

Таблица 1 - Активность ферментов антиоксидантной защиты при гипотиреозе

Органы и сыворотка крови		Супероксиддисмутаза (СОД) у.е. Нв	Глутатионпероксидаза (ГПО) мкмоль окисл./ г. Нв в мин.	Глутитионредуктаза (ГР) мкмоль НАДФН ₂ г. Нв в мин.
печень	норма	244.83±27.28	120.0±13.37	6.46±0.54
	гипот.	312.73±18.62*	731.13±15.60**	11.25 ±3.49**
почки	норма	40.60±7.18	239.37±10.32	3.50±0.36
	гипот.	439.89±38.19*	654.65±69.46**	13.73±6.45**
сыворотка крови	норма	22.05±2.27	298.18±14.02	2.04±0.64
	гипот.	2.04±0.64*	932.25±36.69**	2.43±0.22**

(* различия статистически значимы в сравнении с контролем, p<0,05, ** p<0,01)

В митохондриях в нормальных условиях при окислительном фосфорилировании около 5% молекулярного кислорода преобразуется в АФК /11/. Генерация АФК в митохондриях может возрастать при нарушении переноса электронов в дыхательной цепи при ишемии и реперфузии /12,13/, в результате повышения содержания Ca²⁺ /14/ при гипоксии и реоксигенации /15/, при старении организма. Участками дыхательной цепи, где образуется O₂⁻, являются дыхательные комплексы I и III, причем основным донором электрона служит убихинон, или коэнзим Q, а так же НАДН - дегидрогеназа. Периодически окисляясь и восстанавливаясь в процессе транспорта электронов, коэнзим Q может образовывать O₂⁻, т.е. являться прооксидантом, при этом в восстановленном состоянии убихинон снижает уровень супероксидного анион-радикала и других органических радикалов, являясь антиоксидантом. При нормальном функционировании система микросомальных монооксигеназ не продуцирует АФК, поскольку в комплексе монооксидаз кислород активируется путем двухэлектронного восстановления, при этом свободные радикалы либо не образуются, либо не выделяются из комплекса. Во-вторых, в монооксигеназный комплекс включены ферментные и неферментные антиоксиданты - СОД, каталаза, глутатионпероксидаза, альфа-токоферол, глутатион и др., при разрушении комплекса, например в условиях стресса, интенсивной физической нагрузки компоненты комплекса могут окислять полиненасыщенные жирные кислоты микросомальной мембраны с образованием реактивных продуктов окисления. Например, при избыточной продукции катехоламинов в результате автоокисления адреналина в микросомах печени образуется повышенное количество супероксидного анион-радикала и инициируется свободнорадикальное окисление полиненасыщенных жирных кислот микросомальных мембран, с последующим повреждением их структуры и функций. В гипоксических условиях большое значение для образования АФК приобретает несколько дополнительных механизмов. К ним относится в первую очередь активация ксантиоксидазной системы, приводящая к образованию супероксидного радикала, что наблюдают при ишемических и гипоксических воздействиях, сопровождающихся накоплением субстратов этой реакции /11/. Можно предположить, что данные изменения имеют место в результате дефицита гормонов ЩЖ.

При ртутной интоксикации, (таблица 2) было установлено возрастание в печени и почках активности ферментов антиоксидантной защиты супероксиддисмутазы (СОД), глутатионпероксидазы (ГПО), глутитионредуктазы (ГР) по сравнению с нормой. В сыворотке крови при ртутной интоксикации животных в сравнении с контрольной группой не меняется активность глутитионредуктазы. Данные результаты при ртутной интоксикации сходны с результатами полученными нами при гипотиреозе.

Увеличение активности ферментов антиоксидантной системы, доказывает повреждающее действие солей ртути на организм. Ртуть, связываясь с сульфгидрильными и фосфорильными группами клеточных мембран, изменяет их проницаемость и снижает мембранный потенциал. Соли ртути накапливаются в высоких концентрациях в почках и печени. По мнению Лужникова Е.А. и Костомаровой Л.Г. это объясняется высоким содержанием в почечной и печеночной ткани особого белка металлобионина, богатого тиоловыми группами /16/. Длительное аккумуляирование ртути в данных органах и обуславливает хронические формы интоксикации. Механизм токсичного воздействия соединений тяжелых металлов складывается из местного и резорбтивного эффектов. Местное действие проявляется в деструкции ткани и зависит от способности этих тканей к распаду. В результате денатурации белка образуется некроз тканей. Отравление тяжёлыми металлами, а именно, ртутная интоксикация, сопровождается активацией процессов свободно-радикального окисления в тканях, интенсификацией перекисного окисления липидов в биомембранах и включением систем антиоксидантной защиты.

