

**Половинкина Елена Олеговна**

**СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ ПЕРЕКИСНОГО ГОМЕОСТАЗА  
ХЛОРОПЛАСТОВ ГОРОХА В УСЛОВИЯХ СЛАБОГО  
ВОЗДЕЙСТВИЯ ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ  
РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ**

**03.00.12 – физиология и биохимия растений**

*Автореферат*

*диссертации на соискание ученой степени*

*кандидата биологических наук*

**Нижний Новгород**

**2007**

Работа выполнена на кафедре биохимии и физиологии растений Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского

Научные руководители:

доктор биологических наук,  
профессор А.П. Веселов  
кандидат биологических наук,  
доцент Л.Н. Курганова

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,  
Ф.В. Минибаева  
кандидат биологических наук,  
доцент К.Д. Дятлова

Ведущая организация:

Казанский государственный университет  
им. В.И. Ульянова-Ленина

Защита состоится «29» мая 2007 г. в 15.00 часов на заседании диссертационного совета К 212.166.06 Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского (603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского.

Автореферат разослан «28» апреля 2007 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

И.Ф. Александрова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность проблемы.**

До настоящего времени вопрос о существовании специфических мишеней малых доз ионизирующей радиации и низкоинтенсивных магнитных полей остается спорным. Многочисленные исследования последних десятилетий показали, что независимо от природы воздействия, ответ растения на него развивается по некоторой общей схеме, что позволяет говорить о существовании неспецифической стрессовой реакции на воздействия извне (Удовенко, 1977; Пахомова, 1995; Шакирова, 2001). Таким универсальным звеном в реакции растительного организма на действие самых разнообразных факторов может быть некоторое стереотипное изменение внутренней среды клетки, на роль которого многие исследователи выдвигают окислительный стресс (Барабой, 1991; Курганова и др., 1999). Однако до настоящего времени ведутся споры о степени универсальности окислительного стресса, как ответной реакции на любое воздействие извне и наличии специфических механизмов для его реализации, зависящих от природы действующего фактора.

В многочисленных работах показано усиление генерации активных форм кислорода (АФК) в ответ на разнообразные внешние стимулы, но их роль в развитии стресс-реакции до конца не выяснена и является широко обсуждаемым вопросом. (Минибаева и др., 1997; Dat et al., 1998; Калашников и др., 1999; Chen, Li, 2001). С одной стороны повышение продукции активированного кислорода приводит к интенсификации окислительной модификации биомолекул и, как следствие, к изменению перекисного гомеостаза клетки (Владимиров, Арчаков, 1972; Бурлакова, Храпова, 1985; Мерзляк, 1989). В то же время получены сведения о сигнальной роли АФК в регуляции многих физиологических процессов (Кулинский, 1998; Тарчевский, 2002). В растительной клетке генерация значительной части активных форм кислорода происходит в результате функционирования фотосинтетической электрон-транспортной цепи, в связи с чем в современной физиологии растений многими исследователями выдвигается гипотеза о сенсорной функции хлоропластов (Allen, 1993; Foyer et. al., 1994; Teicher et al., 2000).

Большое внимание в последнее время уделяется механизмам ответа живых систем на слабые внешние воздействия (Веселова, Веселовский, Чернавский, 1993; Бурлакова и др., 1999; Эйдус, 2001). Предполагается, что действие факторов, по силе не выходящих за зону толерантности организмов, формируется не вследствие прямого повреждающего эффекта стрессора, а в результате разбалансирования процессов повреждения и восстановления клеточных структур. В связи с этим исследование слабых воздействий может способствовать выявлению механизмов тонкой регулировки внутренних процессов, происходящих при внешних возмущениях.

Учитывая вышесказанное, представляется актуальным исследование возможности участия системы перекисного гомеостатирования в ответе растительного организма на воздействие малых доз ионизирующей радиации и низкоинтенсивного переменного магнитного поля, что в перспективе может

способствовать раскрытию общебиологических механизмов рецепции данных физических факторов; стать основой для разработок в области повышения адаптивных возможностей растений к этим воздействиям в условиях возрастающего техногенного загрязнения окружающей среды.

### **Цель и задачи исследования.**

Цель работы состояла в определении динамики изменения перекисного гомеостаза хлоропластов гороха при воздействии малых доз ионизирующей радиации и низкочастотного переменного магнитного поля, выяснении возможной роли этих изменений в ответе хлоропластов гороха на воздействие данных физических факторов.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Определить содержание супероксидного анион-радикала, продуктов перекисного окисления липидов, основных низкомолекулярных антиоксидантов и активность ферментов антиоксидантной защиты в хлоропластах, выделенных из растений гороха, подвергнутых воздействию ионизирующей радиации в малых дозах и низкоинтенсивного переменного магнитного поля.

2. Провести сопоставление эффектов на уровне прооксидантно-антиоксидантной системы хлоропластов при воздействии разных доз ионизирующей радиации и разных временных экспозиций низкоинтенсивного переменного магнитного поля.

3. Оценить специфичность изменений перекисного гомеостаза хлоропластов растений гороха в результате исследуемых воздействий.

4. Определить возможность участия супероксидного анион-радикала в ответе прооксидантно-антиоксидантной системы хлоропластов на слабое воздействие физических факторов.

### **Научная новизна.**

Получены новые данные, свидетельствующие об усилении продукции супероксидного анион-радикала хлоропластами в течение длительной экспозиции после облучения растений ионизирующей радиацией в малых дозах и в результате воздействия низкочастотным магнитным полем, показана возможность участия супероксидного анион-радикала в развитии защитных реакций к воздействию данных физических факторов.

Исследовано последствие ионизирующей радиации и показан парадоксальный ответ системы перекисного гомеостатирования хлоропластов на облучение в малых дозах. Получены два типа эффектов малых доз радиации на интервале до 1 Гр. Показано, что доза 0,1 Гр вызывает гиперчувствительность к последующей гипертермии облученных растений, доза 1 Гр обуславливает адаптивный ответ растений на последующее воздействие повышенной температуры.

Впервые продемонстрировано развитие окислительного стресса, как неспецифической реакции на воздействие магнитного поля напряженностью 3,5 мТл и частотой 100 Гц на растения.

### **Теоретическая и практическая значимость.**

Полученные в представленной работе эффекты малых доз радиации и переменного магнитного поля в растительном организме могут иметь большое значение для раскрытия общебиологических механизмов рецепции слабых физических факторов.

Проведенные исследования демонстрируют участие генерируемого хлоропластами супероксидного анион-радикала в формировании ответа системы поддержания перекисного гомеостаза растений на воздействие ионизирующей радиации в малых дозах и низкоинтенсивного переменного магнитного поля. Эти данные открывают перспективы для разработки новых способов повышения адаптивных возможностей растений к стрессирующим воздействиям, а также могут быть полезны для рассмотрения использования растительного организма в биоиндикации и экологическом мониторинге техногенного загрязнения окружающей среды.

### **Апробация работы.**

Основные результаты работы доложены на конференции «Экологическая и промышленная безопасность» (Саров, 2003), 8-й, 9-й, 10-й и 11-й Нижегородских сессиях молодых учёных (Н.Новгород, 2004, 2005, 2006, 2007), XVII международной конференции «Актуальные проблемы естествознания» (Н.Новгород, 2004), 8-й, 9-й и 10-й международных Пущинских школах-конференциях молодых учёных «Биология – наука 21<sup>го</sup> века» (Пущино, 2004, 2005, 2006), на II Всероссийской молодежной научной конференции по фундаментальным проблемам радиохимии и атомной энергетике (Н.Новгород, 2004), The IX European Young Investigator Symposium “SymBioSE-2005” (Helsinki, 2005), The I(IX) International Conference of Young Botanists in Saint-Petersburg (Saint-Petersburg, 2006), The 2<sup>nd</sup> international symposium “Signaling systems of plant cells: role in adaptation and immunity” (Kazan, 2006), The 35<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Radiation Research Society and the 4<sup>th</sup> Annual Meeting of the Ukrainian Society for Radiation Biology “European Radiation Research – 2006” (Kyiv, 2006), на Годичном собрании общества физиологов растений (Ростов-на-Дону, 2006), Международной конференции по фундаментальным наукам среди студентов и аспирантов «Ломоносов-2007» (Москва, 2007), II Международной конференции «Человек и электромагнитные поля» (Саров, 2007).

### **Публикации.**

По материалам диссертации опубликовано и направлено в печать 16 работ.

