

УДК 581.1

**ИЗМЕНЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ПАРАМЕТРОВ ПЕРЕКИСНОГО ГОМЕОСТАЗА  
ХЛОРОПЛАСТОВ ГОРОХА В ОТВЕТ НА ДЕЙСТВИЕ  
ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НИЗКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ**

© 2010 г.

*Е.А. Васильева, Ю.В. Сеницына, Е.О. Половинкина,  
М.И. Цыганкова, А.П. Веселов*

Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

katelyn@bk.ru

Поступила в редакцию 02.10.2009

Ионизирующее излучение в малых дозах и низкоинтенсивное переменное магнитное поле вызывают быстрое снижение уровня продуктов перекисного окисления липидов при активации антиоксидантной системы. Увеличение интенсивности физических факторов приводит к исчерпанию ресурсов защитных систем и нарастанию процессов окисления. Наблюдаемые изменения носят схожий характер, что говорит в пользу их неспецифичности.

*Ключевые слова:* ионизирующее излучение, переменное магнитное поле, малые дозы, растения, перекисный гомеостаз.

**Введение**

Человек и биосфера миллионы лет существовали в сравнительно узком диапазоне изменения таких параметров, как естественный радиационный фон Земли, напряженности постоянных электрических и магнитных полей. Однако с развитием цивилизации, открытием и активным использованием энергии атомного распада, искусственных источников постоянных и переменных электрических и магнитных полей интенсивность этих физических факторов среды в биосфере возросла [1]. Причем, если действием больших доз этих факторов интересуются давно, то изучение механизмов воздействия малых доз ионизирующей радиации (ИИ) и низкоинтенсивного магнитного поля началось лишь в середине XX века.

Возникновение эффектов малых доз ИИ связывают с его воздействием на мембраны клетки, в отличие от облучения большими дозами, когда главной мишенью является ДНК [2]. При облучении имеет место образование активных форм кислорода (АФК), приводящее к смещению прооксидантно – антиоксидантного равновесия в сторону перекисного окисления липидов, что является пусковым механизмом окислительного стресса [3], причем в фототрофных тканях его развитие связано, в первую очередь, с хлоропластами [4].

Возможные механизмы влияния слабых переменных и постоянных магнитных полей на биологические процессы широко обсуж-

даются. Показано воздействие комбинированных полей на скорости гравитропической реакции через Са-зависимые ферменты и процесса гидролиза ряда белков и пептидов; переменных магнитных полей частотой 50 Гц на набухание семян через усиление активности эстераз [5, 6]. При этом в качестве первичных рецепторов предлагаются липиды, в том числе липиды бислоя мембран. Более тонкие механизмы воздействия магнитных полей мало изучены.

**Материалы и методы**

Объектом исследования служили двухнедельные растения гороха *Pisum sativum L.*, сорта «Альбумен», выращенные в лабораторных условиях.

В качестве источника ионизирующего излучения использовали  $\gamma$ -<sup>60</sup>Со-источник, дозы облучения 0.1 и 1 Гр, входящие в интервал малых для растительного организма. Измерения проводили через 30 мин после облучения, контролем служили необлученные растения. Для генерации магнитного поля использовалась магнитотерапевтическая установка УМТИ-3Ф «Коллибри», создававшая вихревое импульсное низкоинтенсивное магнитное поле со значением магнитной индукции 3.5 мТл, частотой магнитного поля в соленоиде 100 Гц, максимальной амплитудой силы тока в соленоиде  $25 \pm 3$  мА. Длительность экспозиции 15, 30, 60 и 120 мин. Контролем служили растения, выдержанные в

