

УДК 581.1

**ПРООКСИДАНТНО – АНТИОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС
ХЛОРОПЛАСТОВ ГОРОХА ПРИ ДЕЙСТВИИ СТРЕССИРУЮЩИХ
АБИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ СРЕДЫ:****1. ПРОДУКЦИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И ЛИПОПЕРОКСИДАЦИЯ**© 2010 г. **Л.Н. Курганова**, И.В. Балалаева, А.П. Веселов, Ю.В. Сеницына,
Е.А. Васильева, М.И. Цыганова

Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

kfr@bio.unn.ru

Поступила в редакцию 02.10.2009

Проведен анализ продукции активных форм кислорода, скорости перекисного окисления липидов пластид при действии гипертермии, экзогенного H_2O_2 , гербицида параквата. Окислительный стресс – универсальная реакция хлоропластов на исследованные стрессоры, зависящая, однако, от природы и интенсивности воздействия. Вероятно, увеличение скорости перекисного окисления липидов обусловлено не только ростом продукции активных форм кислорода, но и соотношением $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$.

Ключевые слова: *Pisum sativum* L., хлоропласты, активные формы кислорода, перекисное окисление липидов.

Введение

Взаимодействие растений с разнообразными факторами окружающей среды представляет собой одну из наиболее актуальных проблем современной физиологии растений. В настоящее время не вызывает сомнений существование значительной качественной аналогии ответных реакций растений на различные экстремальные воздействия [1–4].

Однако вопрос о механизмах, лежащих в основе универсальности фитостресса, остается открытым. В качестве одного из универсальных звеньев стрессового ответа может рассматриваться окислительный стресс, развитие которого к настоящему времени показано при действии на растение засухи, засоления, гипо- и гипертермии, вирусной и бактериальной инфекции [5]. В фототрофных тканях окислительный стресс, характеризующийся усилением продукции активных форм кислорода (АФК), в первую очередь связан с функционированием фотосинтетической электрон-транспортной цепи хлоропластов [6–8]. Увеличение продукции АФК приводит к активации окислительных процессов, в том числе перекисного окисления липидов (ПОЛ), протекающего в норме на определенном стационарном уровне. Интенсификация ПОЛ способствует изменению свойств липидного матрикса мембран и модификации клеточного метаболизма, что обуславливает важность поддержания определенной скорости данного процесса в экстремальных условиях [6, 9, 10].

С целью выявления общих и специфических черт развития окислительного стресса в растительной клетке исследовано воздействие стрессоров, заведомо различающихся по механизму влияния на продукцию АФК (гипертермии, экзогенного пероксида водорода, параквата).

Материалы и методы

Объектом исследования служила суспензия хлоропластов, изолированных по методу D.L. Arnon et al. [11] из 14-дневных растений гороха (*Pisum sativum* L.) сорта Труженик, выращенных на фильтровальной бумаге, смачиваемой водопроводной водой, в условиях климатической камеры при 22–23°C и 16-часовом световом дне. Хлоропласты выделяли из листьев 2–3 ярусов, считая сверху.

Для создания теплового шока суспензию хлоропластов помещали в термостат при 42°C. Пероксид водорода и паракват (PQ) вносили в концентрациях 10 мМ и 100, 500 мкМ соответственно. Эксперименты проводили при стандартных условиях освещения. Контролем служила не подвергавшаяся воздействиям суспензия хлоропластов. Время экспозиции во всех случаях составляло от 5 до 60 мин. Анализ проводили сразу по окончании экспозиции, минимальный диапазон времени, необходимый для проведения анализа – 5 мин.

Скорость образования $O_2^{\cdot-}$ оценивали по реакции накопления продукта его взаимодействия с адrenalином – адренохрома [12], суммарное

содержание пероксидов – по реакции с солью Мора и роданистым аммонием после предварительного осаждения в суспензии белков и пигментов [13]. Развитие ПОЛ тестировали по уровню начальных (диеновые конъюгаты) и конечных (малоновый диальдегид, МДА) продуктов спектрофотометрически с учетом молярных коэффициентов экстинкции [14]. Содержание белка оценивали по методу Лоури [15].

В работе использовали Трис (*трис*-(оксиметил)-аминометан) фирмы «*JCN Biomedicals*» (США), остальные реактивы – отечественного производства марок «х. ч.» и «ч. д. а.».

