

О.В. Музалевская, Л.И. Донская

## СРАВНЕНИЕ СПОНТАННОГО, АСКОРБАТ-ЗАВИСИМОГО И НАДН-ЗАВИСИМОГО ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И СОДЕРЖАНИЯ ТОКОФЕРОЛОВ В ЗАРОДЫШЕ И ЭНДОСПЕРМЕ СЕМЯН ГОЛОСЕМЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Иркутский государственный университет (Иркутск)

*Исследованы процессы ПОЛ и содержание токоферолов в различных структурных элементах семян хвойных растений. Установлено, что в семенах трех изученных видов функционируют системы ферментативного и неферментативного ПОЛ. Уровень НАДН-зависимого ПОЛ превосходил показатели аскорбат-зависимого. Самое низкое значение ПОЛ зарегистрировано в семенах кедра, что объясняется наличием в них мощных антиоксидантных систем.*

**Ключевые слова:** эндосперм, зародыш, семена кедра *Pinus sibirica* Du Tour, ели *Picea obovata* Ledeb. и сосны *Pinus silvestris* L., спонтанное, аскорбат-зависимое и НАДН-зависимое перекисное окисление липидов, токоферолы

## COMPARISON OF SPONTANEOUS, ASCORBATE- AND NADH-DEPENDENT LIPID PEROXIDATION WITH TOCOPHEROL CONTENT IN EMBRYO AND ENDOSPERM OF CONIFEROUS SEEDS

O.V. Muzaleskaya, L.I. Donskaya

Irkutsk State University, Irkutsk

*The POL processes have been investigated in different structural elements of Coniferous seeds. Enzyme and non-enzyme systems are functioning in the seeds of three coniferous species. Level of NADH-dependent lipid peroxidation is increased of ascorbate-dependent POL. The lowest POL value is registered in a cedar *Pinus sibirica* seeds. This result can be explaining by existing of high power antioxidant systems in the cedar seeds.*

**Key words:** endosperm, embryo, seeds of *Pinus sibirica* Du Tour, *Picea obovata* Ledeb and *Pinus silvestris* L., spontaneous, ascorbate- and NADH-dependent lipid peroxidation, tocopherols

Ранее нами показано, что основные окисляемые компоненты липидов зародыша и эндосперма семян изучаемых видов хвойных представлены полиеновыми жирнокислотными остатками ТГ такими, как линолевая 18 : 2 (n – 6), линоленовая 18 : 3 (n – 3) Δ5, 9, 12 и пиноленовая 18 : 3 Δ5, 9, 12 кислоты [8]. Синтез липидов при созревании семян происходит в короткий период времени и для своего энергообеспечения требует значительной интенсивности дыхания.

Кислород, будучи необходимым фундаментом энергетического метаболизма и дыхания, в то же время является причиной дегенеративных состояний в растительных клетках [10]. В организме существует два пути восстановления кислорода. Один из них – оксидазный. По этому пути происходит окисление энергетических субстратов, реализуемое в митохондриальной системе электронного транспорта. Молекулярный кислород является конечным акцептором электронов и восстанавливается до воды. В нормальных условиях этот процесс сопряжен с синтезом АТФ. Другой путь – оксигеназный – характеризуется тем, что полного четырехэлектронного восстановления кислорода не происходит, и в результате присоединения к кислороду одного, двух или трех электронов возникают активные формы кислорода. В условиях нормальной жизнедеятельности клетки, активные

формы кислорода образуются постоянно в допустимых количествах. При определенных условиях происходят нарушения регуляции синтеза АФК в клетке и, как следствие этого, образование их избытка [10, 19]. Избыточное содержание АФК часто приводит к разрушению клеточных структур и преждевременной гибели клетки, что в свою очередь на тканевом уровне вызывает потерю семенами жизнеспособности [12, 14]. Механизмы, посредством которых радикалы кислорода наносят окислительное повреждение запасным и мембранным липидам, белкам и нуклеиновым кислотам, в основном связывают с реакциями перекисного окисления [18, 20]. В классификации систем ПОЛ высших растений их выделяют три, обладающие общим способом развития – цепной радикальной реакцией. Это – неферментативная реакция, активируемая аскорбатом, и две ферментативные – НАДН- и НАДФН-зависимые реакции. В семенах растений, включая голосеменные, имеется все необходимое для протекания процессов ПОЛ: источники активного кислорода, субстраты перекисного окисления – ненасыщенные жирные кислоты ТГ и мембран, железо в разных формах, способные инициировать процесс ПОЛ.