Таблица 2 - Активность ферментов антиоксидантной защиты при ртутной интоксикации

Органы и сыворотка крови		Супероксиддис-мутаза (СОД) у.е. Нв	Глутатионпероксидаза (ГПО) мкмоль окисл./ г. Нв в мин.	Глутатионредуктаза (ГР) мкмоль НАДФН ₂ г. Нв в мин.
печень	норма	244.83±27.28	120.0±13.37	6.46±0.54
	ртутн. интокс	481.67±29.34**	442.94±25.07*	442.94±25.07*
почки	норма	40.60±7.18	229.37±10.32	3.50±0.36
	ртутн. интокс	240.84±16.57**	485.63±29.38*	8.09 ±0.61*
сыворотка крови	норма	22.05±2.27	298.18±14.02	2.04±0.64
	ртутн. интокс	11.45±0.57**	542.42±15.52*	2.37 ±0.14*

(* различия статистически значимы в сравнении с контролем, p<0,05, ** p<0,01)

В заключении можно отметить, что полученные нами данные позволяют предположить, что механизм активации ферментов СОД, ГПО и ГР в печени и почках при гипотиреозе, аналогичны механизмам наблюдаемым при ртутной интоксикации. С другой стороны известно, что при токсическом поражении организма эндокринная система отвечает определённой реакцией на это воздействие. Щитовидная железа весьма чувствительна к неблагоприятным воздействиям внешней среды, а именно имеет место прямое влияние ртутной интоксикации на щитовидную железу, приводящее к снижению её функций, что может служить причиной изменения активности ферментов пуринового обмена при ртутной интоксикации.

Таким образом, результаты проведённых исследований свидетельствуют о серьёзных изменениях в антиоксидантной системе при гипотиреозе и ртутной интоксикации. Нарушения функциональных взаимосвязей каталитической редокс-системы глутатиона, сопровождающиеся разнонаправленностью изменений активности глутатион-зависимых ферментов и длительным напряжением звеньев антиоксидантной системы, что может в конечном счёте привести к снижению антиоксидантного статуса организма, что указывает на необходимость разработки перспективных методов адаптационной коррекции.

Литература

1. Касаткина Е.П., Шилин Д.Е. Радиационная патология щитовидной железы у детей и подростков. Лекция 1. Эффект малых доз облучения и концепция риска отдалённых последствий Чернобыльской катастрофы. Проблемы эндокринологии. 1997 №5. С. 24-25.
2. Василенко И.Я. Радиобиологические проблемы малых доз радиации. Военно-медицинский 1993. № 4 С. 28-32.
3. Ильин Б.Н., Борисова В.В., Ветух В.А.. Отдалённые биологические эффекты комбинированного действия радионуклеидов различной тропности. М. Энергоатомиздат, 1991. С.92-97.
4. Юрковская О.А., Еспенбетова М.Ж. и др. Воздействие малых доз радиации на состояние щитовидной железы. СГМА. Наука и здравоохранение. №2 2007. С.11-14.
5. Ежкова Т.С., Тихонов Н.Н., Шеремет Г.С. Изменение некоторых показателей антиоксидантной системы защиты организма в динамике свинцового отравления. Гигиенические вопросы производства цветных металлов. Алма-Ата 1987г. С. 120-128
6. Звонова И.А., Миронова В.В. НИИ радиационной гигиены МЗ РСФСР, санитарно-гигиенический медицинский институт, Ленинград. Сборник – Эндокринная система. 1980г. С. 103.
7. Ghosh N; Bhattacharya S.. Thyrotoxicity of the chlorides of cadmium and mercury in rabbit. Biomed Environ Sci, 1992 Sep, 5:3, 236-240
8. Дубинина Е.Е. и др. Лабораторное дело 1983 г. № 10 С. 30-33
9. Власова С.Н, Шабунина Е.И, Переслгина И.А. Лабораторное дело. 1990г. №8 С. 19-22
10. Тапбергенов С.О., Тапбергенов Т.С Влияние радиации на функциональное состояние адено-тиреоидной системы, иммунный статус, на активность ферментов метаболизма пуриновых нуклеотидов и антиоксидантной защиты. Материалы VI съезда физиологов Казахстана. 2007. С.114-117.
11. Сазонтова Т.Г., Архипенко Ю.В. Значение баланса прооксидантов и антиоксидантов – равнозначных участников метаболизма. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. №3 2007 С.2-17
12. Абиленко М.В. Ишемические реперфузионные повреждения органов.- М., 1989.
13. Леденёв А.Н., Рудге Э.К. // Бюл. Эксп. Биологии.- 1985.-Т.100, № 9- С.302-305.
14. Fariaseisner R., Chaudhuri G., Aeberhard E., Fucito J.M., // J. Biol. Chem.- 1996.- Vol. 271. – P. 6144-6151.