### **Структура и объем диссертации.**

Диссертация в объеме 105 листов состоит из введения, обзора литературы, описания методов и объекта исследования, 3 разделов, где представлены результаты исследований и их обсуждение, заключения, выводов и списка литературы из 228 источников. Диссертация иллюстрирована 18 рисунками.

## ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Объект исследований и постановка опытов.** Исследования проводились на суспензии хлоропластов, изолированных по методу D.L. Arnon et al. (1956) из 14-дневных растений гороха (*Pisum sativum* L.) сорта Альбумен, выращенных на фильтровальной бумаге, смачиваемой водопроводной водой, в условиях климатической камеры при 22-23°C. Хлоропласты выделялись из листьев 2-3 ярусов, считая сверху.

Облучение растений проводили на терапевтической установке  $^{60}\text{Co}$  «Агат-С» в дозах 0,1 и 1 Гр с мощностью дозы 0,8 Гр/мин. Выделение и анализ состояния хлоропластов проводили через 30 и 60 мин после облучения. Для создания теплового шока растения помещались в термостат при 42°C на 30 мин. Обработка магнитным полем проводилась с помощью магнитотерапевтической установки УМТИ-3Ф «Колибри», создающей импульсное затухающее магнитное поле с индукцией 3,5 мТл и частотой 100 Гц. Выделение хлоропластов и анализ проводился сразу после экспозиции 15, 30, 60 и 120 мин в поле. Контролем служила суспензия хлоропластов из растений, не подвергнутых перечисленным воздействиям.

**Анализ продукции супероксида и накопления продуктов липопероксидации.** Измерение содержания супероксидного анион-радикала осуществляли методом ЭПР с использованием спиновой ловушки тирон (4,5-дигидрокси-1,3-фенил-дисульфонат Na). Семихинон, образующийся при взаимодействии тирона с супероксидом, имеет специфический ЭПР спектр. Суспензия хлоропластов инкубировалась с 50 мМ тироном 2-3 мин, далее рН раствора доводился до 9,0. Спектры семихинона тирона регистрировались на ЭПР спектрометре PE 1306 (Россия) (Минибаева, 2005). Развитие перекисного окисления липидов оценивалось по уровню первичных (диеновые конъюгаты) и вторичных (малоновый диальдегид) продуктов спектрофотометрически с учетом молярных коэффициентов экстинкции (Стальная, Гаришвили, 1977; Камышников, 2000). Общее количество липидов определяли спектрофотометрически по реакции с фосфорно-ванилиновым реактивом (Камышников, 2000).

**Анализ активности антиоксидантных ферментов и уровня низкомолекулярных антиоксидантов.** Активность супероксиддисмутазы определяли по реакции с нитросиним тетразолием (Дубинина и др., 1983), аскорбатпероксидазы - по уменьшению содержания аскорбата в пробе (Nakano, Asada, 1981), глутатионредуктазы – по убыли НАДФН (Iavata, Tanaka, 1977). Содержание белка оценивали по методу Лоури (Lowry et al., 1951).

Содержание восстановленной формы аскорбиновой кислоты определяли по реакции с феррицианидом калия, восстановленной формы глутатиона – по реакции Элмана с дитионитробензоатом натрия (Практикум по биохимии, 1989). Суммарное содержание аскорбата и глутатиона определяли после восстановления их окисленных форм цинковой пылью.

**Статистическая обработка полученных результатов.** Обработка полученных результатов производилась методами параметрической статистики

(Гланц, 1998, Гавриленко, 2003). На рисунках представлены средние арифметические 3-6 независимых опытов, каждый из которых проводился в трехкратной биологической повторности, и их стандартные ошибки. Значимость различий оценивалась по критерию Стьюдента с поправкой Бонферрони для множественных сравнений с контролем и критерию Даннета.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**1. Последствие малых доз ионизирующей радиации в хлоропластах облученных растений гороха.** В качестве одного из слабых воздействий на растительный организм в экспериментах использовалось облучение ионизирующей радиацией в дозах 0,1 и 1 Гр, являющихся для растения малыми (Кузин, 1986; Гродзинский, 1991). Если ионизирующая радиация в летальных и сублетальных дозах вызывает окислительную деградацию мембранных структур клетки (Спитковский, 1999; Кудряшов, 2004), то для малых доз, не имеющих прямого повреждающего действия, описан целый ряд эффектов последствия: от гиперчувствительности (Бурлакова и др., 1999; Mothersill et al., 1999; Zaka et al., 2001) до гормезиса (Kondo, 1988; Рагаб Мусса, 2006). Однако механизмы этих эффектов в настоящее время остаются не изученными до конца, за исключением того, что скорее всего они реализуются через клеточные мембраны (Кузин, 1986; Эйдус, 2001).

В проводившихся экспериментах по истечении 30 мин после облучения содержание супероксидного анион-радикала было выше контрольного уровня: в 1,5 раза при дозе 0,1 Гр и в 2,3 раза при дозе 1 Гр, что сохранялось до 60 мин экспозиции (рис.1). Супероксидный анион-радикал является одним из возможных продуктов радиолиза воды, однако постановка эксперимента исключает вероятность сохранения этого радикала после воздействия радиации до момента проведения анализов. Таким образом, облучение изменяло работу системы генерации и утилизации супероксида.

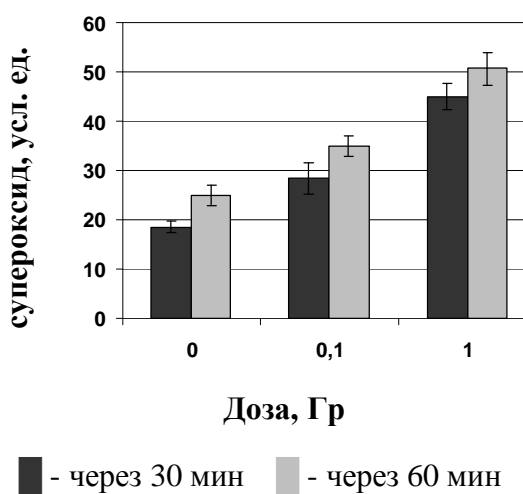


Рис. 1. Содержание супероксида в хлоропластах гороха после облучения

Результатом увеличения продукции АФК, как правило, является смещение прооксидантно-антиоксидантного равновесия в сторону интенсификации окислительных процессов, об активности протекания которых можно судить по накоплению продуктов ПОЛ. В некоторых работах ПОЛ рассматривается как маркер неспецифического ответа организма на воздействие извне (Курганова и др., 1997; Vecana, Morgan, Iturbe-Ormaeche, 1998; Барабой, 2003). Кроме того, продукты липопероксидации могут выполнять сигнальную роль, изменяя активность ферментов (Тарчевский, 2003). Ионизирующая радиация в наших

экспериментах приводила к накоплению продуктов ПОЛ в фотосинтетических мембранах, причем эти изменения имели парадоксальный характер: меньшая доза имела более длительное последствие (рис.2). Повышение уровня ДК через час после облучения в дозе 0,1 Гр свидетельствует о развитии второй волны активации ПОЛ, итогом которой стало развитие деструктивных процессов на мембранах вследствие накопления МДА. Доза 1 Гр также активировала ПОЛ: уровень ДК был выше на 24% спустя 30 мин после облучения и оставался на том же уровне в течение часа, однако накопления токсичных конечных продуктов липопероксидации не происходило.