В отсутствие экстремальных эндо- или экзогенных факторов процесс ПОЛ протекает в клетках сбалансировано. Постоянство концентрации

продуктов и скорости реакций ПОЛ поддерживается антиоксидантными системами [1, 2, 16]. Вышесказанное позволяет предположить наличие в семенах хвойных растений, особенно в высокомасличных *Pinus sibirica* Du Tour, эффективной антиоксидантной системы защиты, одним из компонентов которой являются токоферолы. Целью настоящей работы была оценка способности семян голосеменных растений к перекисному окислению и содержания суммы токоферолов в семенах *Pinus sibirica* Du Tour, *Pinus silvestris* L. и *Picea obovata* методом ВЭЖХ.

#### МЕТОДИКА

Объектом исследования служили эндосперм и зародыш семян кедр *Pinus sibirica* Du Tour, ели *Picea obovata* Ledeb. и сосны *Pinus silvestris* L., предоставленные Большеберезненским лесхозом.

#### Определение перекисного окисления липидов

В экспериментах определяли спонтанную, ферментативную и ферментативную реакции ПОЛ. При индукции системы спонтанной ПОЛ реакция происходила в среде состава 25 мМ Трис-НСl (рН 7.4), 175 мМ КСl без добавления прооксидантов. Для индукции неферментативного перекисного окисления в среду инкубации добавляли 1 мМ аскорбата, 1 мМ АДФ и 20 мкМ  $Fe^{3+}$ . Для индукции неферментативного перекисного окисления в среду инкубации добавляли 1 мМ НАДН, 1 мМ АДФ и 20 мкМ  $Fe^{3+}$ . Уровень перекисного окисления липидов определялся измерением первичного продукта перекисного окисления липидов — диеновой конъюгации. В ходе перекисного окисления на стадии образования свободных радикалов в молекулах ПНЖК возникает система сопряженных двойных связей, что сопровождается появлением нового максимума в спектре поглощения.

Определение диеновых конъюгатов (продуктов ПОЛ) проводили по модифицированному методу И.Д. Стальной [11].

Все полученные данные обработаны статистически [4] с использованием пакета программ «Statistica 5.0». Выводы при сопоставлении делали при  $p > 0,95$ . На диаграммах показаны средние по группам с величинами доверительного интервала.

#### Определение содержания токоферолов

Экстракцию общих липидов из растительных тканей осуществляли по методу Фолча [17].

Для количественного определения токоферолов в липидах семян кедр сибирского использовали микроколоночный хроматограф со спектрофотометрическим УФ-детектированием — «Милхром-1» (ПО «Научприбор», г. Орел).

Условия хроматографирования витамина Е:

Колонка — размером 2 × 64 мм, заполненная сорбентом нуклеосил-5, С18;

Объем пробы — 20 мкл;

Подвижная фаза — 96%  $C_2H_5OH$

Длина волны детектора — 290 нм;

Температура колонки — 35 °С;

Скорость потока — 100 мкл/мин;

Скорость подачи бумаги — 0,6 см/мин.

Для идентификации токоферолов применяли стандартный раствор витамина Е с концентрацией 0,9 мг/мл [15]. Предел обнаружения витамина Е составляет 10 мкг/мл. Проведена статистическая обработка результатов определения. Ошибка воспроизводимости не превышает  $\pm 5,2\%$ .

