной систем растительных клеток при флуктуациях температуры. Для генетиков, биохимиков и физиологов растений, а также студентов и аспирантов биологических специальностей университетов, сельскохозяйственных и педагогических вузов.

Т о л с т и к о в Г.А., Т о л с т и к о в а Т.Г., Ш у л ь ц Э.Э. и др. Смоляные ки-

слоты хвойных России. Химия, фармакология. Новосибирск: Академическое изд-во «Гео», 2011, 395 с.

Рассмотрены проблемы химии дитерпеновых (смоляных) кислот, продуцируемых лесными хвойными деревьями России. Главным объектом обсуждения являются кислоты, получаемые технологичными методами из живиц, канифоли, а также экстракцией отходов лесопромышленного комплекса. Новым в подходе является представление производных смоляных кислот как предмета тонкого органического синтеза и медицинской химии. Впервые обобщены данные о фармакологических свойствах смоляных кислот и их производных, полученных путем целенаправленного синтеза. Собраны сведения о фармакологии растительных метаболитов, имеющих родственные структуры с обсуждаемыми смоляными кислотами. Обобщены результаты исследований ученых России, в том числе авторов монографии, посвященных целенаправленным превращениям смоляных кислот, а также выявлению фармакологически перспективных новых производных. Сделан акцент на целесообразности привлечения производных смоляных кислот и других метаболитов древесных растений в качестве предмета исследований по разработке оригинальных лекарственных препаратов.