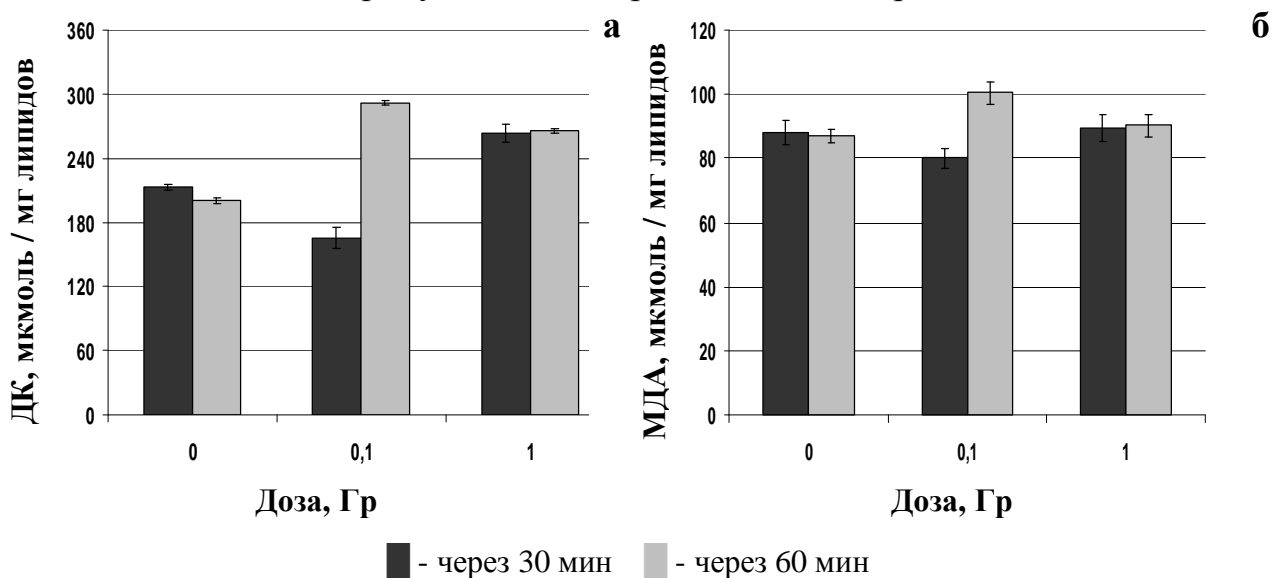


Рис. 2. Влияние облучения на содержание продуктов липопероксидации: ДК (а) и МДА (б) в хлоропластах гороха

Другим маркером окислительного стресса является антиоксидантная система, активация работы которой даже при стационарном уровне окислительных процессов говорит о развитии стресс-реакции (Калашников и др., 1999).

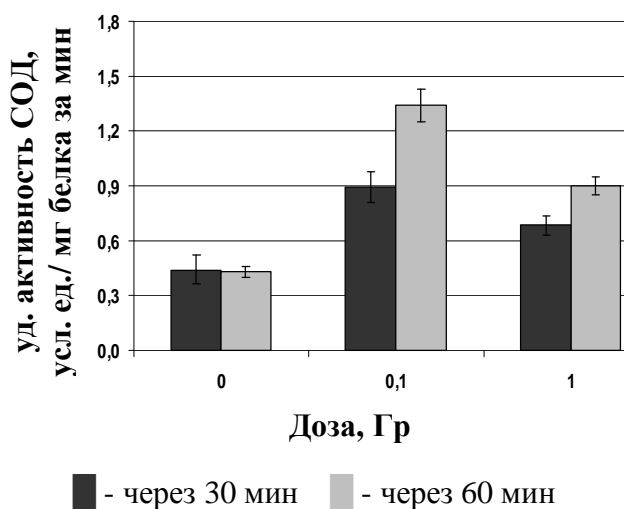


Рис. 3. Активность СОД в хлоропластах гороха после облучения

В хлоропластах, выделенных через 30 мин после облучения в дозе 0,1 Гр, фермент первой линии защиты - СОД активировалась более чем в 2 раза по сравнению с контролем (рис.3). К 60 мин экспозиции активность возрастала до 325% от контроля. Облучение в дозе 1 Гр вызывало не столь сильную активацию этого фермента: в 1,75 раза через 30 мин после воздействия, и в 2 раза по сравнению с контролем через 60 мин.

В результате работы СОД образуется более стабильный



молекулярный продукт - пероксид водорода, который ввиду отсутствия в хлоропластах основного фермента его детоксикации – каталазы, элиминируется в глутатион-аскорбатном цикле. О работе этого цикла можно судить по активности его ключевых ферментов – аскорбатпероксидазы (АП) и глутатионредуктазы (ГР) (Asada, 1992; Vansuyt et al., 1997). Обе дозы вызывали достоверную инактивацию АП спустя 30 мин после облучения (рис.4а). Вероятно, это связано с окислением пула восстановленного аскорбата, который используется аскорбатпероксидазой непосредственно в реакции восстановления пероксида водорода (рис.4б). Содержание аскорбата снижалось до 30% от контроля при дозе 0,1 Гр и до 10%- при дозе 1 Гр. Однако еще через 30 мин активность АП превышала контроль в 3 раза при дозе 0,1 Гр и в 2- при дозе 1 Гр.

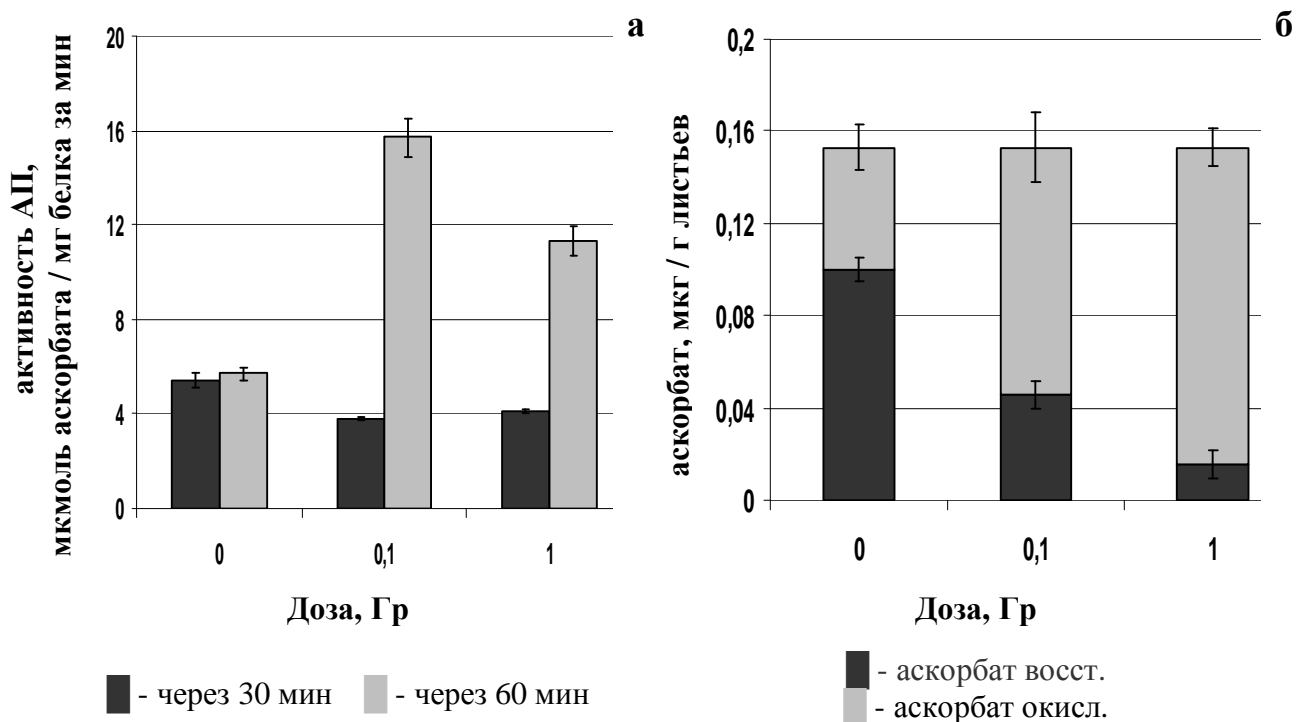


Рис. 4. Активность аскорбатпероксидазы (а) и соотношение окисленной и восстановленной форм аскорбиновой кислоты (б)

Скорость работы всего цикла определяет глутатионредуктаза, катализирующая восстановление окисленного димера глутатиона GSSG до GSH, который идет на восполнение пула восстановленного аскорбата и работу фермента детоксикации продуктов окисления – глутатионтрансферазы.

Через 30 мин после облучения в дозе 0,1 Гр активность ГР снижалась на 20%, на этом фоне происходило снижение содержания восстановленного глутатиона (рис. 5а). Но еще через 30 мин активность ГР возросла в 2 раза по сравнению с контролем. Облучение в дозе 1 Гр, напротив, вызывало рост активности ГР (на 35 %) уже к 30 мин, который продолжался последующие 30 мин до 250% от контроля.

Обе дозы облучения индуцировали синтез глутатиона *de novo* (рис. 5б). Вновь синтезированный глутатион, по-видимому, быстро расходовался на детоксикацию продуктов свободнорадикального окисления и переходил в окисленную форму. Однако большая активация синтеза глутатиона и работа ГР в случае облучения в дозе 1 Гр обуславливала поддержание концентрации GSH на контрольном уровне.