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Семена *Pinus sibirica* Du Tour, ели *Picea obovata* Ledeb. и сосны *Pinus silvestris* L. существенно различаются по содержанию липидов. Наибольшее их количество (до 60 %) присутствует в семенах кедр, но, согласно полученным данным, в них зарегистрирован наименьший уровень ПОЛ. Об этом свидетельствует низкое содержание в зародыше и эндосперме кедр продуктов ПОЛ — диеновых конъюгатов (рис. 1, 3), между накоплением которых и интенсивностью перекисного окисления установлена прямая зависимость [3]. В зародыше и эндосперме сосны спонтанное ПОЛ значительно выше, чем в семенах кедр, но ниже по сравнению с семенами ели (рис. 1 — 3), хотя в них присутствует наименьшее количество липидов (30 %). Кроме того, липиды зародышей изученных семян более устойчивы к ПОЛ, чем липиды эндосперма. Это различие можно объяснить тем, что зародыш семени имеет иную природу и дает начало новому растению.

При иницировании ПОЛ в клетках растений в итоге используются одни и те же субстраты, но существуют определенные различия в реакциях ферментативного и неферментативного ПОЛ, обусловленные особенностями начальных стадий [3, 6]. Основное отличие ферментативных систем от неферментативных состоит в использовании различных восстановителей железа [5, 9]. В первом случае — это НАДН, НАДФН, во втором случае — аскорбат.

Интересной особенностью этих систем является и различное сродство к ионам железа [7]. Ферментативное ПОЛ обладает очень высоким сродством к железу и для проявления его максимальной активности вполне хватает эндогенного железа [5]. Инициация ПОЛ в семенах изучаемых растений происходила в присутствии аскорбата натрия (система неферментативного ПОЛ). Уровень аскорбат-зависимого (неферментативного) ПОЛ в семенах кедр превосходит его значение при спонтанном процессе, особенно в эндосперме (рис. 1). Уровень аскорбат-зависимого ПОЛ в эндосперме и зародыше семян сосны также превысил показатель спонтанного ПОЛ. В эндосперме сосны это значение интенсивности ПОЛ возросло почти в два раза (от  $27,455 \pm 0,076$  до  $46,788 \pm 0,0129$  нмоль/г) (рис. 1). Наиболее высокий уровень аскорбат-зависимого ПОЛ отмечен в семенах ели (рис. 1, 2).

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что реакции ферментативного ПОЛ протекают в семенах кедр *Pinus sibirica* Du Tour, ели *Picea obovata* Ledeb. и сосны *Pinus silvestris* L. с другой

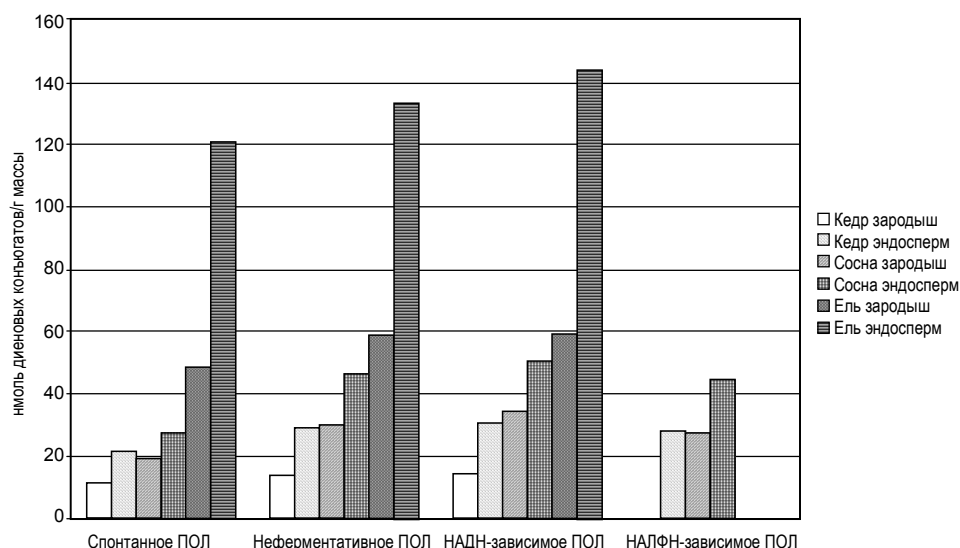


Рис. 1. Перекисное окисление липидов в семенах голосеменных растений.