На графиках представлены средние арифметические трех-шести независимых опытов, каждый из которых проведен в трехкратной биологической повторности, и их стандартные ошибки. Одна биологическая повторность представляла собой суспензию хлоропластов, полученную из объединенной навески листьев 20 растений. Значимость различий оценивали по критерию Стьюдента с поправкой Бонферрони для множественных сравнений с контролем (уровень значимости $p < 0.05$) [16].

Результаты и их обсуждение

Наиболее существенным абиотическим фактором, влияющим на растения в природных условиях, является температура окружающей среды. Как следует из рис. 1, повышение температуры до 42°C вызывало увеличение скорости

окисления адреналина (обусловливаемое, в первую очередь, ростом продукции O_2^-) в первые 15 мин прогрева примерно в 1.4 раза по сравнению с контролем.

Основная масса O_2^- в хлоропластах при гипертермии продуцируется в ходе реакции Меллера — при фотовосстановлении молекулярного кислорода компонентами акцепторной стороны фотосистемы I, при этом O_2 конкурирует с окисленным НАДФ⁺ [17]. Кроме этого, источниками АФК могут являться водоокисляющий комплекс ФС II и пул пластохинонов [18]. Образующийся O_2^- утилизируется ферментами так называемого водно-водного цикла («*water-water cycle*») — мембраносвязанной супероксиддисмутазой, преобразующей его в H_2O_2 , восстанавливающийся затем при работе аскорбатпероксидазы. Реактивация окисляющегося аскорбата происходит за счет монодегидро- и дегидроаскорбатредуктазы [7, 19].

Нарушение баланса про- и антиокислительных реакций цикла становится причиной увеличения в пластидах концентрации пероксидов через 15–30 мин гипертермии (рис. 2а). Несмотря на относительно слабые окислительные свойства, опасность данных АФК состоит в их способности генерировать $\cdot OH$ в реакциях Фентона и Хабера – Вайса с участием ионов металлов переменной валентности и O_2^- [9]. Следствием усиления продукции АФК является развитие окислительной модификации макромолекул,

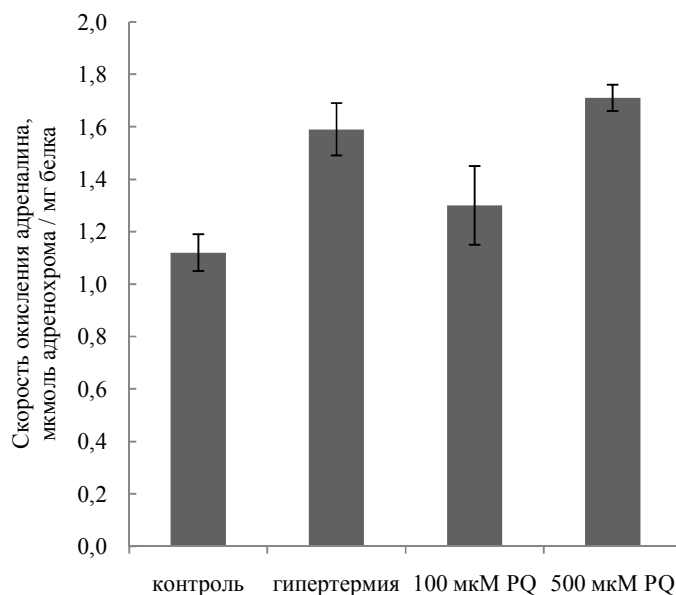


Рис. 1. Скорость продукции O_2^- (окисления адреналина) хлоропластами гороха при действии различных факторов. (Реакция с адреналином запускалась на 15 минут в суспензии в указанных условиях)

