

УДК 54.024;66.094.1

В. В. Бараненко

Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного Національної академії наук України, Київ

Активация пероксидного окисления липидов как один из механизмов перестроек в функционировании клеток и тканей растений в условиях микрогравитации

Надійшла до редакції 26.10.06

Активация пероксидного окисления липидов (ПОЛ) є універсальним механізмом пошкодження кліткових мембран. Припускається, що і в умовах мікрогравітації цей процес буде діяти під час перебудови тканин рослин. Вивчався перебіг ПОЛ у листках і хлоропластах гороху, а також утворення активних форм кисню, ініціаторів ПОЛ, в умовах 7- і 14-добового кліностагування (2 об/хв). При цьому відзначено підсилене утворення АФК та збільшення інтенсивності ПОЛ, особливо при 14-добовому кліностагуванні. Виявлено збільшення вмісту ненасичених жирних кислот на 7-му добу і незначне зменшення ($\approx 7\%$) — на 14-ту. Швидкість транспорту електронів у хлоропластах зменшилась в обох фотосистемах, особливо у першій на 14-ту добу.

ВВЕДЕНИЕ

Пероксидное окисление липидов (ПОЛ) является важной составляющей метаболизма растений. В обычных условиях функционирования уровень ПОЛ незначительный, однако при действии разнообразных неблагоприятных факторов происходит интенсификация ПОЛ [4, 10]. Анализ литературных данных свидетельствует, что активация ПОЛ является универсальным механизмом повреждения мембранных структур клетки в условиях стресса и во время старения растений [2, 6]. Установлено, что интенсификация ПОЛ сопровождается изменениями липидного и жирнокислотного состава клеточных мембран, их вязкости и проницаемости, активности мембраносвязанных ферментов [2, 4]. В связи с тем, что активация ПОЛ является неспецифической реакцией организма растений, возникло предположение, что данные процессы определенным

образом вовлечены в перестройки клеточного метаболизма в условиях измененной силы тяжести. В условиях микрогравитации и клиностагирования отмечено широкий спектр перестроек как на уровне клеток, так и всего организма, причины которых полностью не установлены [9]. Целью данной работы было изучение протекания ПОЛ в листьях и хлоропластах гороха в связи с возможным участием в перестройках метаболизма клеток и тканей растений в условиях измененной силы тяжести. Изучено образование АФК, которые являются инициаторами ПОЛ, а также содержание малонового диальдегида, одного из конечных продуктов процесса окисления липидов. Поскольку ненасыщенные жирные кислоты являются субстратом ПОЛ, их состав также определен в условиях клиностагирования. Ненасыщенными жирными кислотами особенно богаты мембраны тилакоидов [5], и интенсификация ПОЛ в хлоропластах может

быть определенным образом задействована в изменении функционирования хлоропластов. Поэтому скорость транспорта электронов на уровне обеих фотосистем (ФС I и ФС II) также изучена.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В исследованиях были использованы листья и хлоропласты гороха (*Pisum sativum L.*, сорт Интенсивный). Растения выращивали на протяжении 7 и 14 сут при 16-часовом световом режиме, температуре 25 °C/20 °C (день/ночь), освещении 7 000 люкс.

Условия микрогравитации в лабораторных условиях моделировали при помощи медленно вращающихся горизонтальных клиностатов (2 об/мин, $2.7 \cdot 10^{-4}$ g).

Образование АФК изучали путем регистрации интенсивности люминозависимой хемилюминесценции ($I_{\text{ЛЗХЛ}}$) с использованием ингибиторов: супероксиддисмутатаза и OsO_4 — как уборщики супероксидных радикалов, бензоат натрия и маннитол — как дезактиваторы гидроксильных радикалов, гистидин и гидрохинон — как ингибиторы синглетного кислорода, каталаза — пероксида водорода. Образование малонового диальдегида, одного из конечных продуктов ПОЛ, изучали при помощи цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБКАП) и дальнейшей регистрации продуктов реакции на спектрофотометре СФ-2000.

Содержание жирных кислот в хлоропластах изучали при помощи газовой хроматографии.

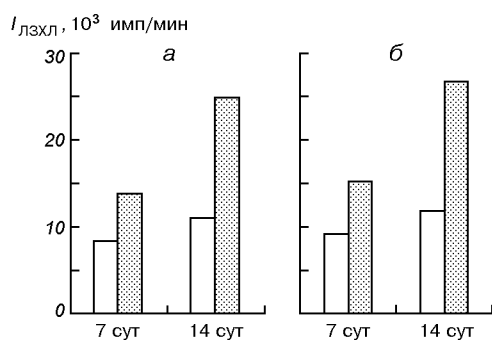


Рис. 1. Интенсивность ЛЗХЛ в листьях (а) и хлоропластах гороха (б) в контроле (белые столбцы) и при клиностатировании (серые столбцы)

Скорость электронного транспорта в хлоропластах определена при помощи полярографа ОН-105 (Radeliks, Венгрия).