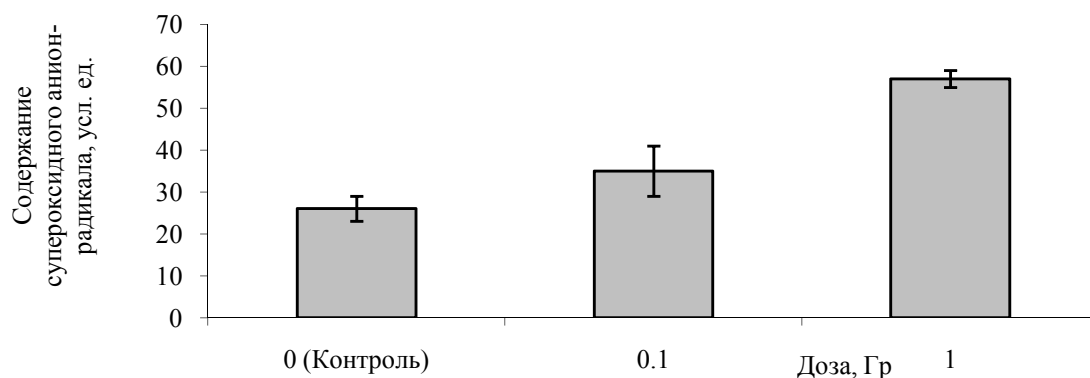


Рис. 1. Содержание супероксидного анион-радикала в хлоропластах гороха после облучения

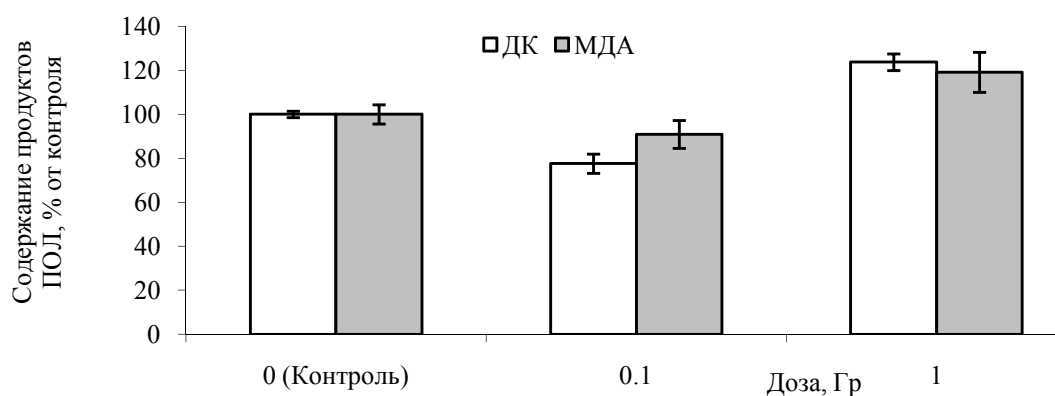


Рис. 2. Содержание продуктов ПОЛ в хлоропластах гороха после облучения

течение экспозиции в условиях нормального геомагнитного поля.

Выделение суспензии хлоропластов проводили методом дифференциального центрифугирования [7]. Для оценки перекисного гомеостаза исследовали содержание супероксидного анион-радикала методом ЭПР с использованием спиновой ловушки тирон [8], определяли содержание диеновых конъюгатов (ДК) [9], малонового диальдегида (МДА) [10], активность антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы (СОД) [11], аскорбатпероксидазы (АП) [12], глутатионредуктазы (ГР) [13].

Статистическую обработку результатов (подсчет среднего и ошибки среднего) проводили методом параметрической статистики по Гланцу [14]. Достоверность данных определяли с помощью коэффициента Стьюдента с поправкой Бонферрони.

### Результаты и их обсуждение

*Влияние малых доз ионизирующего облучения на перекисный гомеостаз хлоропластов гороха.* При облучении имеет место образование АФК. Наибольший выход имеют гидроксил-радикал и гидратированный электрон ( $\text{OH}^{\bullet}$  и  $\bar{e}_{\text{гидр}}$ ). Облада-

дая высокой реакционной способностью, они взаимодействуют с молекулярным кислородом и макромолекулами, при этом образуются более долгоживущие АФК:  $\text{O}_2^{\bullet-}$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$ , способные к миграции через мембраны и инициирующие цепные процессы перекисного окисления [3].

Согласно полученным данным, после воздействия ИИ продукция супероксидного анион-радикала возросла в 1.5 раза (доза 0.1 Гр) и в 2.3 раза (доза 1 Гр) (рис. 1).

Накопление АФК вызывает в липидах перекисное окисление полиненасыщенных жирных кислот, образование свободного радикала приводит к делокализации двойной связи, в результате которой в гидроперекисях жирных кислот появляется система сопряженных двойных связей (диеновая конъюгация), одним из конечных продуктов подобного окисления является малоновый диальдегид [3].

После облучения в дозе 0.1 Гр содержание диеновых конъюгатов снижалось, а при дозе 1 Гр достоверно увеличивалось на 24%. Содержание МДА после облучения в дозе 0.1 Гр достоверно не отличалось от контроля, в дозе 1 Гр увеличилось примерно на 20% (рис. 2).