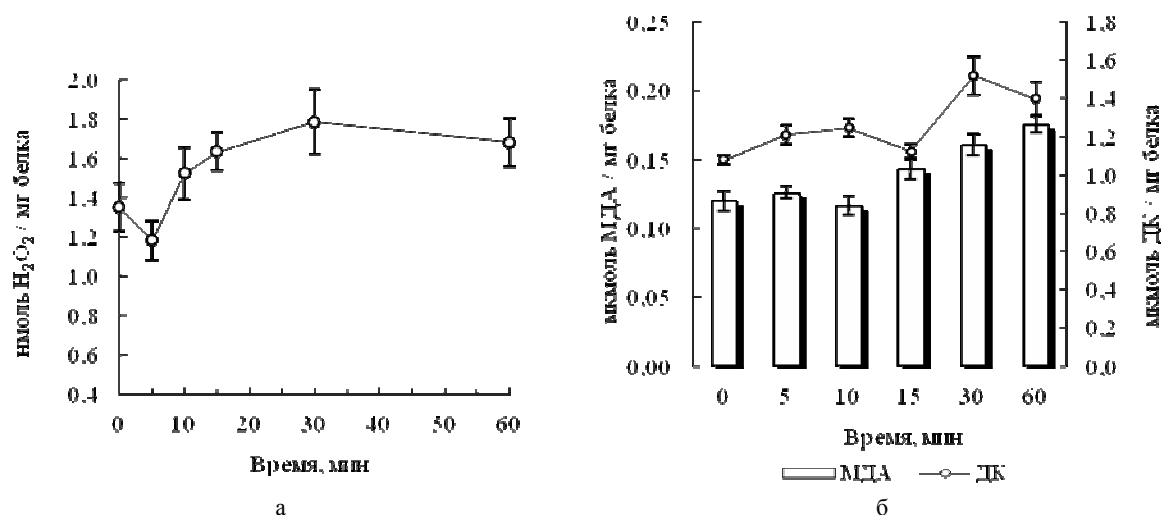


Рис. 2. Содержание пероксидов (а) и накопление продуктов перекисного окисления липидов (б) в хлоропластах при гипертермии

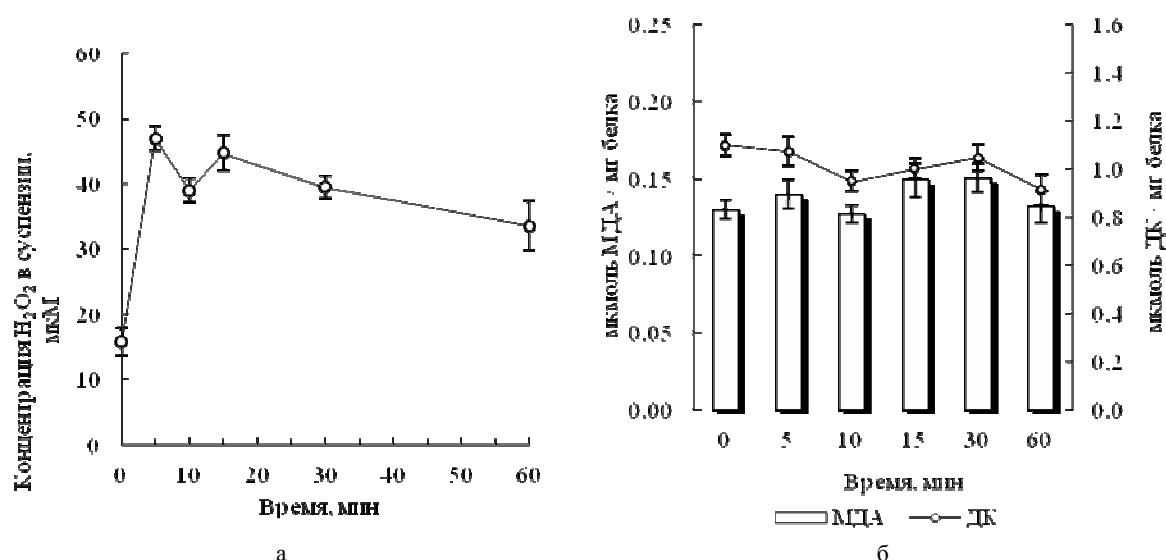


Рис. 3. Динамика содержания H₂O₂ (а) и накопление продуктов перекисного окисления липидов (б) в хлоропластах при обработке экзогенным 10 мМ пероксидом водорода

маркером которой наиболее часто служит скорость перекисного окисления липидов. В случае действия повышенной температуры происходило накопление продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов, а через 15–30 мин после начала воздействия – МДА (рис. 2б). Повышение концентрации МДА сохранялось до конца исследуемого периода (60 мин).