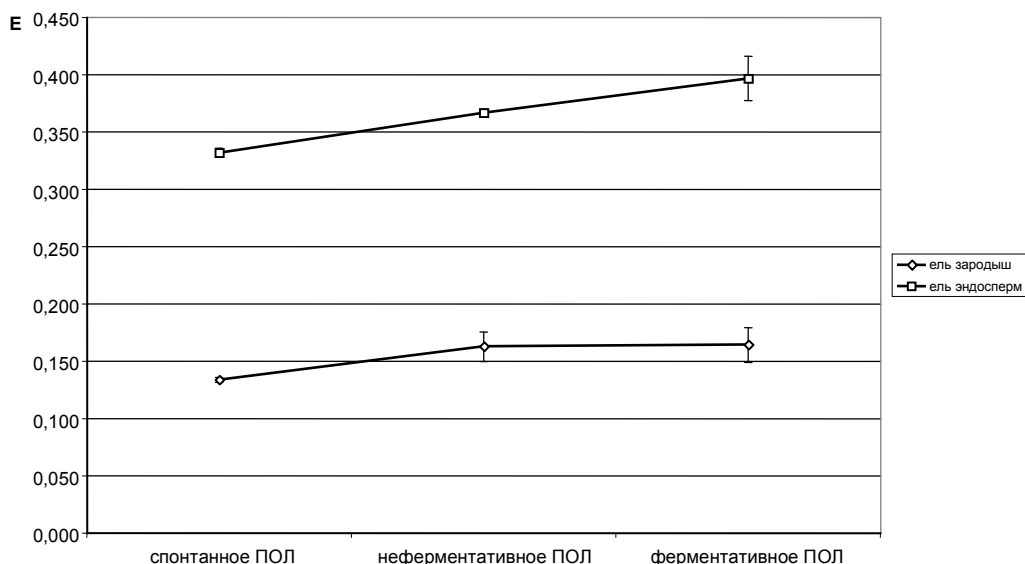


Рис. 2. Перекисное окисление липидов в зародыше и эндосперме ели.

интенсивностью по сравнению с неферментативными. Инициация ПОЛ в семенах растений в этой серии экспериментов происходила в присутствии НАДН или НАДФН (системы ферментативного ПОЛ). В целом, уровень НАДН-зависимого ПОЛ был выше, чем аскорбат-зависимого (рис. 1). В семенах сосны наблюдалась гораздо более значительная индукция ПОЛ, особенно в эндосперме, где она почти в 1,5 раза выше, чем в зародыше, при этом НАДН-зависимая система более эффективна. Самый высокий уровень НАДН-зависимого ПОЛ была отмечена в семенах ели (рис. 1, 2).

НАДФН-зависимый уровень индукции перекисного окисления липидов одинаков в эндосперме кедр и зародыше сосны и несколько выше в эндосперме сосны. Не были получены результаты ферментативного НАДФН-зависимого ПОЛ у отдельных видов

семян, что не позволяет уверенно говорить о статистической достоверности наблюдаемых изменений.

Как отмечалось выше, семена изучаемых видов голосеменных накапливают значительное количество липидов, имеющих высокую степень непереносимости. Очевидно, изменения, происходящие в клетках в результате воздействия образующихся продуктов ПОЛ, могут быть пусковыми механизмами защиты. По мнению Кения с соавторами [13] в условиях окислительного стресса более эффективной является защита с помощью низкомолекулярных антиоксидантов, к которым относятся и токоферолы. Токоферол ингибирует ПОЛ, взаимодействуя с перекисным радикалом, и связывает СЖК [1, 16]. Наибольшее количество токоферола характерно для семян кедр, накапливающих липиды в количестве до 60 % от сырого