Частью «первой линии» защиты клетки от АФК, включающейся на самых ранних этапах

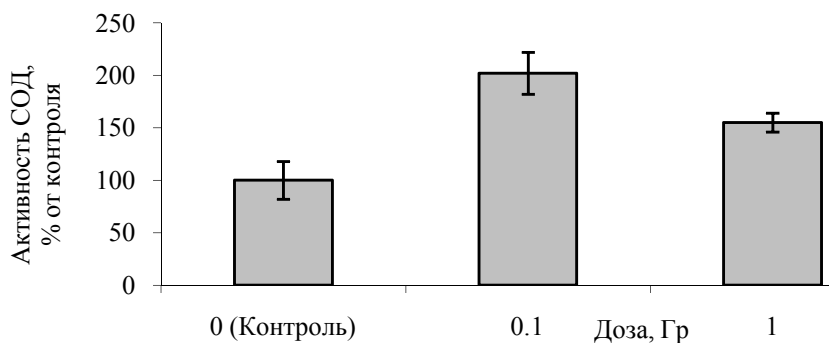


Рис. 3. Активность СОД в хлоропластах гороха после облучения

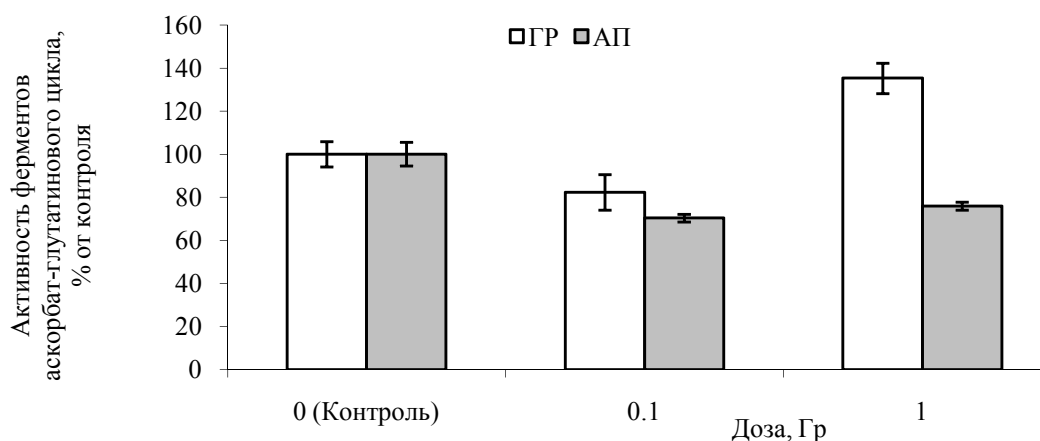


Рис. 4. Активность ферментов аскорбат-глутатинового цикла в хлоропластах гороха после облучения

окислительного стресса, является СОД, обезвреживающая супероксидный анион-радикал.

При дозе облучения 0.1 Гр активность СОД возросла в 2 раза, а при 1 Гр несколько снижалась, но оставалась высокой, составляя 155% от контроля (рис. 3).

Результатом работы СОД является генерация пероксида водорода, который в клетке восстанавливается каталазой. Однако каталаза отсутствует в хлоропластах и ее функцию выполняет аскорбат-глутатионовый цикл, с участием низкомолекулярных антиоксидантов – глутатиона и аскорбиновой кислоты, а также ферментов, среди которых ключевыми являются аскорбатпероксидаза и глутатионредуктаза [15].

После облучения активность аскорбатпероксидазы в обеих облученных пробах составляла около 70% от контроля. Активность глутатионредуктазы уменьшалась на 18% в пробе, соответствующей дозе облучения 0.1 Гр и увеличивалась на 35% от контроля после облучения дозой 1 Гр (рис. 4).

Увеличение генерации супероксида при активной работе СОД и снижение активности ферментов аскорбат-глутатинового цикла – главных утилизаторов  $H_2O_2$  в хлоропластах –

должны были приводить к образованию пероксида водорода и его накоплению в строме хлоропластов. Снижение процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) после облучения растений в дозе 0.1 Гр говорит о том, что главную защитную роль берут на себя другие компоненты антиоксидантной системы, например низкомолекулярные антиоксиданты – аскорбат и глутатион, что было показано ранее нашей группой [16].