15. Зоров Д.Б.// *Рецепция и внутриклеточная сигнализация. (Тезисы конференции).* – Пуццоно, 2003.- С.160-162.

16. Лужников Е.А. Костомарова Л.Г. *Острые отравления.* Москва.1989.С. 250-348

Тұжырым

Бұл мақалада аса сезімтал мүшелер мен тканьдердің: бауырда, бүйректе және қан сары суында антиоксидантты жүйенің мынадай ферменттерінің: супероксиддисмутазаның (СОД), глутатионпероксидазаның (ГПО), глутатионредуктазаның (ГР) белсенділігіне гипотиреоздың және сынапты интоксикацияның әсері зерттелген. Жүргізілген зерттеулердің нәтижелері гипотиреоз және сынапты интоксикация кезінде антиоксидантты жүйедегі күрделі өзгерістер туралы дәлелдейді.

Summary

In the article was studied influence of the hypothyroidism and mercury on the activity of next antioxidant system enzymes: superoxidisedismutase (SOD), glutationperoxidase (GPO), glutatioreductase (GR) in the sensitive organs, tissues of liver, kidneys and serum of blood. Results of showed about series changes of the antioxidant system enzymes in the hypothyroidism and mercury intoxication.

УДК: 581.1:632

Омирбекова Н.Ж.

ДЕЙСТВИЕ АБИОТИЧЕСКИХ СТРЕССОВ НА НАКОПЛЕНИЕ ПРОЛИНА У ГЕНОТИПОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО УСТОЙЧИВОСТИ

(Казахский национальный университет им. аль-Фараби)

Изучено накопление свободного пролина в проростках мягкой пшеницы при действии 0,01% раствора $CdCl_2$ и 2% раствора $NaCl$. Подтверждено, что высокое содержание свободного пролина в проростках растительного организма является показателем устойчивости к действию абиотических факторов. Обнаружено, что интенсивное накопление свободного пролина характерно для устойчивых к засолению сортов Надежда и Карашаи, а сорт Шагала более устойчив к действию ионов соли кадмия.

Засуха и засоление являются факторами, понижающими продуктивность растений в аридных и полуаридных условиях. Известно, что сельское хозяйство Казахстана относится к зоне критического земледелия, более 50% пахотных земель засолены, а в засушливые годы многие регионы испытывают водный дефицит.

Одним из адаптивных свойств растительного организма к стресс-факторам является аккумуляция пролина в клетках. Накопление пролина может происходить вследствие активации синтеза этой аминокислоты, ингибирования процессов его распада или усиления гидролиза белков, содержащих большие количества пролина. В высших растениях пролин синтезируется двумя различными метаболическими путями – глутаматным и орнитиновым /1,2/. Ферменты первого из них локализованы в цитоплазме, а ферменты второго – в митохондриях. Две первые стадии синтеза пролина из глутамата катализирует один и тот же бифункциональный фермент - пирролин-5-карбоксилатсинтаза (P5CS). При многих стрессах, особенно при засолении и засухе, накопление пролина коррелирует с активностью P5CS /3/. Растения также могут синтезировать пролин из орнитина с помощью орнитинаминотрансферазы. Промежуточным продуктом этого пути является пирролин-5-карбоксилат.

При создании мутантов-суперпродукторов пролина, трансгенных растений, обладающих способностью аккумулялировать большие количества пролина, подтверждено, что именно эти растения обладают повышенной устойчивостью к засолению и водному дефициту /4,5/. Аналогичные результаты были получены при создании генетически модифицированных растений у которых устойчивость к абиотическому стрессу резко повышается при экспрессии антисмысловых РНК направленных против синтеза пролиндегидрогеназы, уменьшающей количество пролина в клетке /6/. Эти подходы могут найти большие перспективы при создании новых форм сельскохозяйственных растений устойчивых к стрессовым факторам.

Не вызывает сомнения, что накопление пролина играет положительную роль при адаптации растений к стрессовым факторам. Пролин является гидрофильной аминокислотой, наиболее широко распространенным совместимым осмолитом в высших растениях. Способность растений интенсивно накапливать свободный пролин до значительных внутриклеточных концентраций повышает адаптацию растительной клетки к стрессам, вызываемым повышением содержания различных ионов, водным дефицитом и температурными факторами. Скорость адаптационных механизмов к стрессовым факторам определяется способностью растений быстро индуцировать системы аккумуляции пролина в ответ на действие стресса /4/.

Учитывая важную роль пролина в адаптации к абиотическим факторам среды, целью настоящей работы явилось изучение накопления пролина у генотипов мягкой пшеницы различающихся по солеустойчивости и устойчивости к ионам тяжелых металлов.

Материалы и методы

Объектом исследования служили 8-и дневные и 14 дневные проростки мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) районированных сортов местной селекции: Казахстанская 3, Шагала; Надежда, Карашаш, Стекловидная 24, Казахстанская 126.