Для своей работы ГР требует НАДФН в качестве кофактора. Ранее (Veselov et al., 2006) было показано изменение фотохимической активности хлоропластов в результате облучения в дозе 0,1 Гр и переключение ФЭТЦ на циклический поток электронов, что может обусловить дефицит восстановленного НАДФН и как следствие – ингибирование работы ГР, снижение уровня GSH и падение активности АП. Снижение концентрации НАДФН может происходить также в результате непосредственной детоксикации образующихся АФК. Подобные эффекты описаны для многих стрессовых состояний пластид (Iturbe-Ormaeche, 1998, Shikanai, 1998).

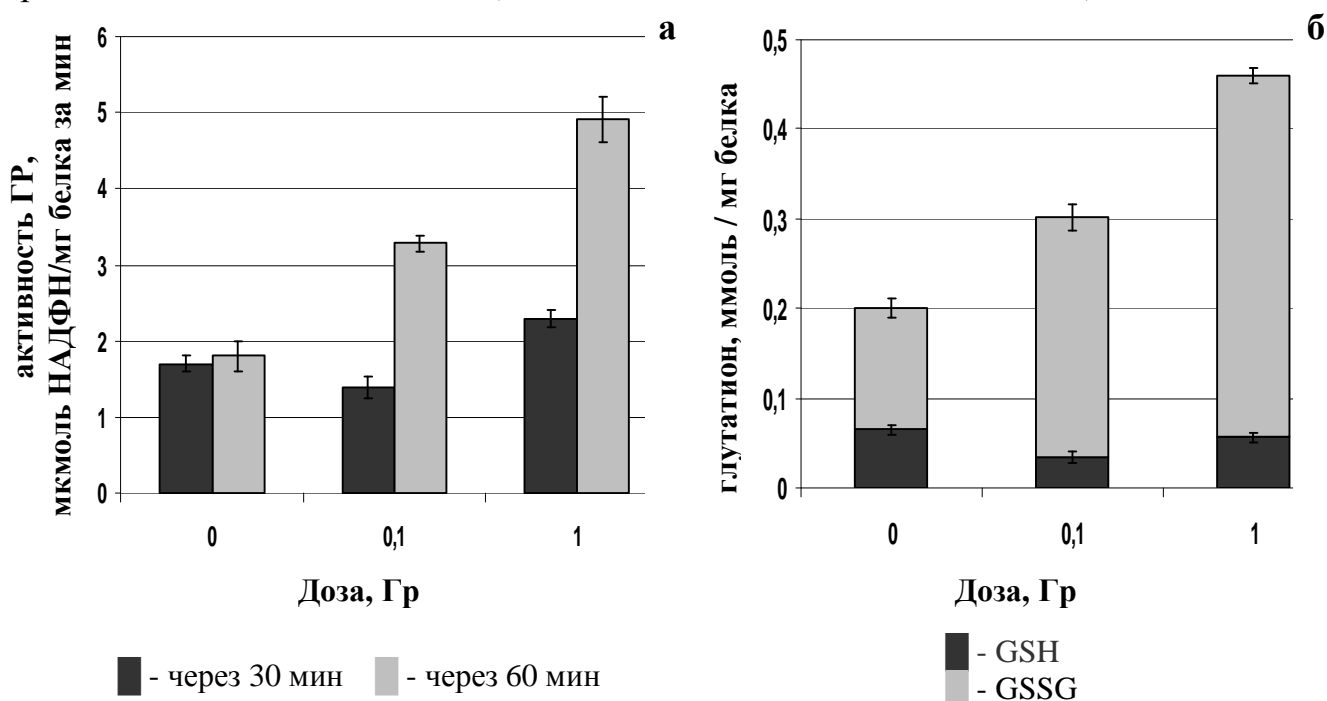


Рис. 5. Активность глутатионредуктазы (а) и соотношение окисленной и восстановленной форм глутатиона (б)

Таким образом, облучение растений в обеих дозах инициировало пролонгированный ответ растительной клетки, реализующийся, в том числе, в развитии окислительного стресса в хлоропластах уже после снятия воздействия источника АФК.

Существует двойное представление о роли супероксидного анион-радикала в развитии стрессовой реакции: является ли он побочным продуктом функционирования окислительных систем, своеобразным «метаболическим шумом» или имеет позитивную функцию.

В работах Kozenko et al. (1997) показано, что повышенная концентрация супероксидного анион-радикала в среде может ингибировать активность АП. В

то же время пероксид водорода способен активировать СОД, однако этот эффект имеет колоколообразную зависимость, и избыток  $\text{H}_2\text{O}_2$  может обуславливать неспецифическую пероксидазную активность СОД, что не только тормозит дисмутацию супероксида, но способствует еще большей его наработке (Liochev, Fridovich, 1999).

Подобный сценарий ответа прооксидантно-антиоксидантной системы был получен в наших экспериментах в результате облучения в дозе 1 Гр. Доза 1 Гр не вызывала накопления токсичных продуктов липопероксидации в течение всей экспозиции. Однако уровень первичных продуктов ПОЛ – ДК всегда поддерживался на стационарном уровне – несколько выше контрольного. Изменение структурных характеристик мембраны вследствие диеновой конъюгации способствовало усиленной генерации  $\text{O}_2^{\bullet-}$  по сравнению с контролем и образцами, облученными в дозе 0,1 Гр. Однако дальнейшее развитие ПОЛ контролировалось системой низкомолекулярных антиоксидантов и ферментом первой линии защиты – СОД, активность которой тем не менее поддерживалась на некотором граничном уровне за счет образования пероксида и ингибирования цикла его утилизации.

Таким образом, в течение длительного периода последствий радиации в дозе 1 Гр происходила генерация супероксида самими мембранами хлоропластов. Этот механизм, по-видимому, мог иметь адаптивный эффект.

Иной эффект имела доза 0,1 Гр. В результате облучения происходил быстрый ответ антиоксидантов первой линии защиты: существенно возрастала активность СОД, быстро окислялись низкомолекулярные антиоксиданты. Быстрая реакция защитных механизмов приводила к восстановлению нормального уровня продуктов ПОЛ, и через 30 мин после облучения содержание ДК и МДА было даже ниже контроля. Однако дальнейшая активация АО спустя 1 ч после радиационного воздействия не предотвращала развития деструктивных процессов на мембранах, приводя к накоплению МДА.

Подобные парадоксальные кривые, когда меньшая доза вызывала более значительные последствия для клетки, были получены в результате облучения в малых дозах для самых разнообразных показателей физиологической активности (Кузин, 1980; Бурлакова, 1994; Жижина, 1999; Эйдус, 2001).

**2. Модулирующее действие предварительного облучения ионизирующей радиацией на перекисный гомеостаз хлоропластов гороха при гипертермии.** Исследование закономерностей проявления биологических эффектов при комбинированных воздействиях может прояснить механизмы усиления или ослабления радиационных эффектов. В связи с этим в экспериментах применялась последующая гипертермия к облученным растениям.

Ранее было установлено, что к 30 мин теплового шока ( $42^\circ\text{C}$ ) все процессы, характерные для стадии тревоги стресс-реакции, ярко выражены (Курганова и др., 1999; Веселов, 2001). Используя эти предварительные результаты, была поставлена серия опытов по исследованию воздействия

гипертермии (42° С в течение 30 мин) на хлоропласты предварительно облученных в дозах 0,1 и 1 Гр растений гороха.

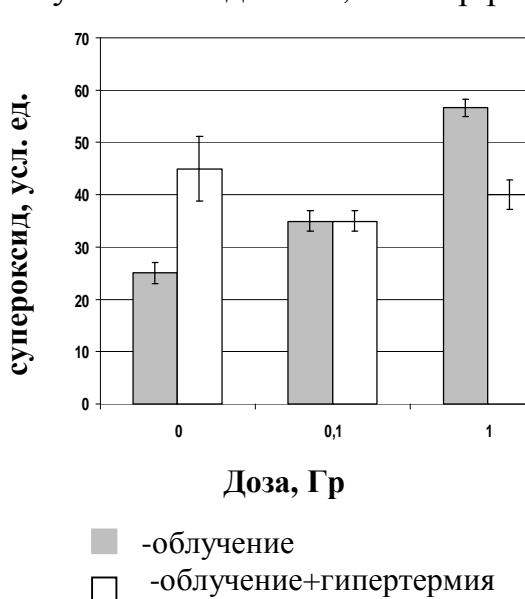


Рис. 6. Содержание супероксида в хлоропластах предварительно облученного гороха после гипертермии

В данной работе 30-минутная гипертермия необлученных растений вызывала усиленную генерацию супероксидного анион-радикала (рис.6). Подобный эффект отмечался многими исследователями и объяснялся как результат утечки электронов на молекулярный кислород ввиду разобщения работы фотосистем (Курганова, Сеницына, Веселов, 2001), тепловой инактивации антиоксидантных белков и ускорения свободнорадикальных процессов на мембранах (Alscher, Donahue, Cramer, 1997). Предварительное облучение в обеих дозах корректировало интенсивность продукции супероксида на мембранах хлоропластов: его содержание было на 20-30% ниже по сравнению с необлученным контролем, подвергнутым гипертермии.