Низкомолекулярные антиоксиданты – исчерпывающийся при отсутствии работы регенерирующих систем компонент антиоксидантной защиты. Резкое увеличение генерации супероксида в дозе 1 Гр при снижении активности аскорбатпероксидазы и переходе аскорбата и глутатиона в окисленную форму должно было вызвать увеличение концентрации пероксида водорода. Следствием этого могло стать ингибирование чувствительных к  $H_2O_2$  изоформ СОД хлоропластов, а также изменение активности этого фермента на пероксидазную, усиливающую генерацию супероксида [17]. Все эти процессы, по-видимому, и привели к росту процессов перекисного окисления липидов в условиях наших экспериментов.

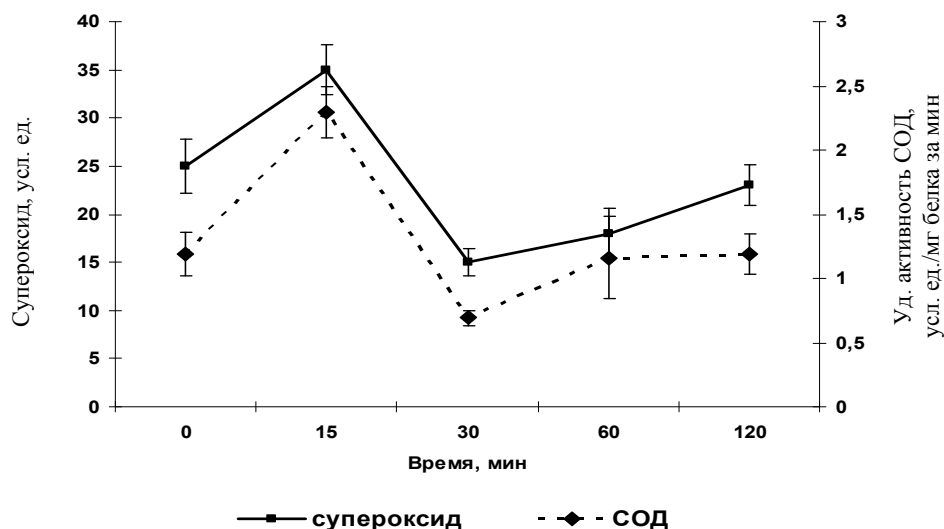


Рис. 5. Активность СОД в хлоропластах гороха после воздействия магнитным полем

Механизм ингибирования аскорбатпероксидазы и глутатионредуктазы может быть двояким, так как эти ферменты являются NADPH-зависимыми, а для работы цикла необходимы восстановленные формы глутатиона и аскорбиновой кислоты. С одной стороны, увеличение генерации супероксида говорит о действии ИИ на АФК-продуцирующие компоненты электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) хлоропластов, что может вызывать сбои в ее работе и, как следствие, недостаток восстановительных эквивалентов в строме хлоропластов. С другой стороны, увеличение продукции пероксида водорода в строме хлоропластов вызывает переход аскорбата и глутатиона в окисленную форму.

Л.Х. Эйбус [18] высказывает мнение, что эффекты малых доз обуславливаются нарушением функций мембран, а следовательно, и изменением содержания низкомолекулярных соединений в клетке, однако при слабых воздействиях репарация мембран предупреждает возникновение эффектов малых доз, которые проявляются с ростом дозы или ее мощности, когда нарастание повреждений мембран превышает скорость их репарации. С этой точки зрения активация глутатионредуктазы после действия дозы 1 Гр могла быть проявлением стимулирующего эффекта малых доз в условиях увеличения липопероксидации, что может говорить о включении механизмов регенерации «первой линии» антиоксидантной защиты и начале развития адаптивного ответа.

*Влияние низкочастотного магнитного поля на перекисный гомеостаз хлоропластов гороха.* Ряд органических реакций, при которых происходит перенос электрона через образование про-

межучного соединения, содержащего радикальную пару, весьма чувствительны к воздействию магнитных полей. Результатом воздействия магнитного поля на растения могло стать усиление генерации АФК (в первую очередь синглетного кислорода и супероксидного анионрадикала) в мембранах хлоропластов. Учитывая, что при радиационном облучении также имеет место образование активных форм кислорода, можно предположить схожесть механизмов реализации ответа живых систем на воздействие ионизирующего излучения и магнитного поля.