Для получения 8-дневных проростков, семена пшеницы стерилизовали 40 мин в 200 мл водной взвеси нистатина с активностью 250 000 ед. и трижды промывали по 5 мин стерильной водой. Семена проращивали 48 часов в чашках Петри на смоченной водой фильтровальной бумаге в термостате при t 25°C, и 6 дней в 2% растворе NaCl при комнатной температуре.

Для получения 14-и дневных проростков, семена замачивали в 200 мл 0,01% CdCl₂ в течение 5 часов, при температуре 25°C. Обработанные CdCl₂ семена промывали 30 минут в проточной воде, затем трижды стерильной водой, подсушивали и помещали в пластиковые чашки Петри. Семена проращивали 48 часов на смоченной водой фильтровальной бумаге в термостате при температуре 25°C. Через 48 часов проростки переносили на среду Кноппа, и в течение 12 дней проращивали при комнатной температуре. Контролем служили необработанные семена.

Содержание пролина определяли в вегетативных органах проростков по модифицированному методу, описанному L. Bates с соавт. /7/. Для этого, 1 г растительной ткани растирали в охлажденной фарфоровой ступке до гомогенного состояния с 8 мл 3% сульфосалициловой кислоты. Полученные гомогенаты центрифугировали при 8000g 5 мин (4°C). Далее 2 мл каждого гомогената вносили в пробирки, содержавшие 2 мл нингидринового реагента и 2 мл ледяной уксусной кислоты. Пробирки инкубировали при 96°C в течение 1 часа, охлаждали на льду, затем в каждую пробирку добавляли 4 мл толуола. После этого содержимое пробирок перемешивали и центрифугировали 5 мин при 8000g (4°C). Затем отбирали верхний окрашенный слой и измеряли оптическую плотность при 520-540 нм против контроля. Для определения содержания пролина был построен калибровочный график в интервале от 0,01 до 0,2 мМ пролина. При построении графика использовали навеску и различные разведения чистого пролина фирмы "Ajinomoto" (Япония).

Статистическая обработка данных проведена по П.Ф. Рокицкому /8/.

Результаты и обсуждение

У многих растений свободный пролин накапливается в ответ на разнообразные абиотические и биотические стрессы, такие как: водный дефицит, неблагоприятные температуры, засоление, ионы тяжелых металлов, инфекция патогенами, нехватка питания или ультрафиолетовое облучение /1,2/.

В данной работе семена мягкой пшеницы сорта Казахстанская 3 и Шагала обрабатывали в течение пяти часов 0,01% раствором хлористого кадмия. Содержание свободного пролина в ответ на воздействие абиотического стресса определяли в вегетативных органах проростков. Показано достоверное накопление свободного пролина в листьях, стеблях и корнях изученных растений. Следует, что высокое накопление свободного пролина в листьях и корнях растений это защитная реакция пшеницы на действие ионов соли кадмия. Так, накопление пролина в листьях сорта Казахстанская 3 увеличивается почти на 270%, в корнях на 165% относительно контроля. У сорта Шагала аккумуляция пролина возрастает в листьях до 190%, в корнях проростков до 148% по сравнению с контролем (таблица 1).

Таблица 1 – Действие 0,01% CdCl₂ на накопление свободного пролина в вегетативных органах проростков пшеницы сорта Казахстанская 3 и Шагала

Варианты опыта	Накопление свободного пролина в вегетативных органах пшеницы, мкМ/г		
	листья	стебли	корни
Казахстанская 3			
Контроль	0,10±0,05	0,31± 0,02	0,23±0,018
CdCl ₂	0,37±0,02**	0,38±0,006*	0,61±0,02***
Шагала			
Контроль	0,21±0,06	0,50± 0,02	0,35±0,06
CdCl ₂	0,61±0,03**	0,60±0,01***	0,87±0,01***
Примечание: *- при P< 0,05; ** - при P<0,01; *** - при P<0,001			

В настоящее время известно, что растения реагируют на воздействие абиотических стрессов и биопатогенов генерацией активных форм кислорода (АФК). Способность растений контролировать уровень АФК коррелирует с их устойчивостью к различным стрессам и способностью аккумулировать низкомолекулярные вещества с протекторными свойствами, таких как пролин, сорбит, глицинбетаин и др. Токсичность ионов натрия и хлора в условиях засоления связывают с образованием АФК /9/.

Ранее нами, для выявления солеустойчивости сортов мягкой пшеницы, в качестве теста на устойчивость к засолению, была определена активность ферментного комплекса малатдегидрогеназа-глутамат-оксалоацетат-аминотрансфераза (МДГ-ГОАТ) в стеблях и корнях растений пшеницы. Показано, что наиболее устойчивым к