Гипертермия приводила к возрастанию интенсивности ПОЛ, которое выражалось в накоплении промежуточных и конечных продуктов липопероксидации: ДК – в 3 раза и МДА – в 2 раза относительно контроля (рис.7)

Последствие дозы облучения 0,1Гр не сказывалось существенно на образовании ДК, однако приводило к возрастанию уровня МДА. Доза 1 Гр заметно корректировала протекание липопероксидации: содержание ДК падало в 2,5 раза по сравнению с хлоропластами необлученных растений, подвергнутых гипертермии. Аналогично, концентрация МДА почти в 2 раза снижалась по сравнению с обработанным контролем.

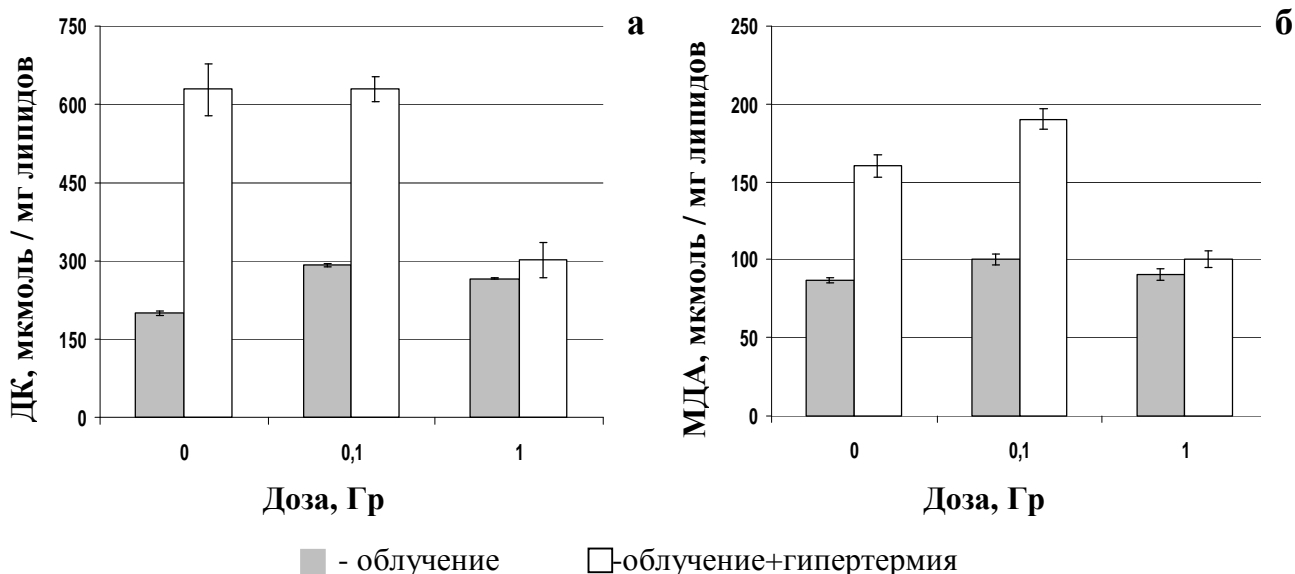


Рис. 7. Содержание продуктов ПОЛ: ДК (а) и МДА (б) в хлоропластах предварительно облученных растений гороха после гипертермии

Таким образом, в проведенных экспериментах была получена различная реакция хлоропластов облученных в двух дозах и подвергнутых последующей гипертермии растений.

Предварительное облучение в дозе 0,1 Гр вызывало гиперчувствительность хлоропластов к повышенной температуре, что выразалось в развитии значительно более серьезных деструктивных изменений в мембранах хлоропластов растений после гипертермии, чем при воздействии высокой температуры на контрольные экземпляры. Этот эффект обусловлен суммированием последствий воздействия обоих факторов, т.к. в результате последствия радиации в данной дозе происходило лишь незначительное накопление токсичных продуктов. Явление синергизма при терморациационном воздействии широко известен и применяется практически, например, для стерилизации и лучевой терапии (Кузин, Каушанский, 1981; Петин, Комаров, 1989). Однако причины такой реакции, проявление которой подчиняется нелинейному закону зависимости «доза-эффект», является широко обсуждаемым вопросом.

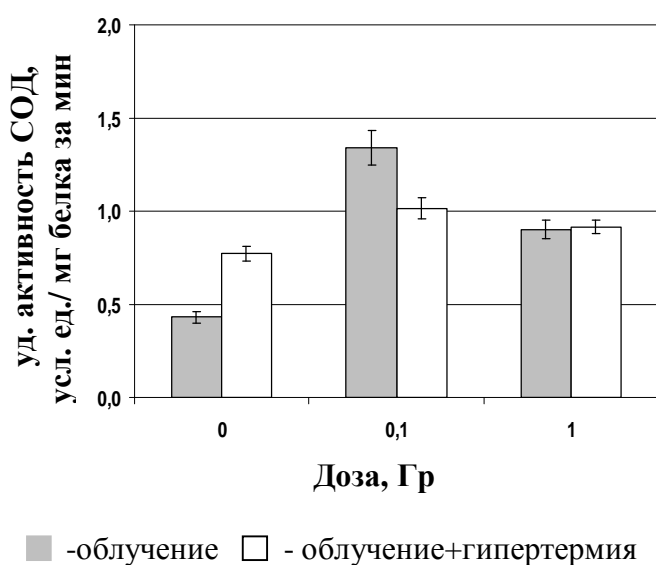


Рис. 8. Активность СОД в хлоропластах облученного гороха после гипертермии

Причиной развития окислительной деструкции хлоропластов может быть истощение резервов антиоксидантной защиты: если через 30 мин после облучения активность СОД при этой дозе была максимальна, то в результате последующей гипертермии она имела более низкий уровень (рис.8). Активность ключевого фермента второй линии защиты – аскорбатпероксидазы – также была ниже после гипертермии (рис. 9а). Таким образом, ключевая роль в восстановлении перекисного гомеостаза, нарушенного

последовательным действием облучения и повышенной температуры, по-видимому, принадлежала низкомолекулярным антиоксидантам и ферментативным системам их репарации, так как к моменту начала термического воздействия на 30-й минуте послерадиационной экспозиции происходило включение синтеза восстановленного глутатиона (рис. 5б), а после гипертермии активировалась глутатионредуктаза - фермент, катализирующий рециклирование глутатиона (рис. 9б).

Предварительное облучение в дозе 1 Гр обуславливало иной тип ответа хлоропластов на гипертермию: она адаптировала объект к последующему

тепловому шоку. Адаптивный ответ обычно проявляется в виде повышения устойчивости к действию облучения в высоких дозах при условии предварительного облучения в малых (Пелевина и др., 2000; Бурлакова и др., 1999). В проведенных исследованиях предварительное облучение индуцировало адаптивный ответ к воздействию стрессора иной природы – к гипертермии. Адаптивный ответ является одним из проявлений феномена радиационного гормезиса – биопозитивного эффекта воздействия радиации в малых дозах (Ohyama, Wang, Yukawa, 2004).