Хлоропласты выделяли при помощи дифференциального центрифугирования; качество хлоропластов проверяли при помощи светового микроскопа. Интактность и чистоту фракции определяли феррицианидным методом и путем изучения активности сукцинат-цитохром-с-оксидазы — маркерного фермента митохондрий. При этом отмечено высокую степень чистоты выделенных хлоропластов (91 %).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Образование активных форм кислорода, инициаторов ПОЛ, в листьях и хлоропластах гороха в контроле и в условиях клиностатирования. Начальным этапом в развитии ПОЛ является усиление образования АФК в клетках и тканях растений [4]. Изучение интенсивности ЛЗХЛ показало усиление образования АФК в листьях и хлоропластах гороха на обоих этапах клиностатирования, особенно при 14-суточном воздействии (рис. 1). Так, если при 7-суточном клиностатировании интенсивность свечения в гомогенатах листьев увеличилась в

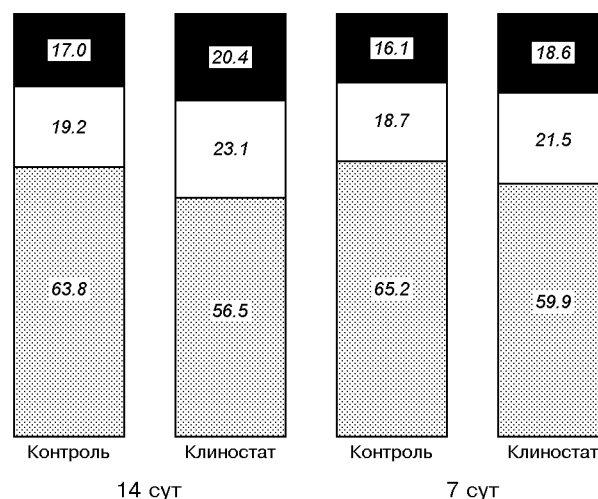


Рис. 2. Соотношение между отдельными АФК в листьях гороха в контроле и при клиностатировании (%): серые столбцы — супероксидные радикалы, белые — пероксид водорода, черные — гидроксильные радикалы

1.6 раз, то при 14-суточном — почти в 2.3 раза. В хлоропластах отмечено аналогичное усиление образования АФК с тенденцией к возрастанию при более длительном воздействии. Эти данные свидетельствуют, что хлоропласты являются важным источником АФК в клетке.

При помощи ингибиторов АФК определено образование супероксидных и гидроксильных радикалов, а также пероксида водорода в листьях и хлоропластах гороха (рис. 2). При этом отмечено изменение соотношения между ними: в клетках контрольных растений преобладали в хемилюминесцентной реакции супероксидные радикалы с относительно невысокой реакционной способностью; в условиях клиностатирования данные радикалы также были доминирующими, однако их доля уменьшалась с одновременным увеличением доли других АФК, особенно реакционноспособных гидроксильных радикалов (OH^\cdot) (рис. 2).

Содержание ТБКАП в листьях и хлоропластах гороха в контроле и при клиностатировании. Изучение протекания процесса ПОЛ на одном из его конечных этапов, а именно на этапе образования малонового диальдегида, показало увеличение образования ТБКАП в листьях и хлоропластах гороха на обоих строках клиностатирования, особенно при 14-суточном воздействии (рис. 3). Так, если при 7-суточном клиностатировании отмечено усиление накопления ТБКАП в листьях гороха в 1.6 раза, то при 14-суточном — в 2.16 раза.

Между интенсивностью ЛЗХЛ и содержанием ТБКАП обнаружена довольно высокая степень

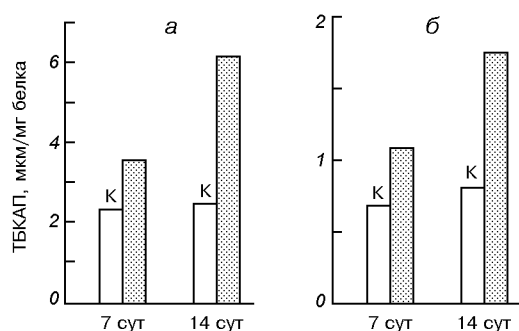


Рис. 3. Содержание ТБКАП в листьях (а) и хлоропластах (б) гороха в контроле (белые столбцы) и при клиностатировании (серые столбцы)

корреляции: $r = 0.98 \pm 0.03$ для листьев и $r = 0.86 \pm 0.06$ для хлоропластов ($P > 0.05$).