Под действием магнитного поля уже после 15-минутной экспозиции наблюдалось резкое увеличение содержания супероксидного анионрадикала относительно контрольного уровня, после 30-минутной экспозиции содержание супероксида было ниже контрольного, более длительная обработка приводила к нормализации данного показателя (рис. 5).

Активность СОД на 15-й минуте возросла почти в 2 раза относительно контроля; на 40% была ниже контроля после 30 минут экспозиции, почти равной контрольной после 60 и 120 мин воздействия (рис. 5).

Активность ферментов аскорбат-глутатионного цикла – аскорбатпероксидазы и глутатионредуктазы – оставалась практически на уровне контроля.

Слабое переменное магнитное поле модифицировало перекисное окисление липидов, а именно содержание продуктов ПОЛ (МДА и ДК) было минимальным после 60-минутной экспозиции и составило 63.7 и 38.2% соответственно. К 120-минутной экспозиции эти показатели возросли, но так и не достигли контрольного уровня (рис. 6).

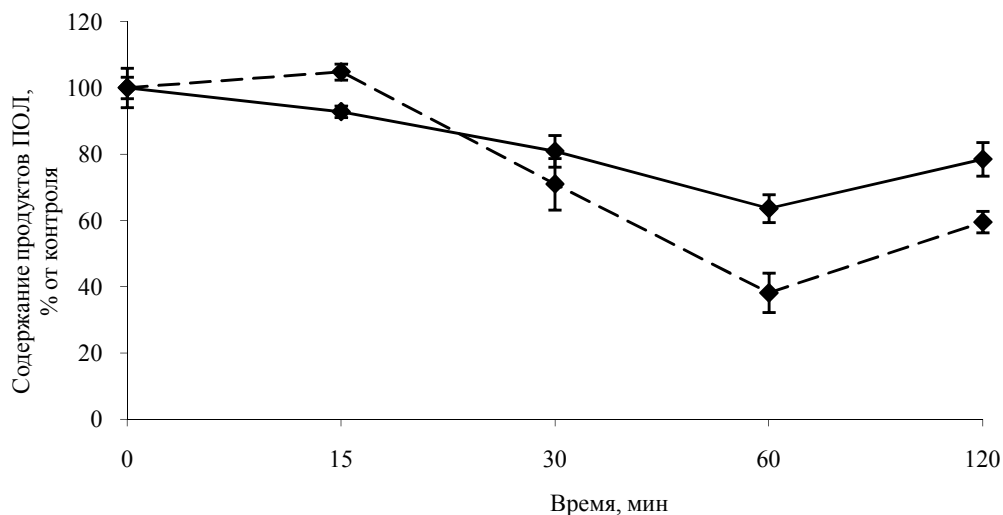


Рис. 6. Содержание продуктов ПОЛ в хлоропластах гороха после обработки магнитным полем

СОД – субстрат-индуцибельный фермент, поэтому его быстрая активация после 15-минутного воздействия может быть связана с увеличением генерации супероксида, что при дальнейшем снижении содержания супероксидного анион-радикала и неизменной работе ферментов аскорбат-глутатионового цикла могло приводить к накоплению пероксида водорода и ингибированию СОД после 30-минутной экспозиции. Функцию защиты клетки от окислительных повреждений, видимо, принимали на себя низкомолекулярные антиоксиданты – аскорбат и глутатион, для которых ранее [19] был показан переход в окисленную форму в ответ на действие магнитного поля. Активная работа первой линии антиоксидантной защиты – СОД и низкомолекулярных антиоксидантов – подтверждается уменьшением содержания продуктов ПОЛ ниже контрольного уровня с увеличением времени экспозиции.

### Выводы

Обнаруженные нами изменения в системе перекисного гомеостаза в ответ на действие ионизирующей радиации в малых дозах и низкочастотного переменного магнитного поля носили схожий характер, а именно: наблюдалось быстрое подавление процесса ПОЛ, выражавшееся в снижении уровня его продуктов – ДК и МДА – при включении компонентов раннего ответа антиоксидантной системы хлоропластов – СОД и низкомолекулярных антиоксидантов, предупреждавших дальнейшее развитие процессов окисления. Однако нарастание интенсивности воздействия обоих

физических факторов вызывало угнетение работы антиоксидантной системы, что привело к нарастанию процесса ПОЛ и увеличению содержания ДК и МДА. Результаты могут свидетельствовать в пользу неспецифического характера подобных изменений, являющихся одним из пусковых звеньев развития защитных реакций растений в ответ на действие неблагоприятных факторов.

*Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РГНФ № 09-06-95679 и/Мл.*

### Список литературы

1. Петин В.Г. Биофизика неионизирующих физических факторов окружающей среды. Обнинск: МРНЦ РАМН, 2006. 265 с.
2. Бурлакова Е.Б., Голошапов А.Н., Жижина Г.П., Конрадов А.А. Новые аспекты закономерностей действия низкоинтенсивного облучения в малых дозах // Радиационная биология. Радиоэкология. 1999. Т. 39. № 1. С. 26–33.
3. Мерзляк М.Н. Итоги науки и техники. Физиология растений. Т. 6: Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки. М.: ВИНТИ, 1989. 168 с.
4. Барабой В.А., Олейник С.А. Стресс в развитии радиационного поражения. Роль регуляторных механизмов // Радиационная биология. Радиоэкология. 1999. Т. 39. № 4. С. 438–443.
5. Аксенов С.Н., Грунина Т.Ю., Горячев С.Н. Особенности влияния низкочастотного магнитного поля на набухание семян пшеницы на разных стадиях // Биофизика. 2001. Т. 46. Вып. 6. С. 1127–1132.
6. Белова Н.Л., Леднев В.В. Влияние крайне слабых переменных магнитных полей на гравитропизм растений // Биофизика. 2001. Т. 46. Вып. 1. С. 122–125.

7. Arnon D.L., Allen M.V., Whatly Z.B. Photosynthesis by isolated chloroplasts. Genetic concept and comparison of free photochemical reaction // *Biochimica et Biophysica Acta*. 1956. V. 20. P. 449–461.
8. Минибаева Ф.Б., Гордон Л.Х. Продукция супероксида и активность внеклеточной пероксидазы в растительных тканях при стрессе // *Физиология растений*. 2003. Т. 50. № 3. С. 459–464.
9. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической диагностике. Минск: Беларусь, 2000. 896 с.
10. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // В сб.: *Современные методы в биохимии*. М.: Медицина, 1977. С. 66–68.
11. Чевари С., Чаба И., Секей И. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах // *Лабораторное дело*. 1985. Вып. 11. С. 578–681.
12. Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts // *Plant Cell Physiol*. 1981. V. 22. P. 867–880.
13. Iavata J., Tanaka U. Glutathionreductases «positive» spectro-photometre assays // *Colled. Cresh. Chem. Commun*. 1977. V. 42. № 3. P. 1086–1089.
14. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1999. 459 с.
15. Asada K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons // *Annual Reviews Plant Physiology Plant Molecular Biology*. 1999. V. 50. P. 601–639.
16. Polovinkina E., Kurganova L., Sinitsina J., Veselov A., Chernisheva M., Sinelschikov A. 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.
17. Casano L.H., Martin M., Sabater B. Sensitivity of superoxide dismutase transcript levels and activities to oxidative stress is lower in mature-senescent than in young barley leaves // *Plant Physiol*. 1994. V. 106. № 3. P. 1063–1069.
18. Эйдус Л.Х. Мембранный механизм биологического действия малых доз. Новый взгляд на проблему. М.: ИТЭБ РАН, 2001. 82 с.
19. Половинкина Е.О., Васильева Е.А. Модуляция перекисного гомеостаза мембран хлоропластов гороха переменным магнитным полем // *Матер. Междун. конф. по фундаментальным наукам среди аспирантов и студентов «Ломоносов-2007»*. Москва, МГУ, 2007. С. 271.

#### CHANGES IN SOME PEROXIDE HOMEOSTASIS PARAMETERS OF PEA CHLOROPLASTS IN RESPONSE TO THE ACTION OF LOW-INTENSITY PHYSICAL FACTORS

*E.A. Vasil'eva, Yu.V. Sinitsyna, E.O. Polovinkina, M.I. Tsiplakova, A.P. Veselov*

Low-dose ionizing radiation and low-intensity alternating magnetic field caused a dramatic decrease in lipid peroxidation product levels during antioxidant system activation. An increase in the intensity of physical factors led to the depletion of protective systems' resources and to a rise in oxidation processes. Similarity in the changes observed favours their nonspecific character.

*Keywords:* ionizing radiation, alternating magnetic field, low doses, plants, peroxide homeostasis.