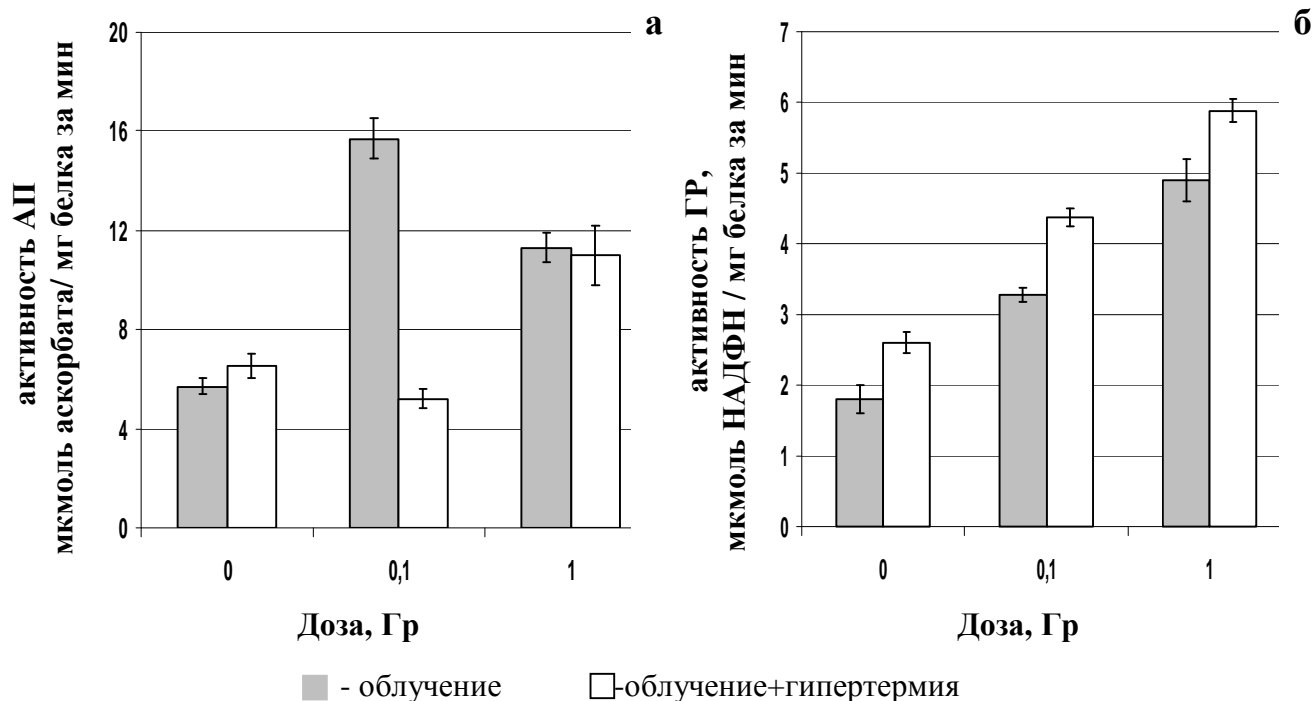


Рис. 9. Активность аскорбатпероксидазы(а) и глутатионредуктазы(б) в хлоропластах облученного гороха после гипертермии

В проведенных экспериментах к моменту начала теплового воздействия растений фермент первой линии защиты – СОД был значительно активирован, но гораздо в меньшей степени, чем в случае облучения в дозе 0,1Гр, вызывавшей гиперчувствительность. Вероятно, в связи с сохранением некоторого граничного уровня активности СОД, его субстрат – супероксидный анион-радикал генерировался на достаточно высоком уровне, что, однако, не активировало накопление токсичных продуктов ПОЛ, но поддерживало генерацию начальных продуктов на некотором стационарном уровне. Это состояние не изменялось и после часовой экспозиции, и после воздействия гипертермии. Данный факт может свидетельствовать в пользу некоторой сигнальной роли супероксида в активировании систем защиты от повреждающего действия стрессоров, которая реализуется через активирование протекания первичных стадий ПОЛ, не приводящих к образованию вредных для клетки продуктов.

В работах Г.И. Жижиной (1999) также одним из возможных механизмов переключения клеток в новый режим функционирования при радиационном воздействии указывается изменение конформационного состояния мембран.

Результатом таких изменений в наших экспериментах стала активация ключевых ферментов аскорбат-глутатионового цикла - АП и ГР после гипертермии растений облученных в дозе 1 Гр, чего не происходило в случае гипертермии необлученных растений и при тепловой обработке после облучения в дозе 0,1 Гр.

Подобный эффект был получен в многочисленных исследованиях группы Е.Б. Бурлаковой (1999), на основании которых была предложена модель, согласно которой более интенсивное облучение или облучение в более высоких дозах в пределах малых быстрее включает системы репарации радиационных повреждений. Это может объяснять парадокс гормезиса, вызванного более высокой дозой (1Гр), на фоне гиперчувствительности к гипертермии при предварительном облучении в меньшей дозе (0,1 Гр). Предполагаемым активатором защитных систем, вероятно, является эндогенный супероксидный анион-радикал.

**3. Воздействие низкочастотного магнитного поля на перекисный гомеостаз хлоропластов растений гороха.** Постоянное увеличение количества и мощности устройств, создающих при своей работе МП, привело к тому, что значительная часть экосистем находится под непрерывным действием магнитных полей (Прессман, 1968; Плеханов, 1987; Martinez, Carbonell, Florez, 2002; Петин, 2006). Слабое низкочастотное магнитное поле является проникающим агентом внешней среды, которое одновременно влияет как на системные механизмы, так и на структурно-метаболические процессы на уровне клеток и тканей организма. Но специфические сенсоры клетки, которые принимают и преобразуют внешний сигнал об изменении характеристик МП в реакцию живой системы до настоящего времени не выявлены (Рыбаков, 1995; Трошин, Мясников, Белоусова, 1995). Было показано, что для МП с индукцией порядка естественного геомагнитного фона наиболее вероятным и значимым является механизм спинового запрета на скорости биохимических реакций, протекающих через стадию взаимодействия двух радикалов (Орлов, 1995).

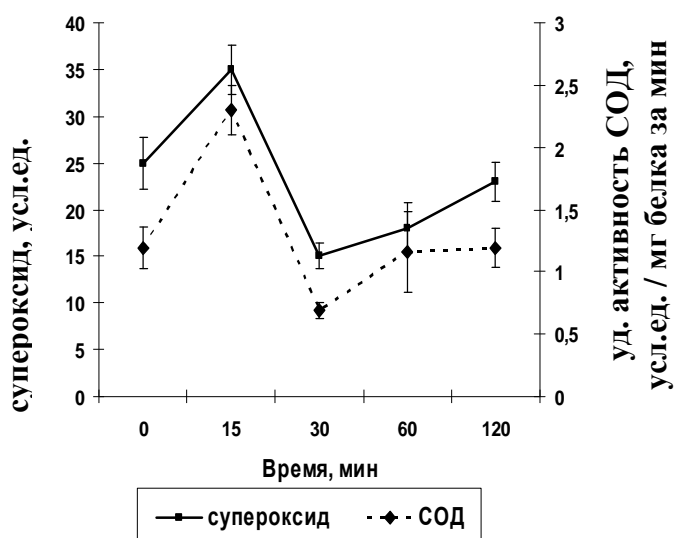


Рис. 10. Динамика накопления супероксида и активности СОД в

хлоропластах гороха при воздействии переменного магнитного поля на внешнее МП интерес представляет исследование изменений в системе перекисного гомеостатирования клеточных мембран, которые способны отвечать на стрессирующие воздействия усилением генерации АФК, в том числе и радикальных продуктов восстановления кислорода.

В данных экспериментах при воздействии МП происходили колебания в содержании одной из основных форм активированного

В связи с этим, в исследованиях реакции растительного организма

кислорода – супероксидного анион-радикала (рис.10). Причем, уже к 15 мин воздействия МП происходил рост скорости генерации этого радикала на мембранах хлоропластов, и его уровень на треть возрастал по сравнению с контролем. Еще 15 мин экспозиции приводили к снижению образования этого радикала на 40% от контроля, а после 2-х часов воздействия МП оно вновь достигало контрольного уровня. МП изменяло прооксидантно-антиоксидантный статус хлоропластов гороха, причем