Направленное увеличение содержания в пластидах H₂O₂ осуществляли путем его введения в конечной концентрации 10 мМ. Основанием для выбора концентрации послужили результаты экспериментов на аналогичной модельной системе [20], согласно которым внесение в суспензию 10 мМ H₂O₂, в отличие от бо-

лее низких концентраций, приводило к изменению работы фотосинтетического аппарата пластид, но не вызывало его деструкции. Однако уже через 5 мин после внесения содержание H₂O₂ в суспензии составляло не более 45 мкМ, т.е. всего в три раза превосходило исходную эндогенную концентрацию (15 мкМ) (рис. 3а).

Между продукцией АФК и развитием окислительных процессов в клетке или её отдельных компартаментах, несомненно, имеется определенная функциональная связь. Вместе с тем, само по себе увеличение концентрации АФК, как это показано при использовании экзогенного пероксида водорода (рис. 3а), может не приводить к накоплению продуктов ПОЛ (рис. 3б).

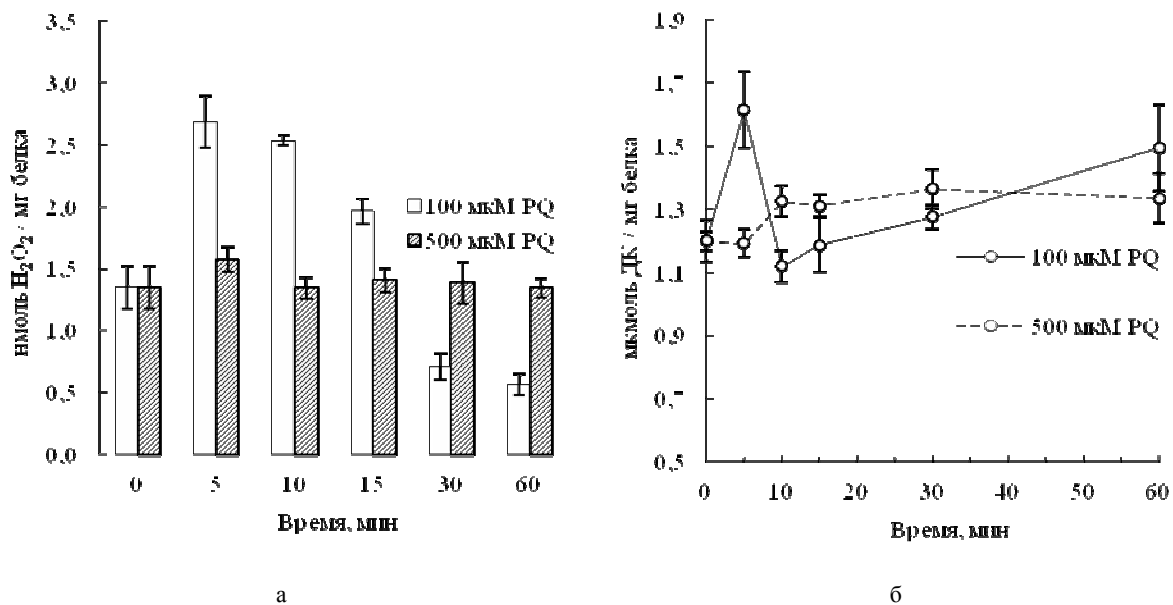


Рис. 4. Содержание пероксидов (а) и диеновых конъюгатов (б) в хлоропластах при обработке паракватом (PQ)

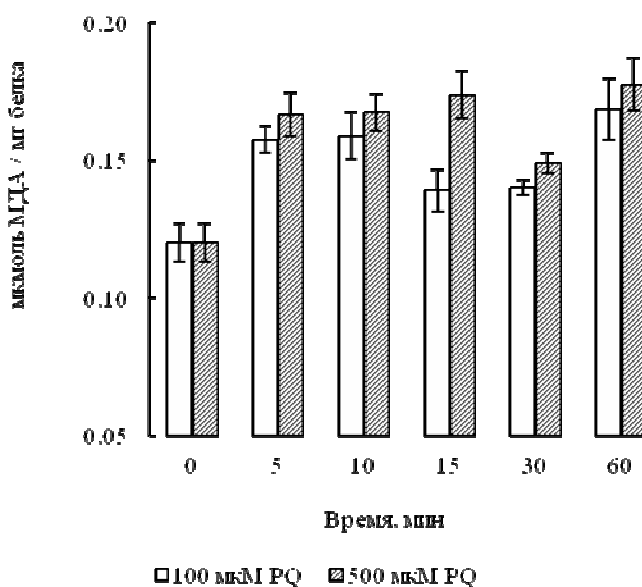


Рис. 5. Содержание малонового диальдегида в хлоропластах при обработке паракватом (PQ)