Жирнокислотный состав хлоропластов гороха в контроле и в условиях клиностатирования. Изучение состава жирных кислот хлоропластов гороха показало, что в условиях 7-суточного клиностатирования происходило увеличение содержания ненасыщенных жирных кислот (НЖК) и индекса ненасыщенности по сравнению с контрольными растениями (табл. 1). Предположено, что данные изменения являются адаптивными и направлены на предупреждение перехода мембран хлоропластов из жидкостно-кристаллического состояния в твердый гель вследствие селективного окисления НЖК при активации ПОЛ. Увеличение длительности клиностатирования (14 сут) приводило к снижению количества НЖК, что может быть следствием их окисления на фоне дальнейшей интенсификации ПОЛ. Интересно также то, что малоновый диальдегид в клетках гороха образуется при окислении линолевой и линоленовой жирных кислот [3]. В наших исследованиях увеличение содержания МДА в хлоропластах гороха в условиях 14-суточного клиностатирования сопровождалось одновременным снижением содержания данных жирных кислот.

Таким образом, снижение содержания НЖК может быть обусловлено их селективным окислением. От состава жирных кислот и их соотношения зависит также вязкость мембран: при увеличении количества НЖК вязкость снижается и наоборот [1]. Изменения вязкости мембран и активности мембраносвязанных ферментов отмечены в условиях микрогравитации [9], которые можно объяснить изменением состава и соотношения жирных кислот вследствие активации свободнорадикального окисления в клетках и тканях растений.

Влияние клиностатирования на скорость транспорта электронов в хлоропластах гороха. Изучение скорости транспорта электронов на уровне отдельных фотосистем показало ее снижение на обоих этапах клиностатирования, особенно в ФСІ при 14-суточном воздействии (табл. 2). Одной из возможных причин ингибирования активностей обоих фотосистем может быть усиление свободнорадикального окисления в хлоропластах в данных условиях. Более значительное ингибирование ФСІ по сравнению с

Таблица 1. Жирнокислотный состав липидов хлоропластов гороха в контроле и в условиях клиностатирования

Вариант опыта	Содержание жирных кислот, % от суммы						Жирные кислоты		Индекс ненасыщенности
	пальмитиновая, C _{16:0}	пальмитоловая, C _{16:1}	стеариновая, C _{18:0}	олеиновая, C _{18:1}	линолевая, C _{18:2}	линоленовая, C _{18:3}	насыщенные	ненасыщенные	
7 сут, контроль	21.4±1.05	2.1±0.09	3.6±0.18	2.55±0.12	5.3±0.26	65.1±3.2	25.0±1.26	75.0±3.7	8.6±0.4
7 сут, клиност.	15.9±0.77	2.5±0.12	1.9±0.09	3.1±0.16	7.1±0.33	69.5±3.4	17.8±0.87	82.2±3.9	11.81±0.6
14 сут, контроль	18.2±0.73	2.4±0.12	3.1±0.15	2.6±0.12	5.9±0.28	68.8±3.5	21.3±1.03	78.7±3.8	18.2±0.73
14 сут, клиност.	23.4±1.15	2.2±0.11	5.1±0.26	2.1±0.10	4.8±0.24	63.4±3.1	27.5±1.35	71.5±3.5	23.4±1.15

Таблица 2. Скорость транспорта электронов на уровне отдельных фотосистем у хлоропластов гороха в контроле и в условиях клиностатирования (мкмоль O₂·мг хл⁻¹·ч⁻¹)

Фотосистема	Длительность эксперимента, сут	Скорость транспорта электронов, мкмоль O ₂ ·мг хл ⁻¹ ·ч ⁻¹	
		контроль	клиностатирование (в т. ч. в долях от контроля)
ФСII	7	220.6±10.4	217.3±10.8 (98.5 %)
	14	225.2±10.3	200.9± 9.7 (89.3 %)
ФСI	7	1254.4±60.1	1254.4±59.8 (96.7 %)
	14	1086.3±52.2	906.9±44.4 (83.5 %)

ФСII может быть обусловлено тем, что ФСI является основным источником образования АФК в электронотранспортной цепи [5, 7]. АФК, особенно ¹O₂ и ОН[·] являются очень сильными окислителями, от мест своего образования далеко не мигрируют, а, образовавшись, взаимодействуют с молекулами своего непосредственного окружения, которыми могут быть молекулы липидов, хлорофилла, белка, компоненты ФЭТЦ. Поэтому, образовавшись в ФСI, АФК будут окислять в первую очередь компоненты данной фотосистемы.

Образование АФК отмечено и в ФСII, и там главной мишенью является белок D1 реакционного центра [8, 11, 12], однако довольно быстрая репарация данного белка, очевидно, обуславливает менее значительное ингибирование ФСII.