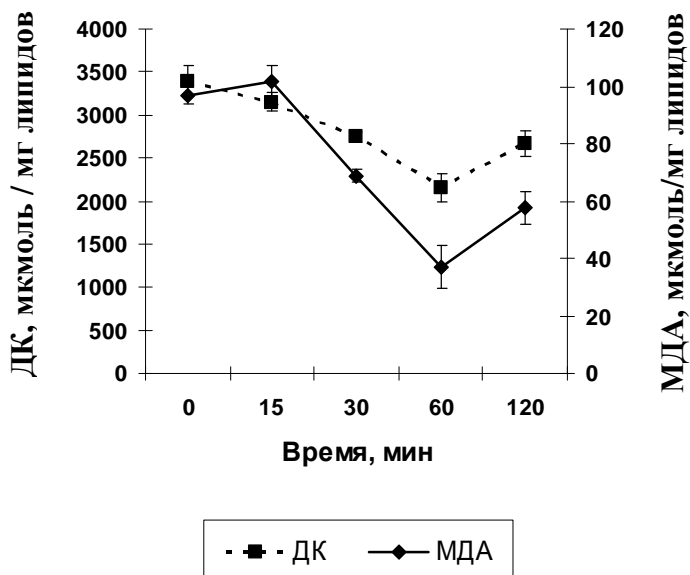


Рис. 11. Динамика содержания продуктов ПОЛ в хлоропластах гороха при воздействия переменного магнитного поля

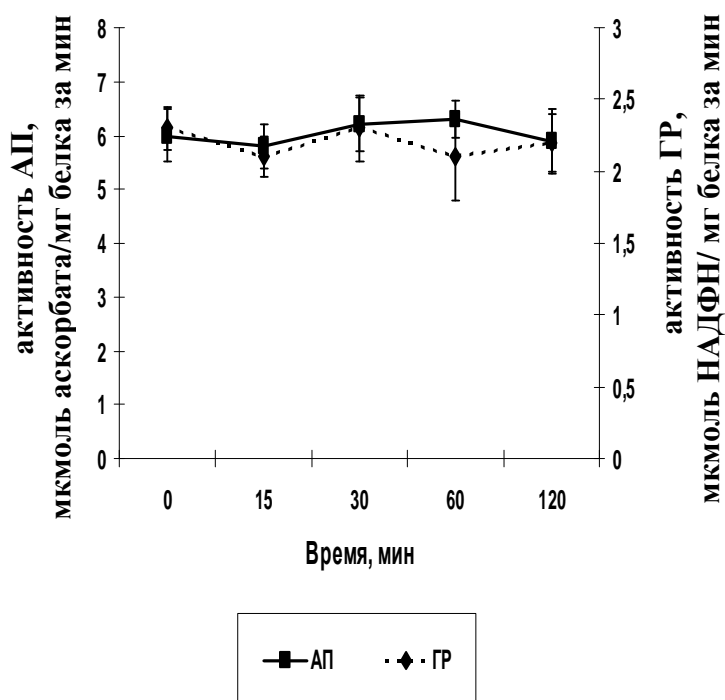


Рис. 12. Динамика активности



аскорбатпероксидазы и глутатионредуктазы в хлоропластах гороха при воздействия переменного магнитного поля

уже на интервале от 0 до 15 мин воздействия происходила быстрая активация генерации свободных радикалов. Однако быстрый ответ антиоксидантов первой линии защиты – низкомолекулярных антиоксидантов и СОД, активность которой возрастала на 68% относительно контроля, исключили развитие ПОЛ (рис. 11). Дальнейшая обработка полем приводила к некоторому ингибированию окислительных процессов, что выражалось в снижении содержания продуктов ПОЛ: минимум содержания ДК и МДА приходился на 60 мин и составил 63,7% и 38,2% соответственно (рис.11). Этот факт, по-видимому, находит объяснение в падении

скорости генерации супероксидного анион-радикала, что отразилось также и на снижении активности СОД на 20-40%, которая является субстрат-индуцируемым ферментом. К 120 мин воздействия эти показатели ПОЛ начинали возрастать, однако так и не достигли начальной величины. Ферменты аскорбат-глутатионового цикла не реагировали на воздействие МП (рис. 12), и последствия всплеска продукции  $O_2^{\bullet-}$  в начале экспозиции отразились на соотношении окисленных и восстановленных форм низкомолекулярных антиоксидантов: самые низкие концентрации аскорбата (41% от контроля) и глутатиона (68% от контроля) приходились на 15 мин экспозиции. Причем ответ систем синтеза аскорбата и глутатиона носили фазный характер: в начале экспозиции срабатывала система компенсации пула аскорбата, при дальнейшей обработке – включался синтез глутатиона (рис.13).

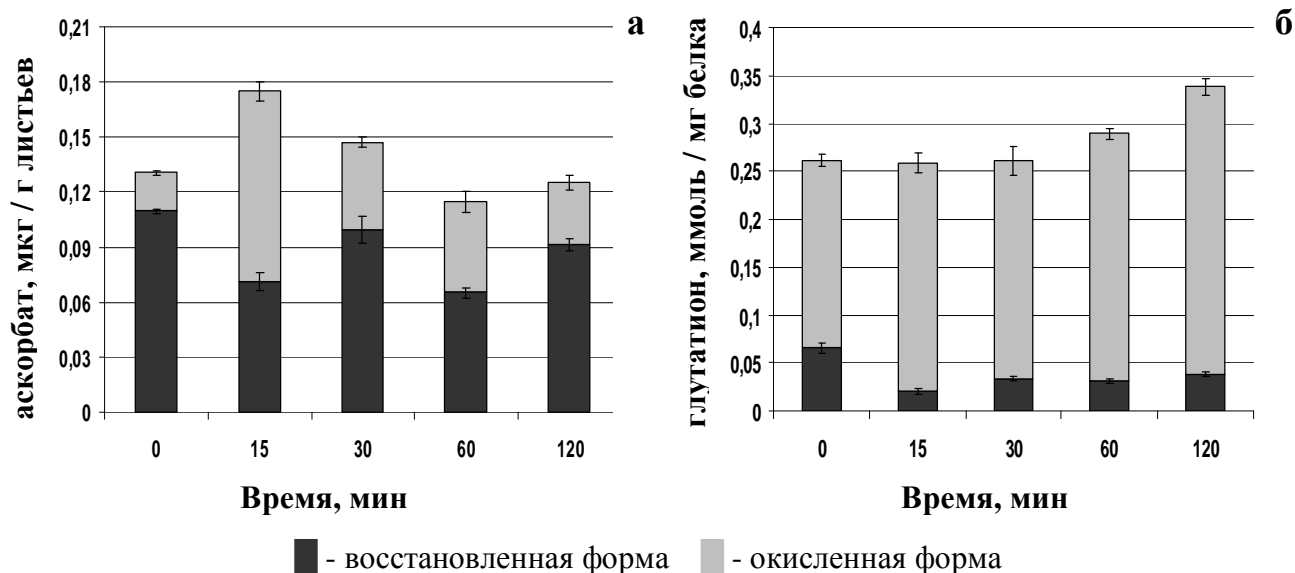


Рис. 13. Содержание аскорбата (а) и глутатиона (б) в хлоропластах гороха при воздействии переменного магнитного поля

В целом, МП модулировало прооксидантно-антиоксидантное равновесие, причем, очевидно, первичный всплеск продукции супероксида носил скорее сигнальный характер, не вызывая активации окислительных процессов и мобилизуя системы защиты от возможных повреждающих воздействий, ключевыми среди которых были СОД и низкомолекулярные антиоксиданты.

В настоящее время широко обсуждается вопрос об изменении свойств биомембран, как об основном эффекте МП на живую клетку (Новиков, 1998; Шибарова, Орлова, Лобкаева, 2004). В частности, в работах Г.В. Новицкой и др. (2006) делается вывод о корригирующих свойствах низкочастотных МП на качественный состав липидов мембран проростков редиса. В многочисленных работах приводятся сведения об изменении работы  $Ca^{2+}$ -каналов под действием МП (Creanga et al., 2002; Lednev, 1996). Эти эффекты могут обуславливать разобщение свободнорадикальных процессов, протекающих на мембранах хлоропластов и интенсификацию генерации супероксида в проведенных экспериментах, а также накопление в хлоропластах аскорбата уже в первые минуты воздействия МП, которое могло происходить за счет его проникновения из цитозоля в результате изменения проницаемости мембран.

Быстрый ответ систем поддержания перекисного гомеостаза был получен ранее при кратковременной гипертермии растений гороха (Курганова и др., 1999; Веселов, 2001), при воздействии низкоинтенсивной ионизирующей радиации (Синицына и др., 2004) и различных концентраций параквата (Балалаева, 2004; Лихачева, 2002). Ответ хлоропластов по результатам этих работ развивался также уже в первые 5-15 мин.