Сравнительно «легкая» реакция хлоропластов на 10 мМ H₂O₂ определяется наличием в пластидах значительных количеств низкомолекулярных антиоксидантов [21] и согласуется с имеющимися в литературе данными о том, что в стрессовых условиях концентрация эндогенного пероксида, составляющая в норме 1–50 мкМ, способна возрастать до 6–8 мМ [8]. Вышесказанное позволяет высказать предположение об участии H₂O₂ в индукции защитных реакций пластид при действии различных по своей природе экстремальных факторов.

Использование двух концентраций фотодинамического гербицида PQ позволило показать, что ответная реакция хлоропластов может качественно различаться в зависимости не только от типа, но и от интенсивности неблагоприятного воздействия. Введение в суспензию 100 мкМ PQ приводило к некоторому усилению продукции O₂⁻ и увеличению содержания пероксидов до 200% от исходного уровня уже через 5 мин экспозиции и одновременно к резкому росту уровня диеновых конъюгатов (рис. 1, 4).

Концентрация пероксидов существенно снижалась через 30–60 мин, диеновых конъюгатов – через 10 мин. Такая динамика пероксидов и продуктов ПОЛ, характеризующаяся быстрым отклонением от исходного уровня и последующим не менее быстрым возвращением к нему, по мнению В.А. Барабой [8], отражает стадии «тревоги» и «адаптации» неспецифического адаптационного синдрома. При этом пиковые уровни пероксидов и диеновых конъюгатов способны играть роль сигнала для активации различных защитных механизмов.

Увеличение концентрации PQ до 500 мкМ приводило к наиболее значительному росту продукции $O_2^{\cdot-}$ (рис. 1). Согласно теоретической модели фитостресса как системы возвратного триггера на основе индуктивных механизмов защиты (при участии генома клетки) [22], увеличение интенсивности действующего стрессора способно изменять амплитуду ответа, но не скорость его развития. В то же время в наших экспериментах при большей концентрации гербицида резкого увеличения конъюгации и продукции пероксидов не отмечено (рис. 4). Ответ хлоропластов на обработку паракватом, по-видимому, реализуется за счет иных механизмов активации антиоксидантной системы, чем в целостной клетке, где возможна индукция экспрессии генов соответствующих защитных ферментов. Кроме того, аналогично ситуации, наблюдаемой при введении экзогенного H_2O_2 , усиленное образование $O_2^{\cdot-}$ не сопровождалось ростом уровней пероксидов и диеновых конъюгатов. При этом содержание МДА повышалось (до 120–140% от исходного уровня) независимо от концентрации параквата (рис. 5), что свидетельствовало о значительном деструктивном эффекте PQ-индуцированного окислительного стресса в хлоропластах.

Вероятно, увеличение скорости ПОЛ при экстремальных воздействиях обусловлено не только гиперпродукцией АФК, но и соотношением $O_2^{\cdot-} / H_2O_2$. Повышение продукции $O_2^{\cdot-}$ без изменения содержания H_2O_2 (при обработке 500 мкМ PQ), а также внесение экзогенного пероксида водорода в концентрации 10 мМ (т.е. без предварительного увеличения продукции $O_2^{\cdot-}$) не вызывало увеличения уровня диеновых конъюгатов в составе жирных кислот мембранных липидов. Можно предположить, что в развитии радикальных процессов, в частности в индукции накопления диеновых конъюгатов, важно совместное участие АФК.

В отличие от начальных продуктов ПОЛ, накопление МДА происходило практически во всех вариантах опытов. При этом минимальный его уровень отмечался при обработке пероксидом водорода, а максимальный – при гипертермии и введении PQ в суспензию хлоропластов.