Снижение транспорта электронов в полной цепи в условиях клиностатирования обусловлено, очевидно, его снижением на уровне отдельных ФС или может быть связано с нарушением структурной и функциональной целостности ФЭТЦ в условиях усиления свободнорадикального окисления липидов мембран тилакоидов.

Таким образом, в результате проведенных исследований можно сделать следующие выво-

ды. Клиностатирование приводит к увеличению образования АФК (супероксидных и гидроксильных радикалов, пероксида водорода) и активации ПОЛ в листьях и хлоропластах гороха, при этом более значительно при 14-суточном воздействии. Изменяется соотношение между отдельными АФК: в контроле преобладало образование радикалов супероксида с относительно невысокой реакционной способностью. В условиях клиностатирования доля данных радикалов уменьшалась с одновременным увеличением процента других АФК. Активация свободнорадикального окисления в условиях клиностатирования сопровождалась изменением жирнокислотного состава липидов хлоропластов гороха: адаптивное увеличение содержания ненасыщенных жирных кислот при 7-суточном воздействии и снижение — при 14-суточном, что может быть следствием окисления жирных кислот на фоне дальнейшей интенсификации ПОЛ. В условиях клиностатирования отмечено снижение скорости транспорта электронов на уровне отдельных фотосистем и в полной цепи, что может быть связано с усилением образования АФК и уровня ПОЛ у хлоропластах в данных условиях. Полученные результаты подтверждают наше предположение, что активация ПОЛ в условиях изме-

ненной силы тяжести может быть важным механизмом перестроек в клетках и тканях растений, в частности быть причиной изменений липидного и жирнокислотного состава липидов мембран, их вязкости, активности мембраносвязанных ферментов, функционирования хлоропластов и определенным образом задействованным в ускорение онтогенеза.

1. Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки: Пер. с англ. — М.: Мир, 1994.— Т. 1.—415 с.
2. Мерзляк М. Н. Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки // Итоги науки и техники. Сер. физиология растений.—1989.—6.—167 с.
3. Мерзляк М. Н., Погосян С. И. Фотодеструкция пигментов и липидов в изолированных хлоропластах // Биол. науки.—1986.—№ 3.—С. 8—20.
4. Чиркова Т. В., Новицкая Л. О., Блохина О. Б. Перекисное окисление липидов и активность антиоксидантных систем при аноксии у растений с разной устойчивостью к недостатку кислорода // Физиол. растений.—1998.—45, № 1.—С. 65—73.
5. Asada K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen's and dissipation of excess photons // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Moll. Biol.—1999.—50.—P. 601—639.
6. Blokhina O. B., Fagerstedt K. V., Chirkova T. V. Relationships between lipid peroxidation and anoxia tolerance in a range of species during post-anoxic reaeration // Physiol. Plantarum.—1999.—105, N 4.—P. 625—632.
7. Jiao S., Emmanuel H., Guikema J. A. High light stress inducing photoinhibition and protein degradation of photosystem I in *Brassica rapa* // Plant Sci.—2004.—167, N 4.—P. 733—741.

8. Henmi T., Miyao M., Yamamoto Y. Release and reactive-oxygen-mediated damage of the oxygen-evolving complex subunits of PSII during photoinhibition // Plant Cell Physiol.—2004.—45, N 2.—P. 243—250.
9. Kordyum E. L. Biology of plant cell in microgravity and under clinostating // Intern. Rev. Cytology.—1997.—171.—P. 1—77.
10. Liu X., Huang B. Heat stress injury in relation to membrane lipid peroxidation in creeping bentgrass // Crop Science.—2000.—40.—P. 503—510.
11. Navari-Izzo F., Pinzino C., Quartacci M. F., Sgherri C. L. Superoxide and hydroxyl radical generation and superoxide dismutase in PSII membrane fragments from wheat // Free Radical Res.—1999.—31.—P. 3—9.
12. Yamamoto Y. Quality control of photosystem II // Plant and Cell Physiology.—2001.—42, N 2.—P. 121—128.

ACTIVATION OF LIPID PEROXIDATION AS A MECHANISM OF PLANT CELL REARRANGEMENTS UNDER MICROGRAVITY

V. V. Baranenko

Activation of the lipid peroxidation (LP) is an universal process perturbing cell membranes under different unfavourable conditions. It is suggested that the LP can be one of the important mechanisms of plant cell rearrangements under altered gravity as well. The purpose of this investigation is to study the LP intensity in pea leaves and chloroplasts under 7- and 14-day clinorotation. The intensification of the LP under both terms of clinorotation, particularly under more prolonged, is detected. The adaptive increase in the unsaturated fatty acid content under 7-day clinorotation and their minor decrease under 14-day clinorotation are revealed. The lowering of electron transport rate in both photosystems, particularly in PSI, is established. Our results confirm that the LP may be one of the mechanisms of plant cell rearrangements under microgravity.