Полученные результаты могут свидетельствовать в пользу неспецифического ответа со стороны растительного организма на воздействия МП, как и на любой другой фактор, не зависимо от природы и механизмов взаимодействия с клеткой. Причем, вероятно, сигналом для запуска защитных

систем может служить продукция клеткой собственных АФК, в частности по данным результатам - супероксидного анион- радикала.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Полученные результаты свидетельствуют в пользу неспецифического ответа со стороны растительной клетки на слабое воздействие физических факторов, не зависимо от их природы. Такая ответная реакция заключается в быстром сдвиге прооксидантно-антиоксидантного равновесия в сторону активации ПОЛ, что, однако, при условии такого же быстрого включения защитных механизмов, не приводит к развитию деструктивных процессов на мембранах. Сигналом для активации защитных систем, вероятно, может служить продукция клеткой собственных АФК, в частности - супероксидного анион-радикала. Нелинейный и парадоксальный характер зависимости «доза-эффект» при слабых воздействиях может являться следствием наличия некоторого порога дозы, достижение которого является необходимым для запуска приспособительных к действию этих факторов реакций. В противном случае недостаточная активация защитных механизмов влечет за собой серьезное нарушение прооксидантно-антиоксидантного баланса и развитие окислительной модификации биомолекул. Быстрый и ярко выраженный ответ хлоропластов на воздействие слабых физических факторов говорит о сенсорной роли этих органелл, которая заключается в рецепции и усилении сигнала об изменении окружающей среды.

## ВЫВОДЫ

1. В результате воздействия на растения гороха ионизирующей радиации в малых дозах и низкоинтенсивного магнитного поля происходило быстрое повышение уровня супероксидного анион-радикала на фоне быстрой активации СОД и окисления низкомолекулярных антиоксидантов хлоропластов. Такой быстрый ответ антиоксидантов первой линии защиты снижал содержание продуктов перекисного окисления липидов. Ферменты аскорбат-глутатионового цикла реагировали на воздействие исследуемых факторов позже.

2. Ответ прооксидантно-антиоксидантной системы хлоропластов на воздействие слабых физических факторов имел парадоксальный характер: меньшая доза вызывала больший отклик системы.

3. Радиоактивное облучение в малых дозах имело эффект длительного последствия, выразившийся в модуляции ответа растений на последующую гипертермию. Получены два типа ответа предоблученных растений на гипертермию: доза 0,1 Гр приводила к развитию гиперчувствительности хлоропластов к повышенной температуре, доза 1Гр обуславливала адаптивный ответ к гипертермии.

4. Динамика изменений показателей перекисного гомеостаза при воздействии низкоинтенсивного переменного магнитного поля имела нелинейную динамику, что являлось следствием активации защитных резервов в первые минуты экспозиции.

5. Активация защитных механизмов к действию стрессирующих факторов связана с повышением уровня эндогенного супероксидного анион-радикала.

6. Ответ системы перекисного гомеостаза неспецифичен по отношению к воздействию факторов физической природы, различных по природе и механизмам взаимодействия с биологическими объектами.

**СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Курганова Л.Н., Синицына Ю.В., Балалаева И.В., Федорова Е.О., **Половинкина Е.О.** Влияние малых доз радиации на функциональное состояние мембран хлоропластов растений гороха (*Pisum sativum* L.) // Материалы конференции «Экологическая и промышленная безопасность». - Саров, 2003. - С. 175-178.
2. Балалаева И.В., **Половинкина Е.О.**, Соколова В.А., Бердникова М.В. Модуляция прооксидантно-антиоксидантного равновесия хлоропластов растений малыми дозами ионизирующей радиации // Материалы III Всероссийской молодежной научной конференции по фундаментальным проблемам радиохимии и атомной энергетики. Нижний Новгород, 2004. – С.16.
3. **Половинкина Е.О.**, Федорова Е.О., Синицына Ю.В., Балалаева И.В. Ответная реакция хлоропластов гороха на действие малых доз ионизирующей радиации // Материалы 8-ой Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». Пушино, 2004. –С.66.
4. **Половинкина Е.О.** Изменение прооксидантно-антиоксидантного баланса хлоропластов гороха как ответная реакция на облучение малыми дозами радиации // Материалы XVII межвузовской конференции «Актуальные проблемы естествознания». Нижний Новгород, 2004. –С.59.
5. Балалаева И.В., **Половинкина Е.О.** Развитие окислительного стресса хлоропластов растений при действии стрессирующих факторов различной природы // Материалы IX Нижегородской сессии молодых ученых «Естественные дисциплины. Нижний Новгород, 2004 – С. 202-203.
6. Синицына Ю.В., **Половинкина Е.О.**, Чернышева М.И. Динамика перекисного гомеостаза в хлоропластах гороха (*Pisum sativum* L.) в связи с облучением малыми дозами ионизирующей радиации // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. Серия Биология. Вып 1(11). Нижний Новгород. 2006. – С. 81-83
7. **Половинкина Е.О.**, Чернышева М.И., Андреев О.В., Бердникова М. В. Изменение перекисного гомеостаза при действии на растения гороха низкоинтенсивного ионизирующего излучения с последующей гипертермией // Материалы X Нижегородской сессии молодых ученых «Естественные дисциплины». Нижний Новгород, 2005.- С.216.
8. **Polovinkina E. O.** The theory of oxidative stress and the effects of low-dose radiation // Materials of the IX European Young Investigator Symposium “SymBioSE-2005” - Helsinki, 2005. – P. 35.
9. **Половинкина Е.О.**, Ежевская М.А., Прохорова В.Г. Ответная реакция хлоропластов облученных растений гороха на гипертермию // Материалы XI Нижегородской сессии молодых ученых «Естественные дисциплины. Нижний Новгород, 2006.- С. 195-196.
10. **Половинкина Е.О.**, Бердникова М.В., Прохорова В.Г. Перекисное окисление липидов в общеклеточной суспензии из листьев предоблученных растений гороха при гипертермии // Материалы 10-ой Международной

Пуцинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». Пушино, 2005. –С.66.

11. **Половинкина Е.О.**, Веселов А.П., Курганова Л.Н., Ежевская М.А., Васильева Е.А. Модифицирующее действие ионизирующего облучения в малых дозах на перекисный гомеостаз растений гороха при тепловом шоке // Материалы Годичного собрания общества физиологов растений. Ростов-на-Дону, 2006. – С. 198.

12. **Половинкина Е.О.**, Чернышева М.И., Прохорова В.Г., Токарева Е.В. прооксидантно-антиоксидантное равновесие в хлоропластах растений гороха при радиоактивном облучении в малых дозах в сочетании с гипертермией // Материалы 11-ой Международной Пуцинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». Пушино, 2006. –С.305.

13. **Е. Polovinkina**, M. Yezhevskaya, E. Vasilieva. The adaptive response to high-temperature shock in chloroplasts from *Pisum sativum* L. exposed to low-dose [gamma]-radiation // Proceedings of the I(IX) Conference of Young Botanists in Saint-Petersburg. - Saint-Petersburg, 2006. – P. 185.

14. Kurganova L.N., Sinitsina J.V., **Polovinkina E.O.**, Chernisheva M.I., Ezhevskaya M.A. Free oxygen radicals are involved in plant cell signal passway inducing by the low doses of ionizing radiation // Abstracts of the second international symposium “Signaling systems of plant cells: role in adaptation and immunity”. - Kazan, 2006. – P.P.205-206.

15. **Е. Polovinkina**, L. Kurganova, J. Sinitsina, A. Veselov, M. Chernisheva, A. Sinelschikov. Effects of low dose irradiation on prooxidant-antioxidant balance in *Pisum sativum* chloroplasts // Abstracts of the 35<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Radiation Research Society and the 4<sup>th</sup> Annual Meeting of the Ukrainian Society for Radiation Biology ‘European Radiation Research – 2006’. - Kyiv, 2006. – P. 220

16. **Половинкина Е.О.**, Васильева Е.А. Модуляция перекисного гомеостаза мембран хлоропластов гороха переменным магнитным полем // Материалы Международной конференции по фундаментальным наукам среди студентов и аспирантов «Ломоносов-2007». – Москва, МГУ, 2007 – С. 271.

## СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АО – антиоксидантный  
 АП - аскорбатпероксидаза  
 АФК – активные формы кислорода  
 ГР – глутатионредуктаза  
 ДК – диеновые конъюгаты  
 МД – малые дозы  
 МДА – малоновый диальдегид  
 МП – магнитное поле

ПОЛ – перекисное окисление липидов  
 СОД – супероксиддисмутаза  
 ФЭТЦ – фотосинтетическая электрон-транспортная цепь  
 GSH, GSSG – восстановленный и окисленный глутатион