Несмотря на высокую универсальность, для стресс-ответа растений характерны и определенные индивидуальные реакции на тот или иной стрессор, зависящие от природы и интенсивности воздействия. Так, окислительный стресс развивался при влиянии всех исследованных в настоящей работе абиотических факторов (рис. 2, 3, 4б, 5). В то же время, природа стимула и его интенсивность играли определяющую роль в активации накопления тех или иных продуктов окисления липидов мембран. Лишь одновременное увеличение концентрации супероксидного анион-радикала и пероксида водорода (гипертермия, паракват 100 мкМ) сопровождалось накоплением в пластидах начальных продуктов липопероксидации (рис. 2, 4б). При этом повышение содержания МДА можно рассматривать как неспецифическое звено окислительного стресса.

Список литературы

1. Пахомова В.Н. // Цитология. 1995. Т. 37. № 1/2. С. 66–91.
2. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. Уфа: Гилем, 2001. 161 с.
3. Alexieva V., Ivanov S., Sergiev I., Karanov E. // Bulg. J. Plant Physiol. 2003. Special issue. P. 1–17.
4. Мерзляк М.Н. // Итоги науки и техники. Физиология растений. ВИНТИ, 1989. Т. 6. 168 с.
5. Noctor G., Foyer C.H. // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1998. V. 49. P. 249–279.
6. Polle A. // Plant Physiol. 2001. V. 126. P. 445–462.
7. Осипов А.Н., Азизова О.А., Владимиров Ю.А. // Усп. биол. хим. 1990. Т. 31. С. 1180–1208.
8. Барабой В.А. // Усп. совр. биол. 1991. Т. 111. № 6. С. 923–932.
9. Clarke S.F., Guy P.L., Burritt D.J., Jameson P.E. // Physiol. Plant. 2002. V. 114. P. 157–164.
10. Iturbe-Ormaetxe I., Escuredo P.R., Arrese-Igor C., Becana M. // Plant Physiol. 1998. V. 116. P. 173–181.
11. Arnon D.L., Allen M.B., Whatley L.B. // Biochim. Biophys. Acta. 1956. V. 20. № 2. P. 449–455.
12. Часов А.В., Гордон Л.Х., Колесников О.П., Минибаева Ф.В. // Цитология. 2002. Т. 44. № 7. С. 691–696.
13. Романова Л.А., Стальная И.Д. Современные методы в биохимии. М.: Медицина, 1977. С. 64–66.
14. Курганова Л.Н., Веселов А.П., Гончарова Т.А., Синецкина Ю.В. // Физиология растений. 1997. Т. 44. № 5. С. 725–730.
15. Lowry O.N., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. № 1. P. 265–275.

16. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1998. 459 с.
17. Синицына Ю.В. Фотохимическая активность и перекисный гомеостаз в хлоропластах растений при гипертермическом воздействии: Дис. ... канд. биол. наук. Н. Новгород: ННГУ им. Н.И. Лобачевского, 2002. 157 с.
18. Badger M.R., von Caemmerer S., Ruuska S., Nakano H. // Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 2000. V. 355. P. 1434–1446.
19. Застрижная О.М., Хоробрых А.А., Христин М.С., Климов В.В. // Биохимия. 1997. Т. 62. С. 419–423.
20. Asada K. // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1999. V. 50. P. 601–639.
21. Иванов Б.И. // Биохимия. 1998. Т. 63. С. 165–170.
22. Веселов А.П. // Физиология растений. 2001. Т. 48. № 1. С. 124–131.

PROOXIDANT-ANTIOXIDANT STATE OF PEA CHLOROPLASTS UNDER THE INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL ABIOTIC STRESSORS.

1. PRODUCTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES AND LIPID PEROXIDATION

L.N. Kurganova, I.V. Balalaeva, A.P. Veselov, Yu.V. Sinitsina, E.A. Vasil'eva, M.I. Tsiganova

The analysis of production of reactive oxygen species (ROS) and rate of lipid peroxidation in chloroplasts under the influence of high temperature, exogenous hydrogen peroxide and the herbicide Paraquat have been performed. Oxidative stress was shown to be the universal reaction of chloroplasts on investigated stressors. However, the features of the response were in dependence on the nature and intensity of the influence. It has been suggested that the increase in the lipid peroxidation rate under extreme effects is determined not only by the rise of ROS production but also by the ratio O_2^- / H_2O_2 .

Keywords: *Pisum sativum* L., chloroplasts, reactive oxygen species, lipid peroxidation.