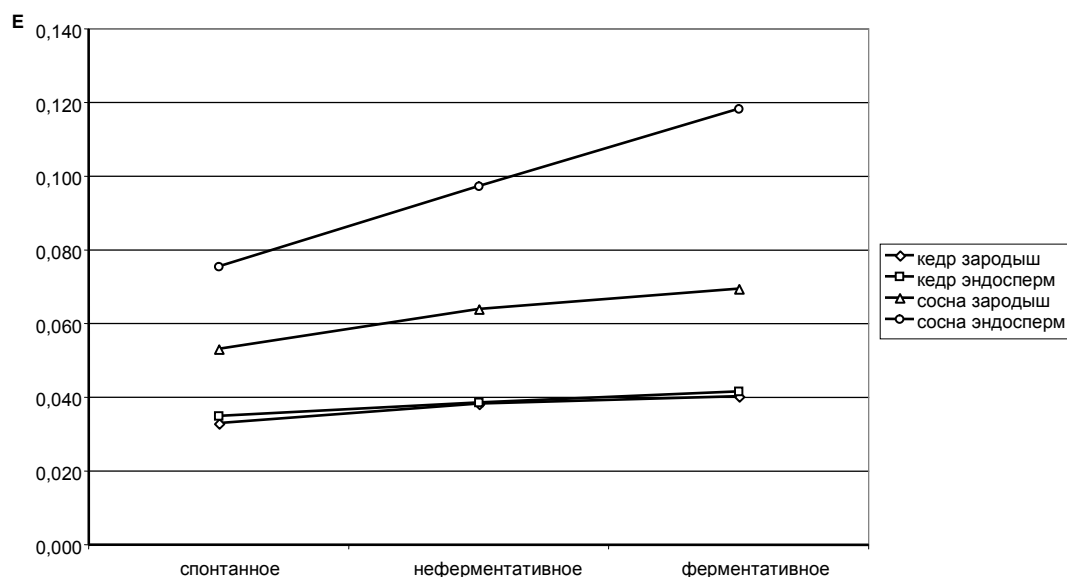


Рис. 3. Перекисное окисление липидов в семенах кедрa и сосны.

Таблица 1

Общее содержание токоферолов в зародыше и эндосперме семян хвойных

Объект исследования	Содержание витамина Е, мг на 1 г ткани
Эндосперм кедрa <i>Pinus sibirica</i> Du Tour	0,70 ± 0,03
Зародыш кедрa <i>Pinus sibirica</i> Du Tour	0,74 ± 0,026
Эндосперм сосны <i>Pinus silvestris</i> L.	0,36 ± 0,015
Зародыш сосны <i>Pinus silvestris</i> L.	0,50 ± 0,02
Эндосперм ели <i>Picea obovata</i> Ledeb	0,47 ± 0,023
Зародыш ели <i>Picea obovata</i> Ledeb	0,52 ± 0,03

веса, причем содержание токоферолов в зародыше (74 мг/г) выше, чем в эндосперме (70 мг/г) (табл. 1). Эта тенденция еще более выражена в семенах ели и особенно в семенах сосны, где эти показатели различаются почти в 1,5 раза. Такая разница естественна и вытекает из функции, выполняемой зародышем.

В то же время не выявлено прямой корреляции в содержании токоферола и интенсивностью перекисного окисления липидов. Так, в семенах ели содержание токоферолов выше (0,47 ± 0,023 и 0,52 ± 0,03, в эндосперме и зародыше соответственно), чем в семенах сосны (0,36 ± 0,015 и 0,50 ± 0,02), тогда как уровень перекисного окисления липидов значительно превосходит этот показатель в семенах сосны и особенно кедрa (табл. 1, рис. 1).

Таким образом, можно с уверенностью констатировать, что семена изученных голосеменных растений различаются по способности к перекисному окислению. Липиды зародышей *Pinus sibirica* Du Tour, *Picea obovata* Ledeb. и *Pinus silvestris* L. более устойчивы к ПОЛ, чем липиды эндосперма. Наибольшее содержание токоферолов характерно для семян кедрa, но не отмечается прямой зависимо-

сти между количеством токоферолов и интенсивностью ПОЛ. НАДФН-зависимый уровень индукции перекисного окисления липидов в семенах хвойных растений является вопросом дальнейших исследований.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бурлакова Е.Б. Перекисное окисление липидов мембран и природные антиоксиданты / Е.Б. Бурлакова, Н.Г. Храпова // Успехи химии. — 1985. — Т. LIV, Вып. 9. — С. 1540—1558.
2. Веселовский В.А. Ороли биоантиоксидантов в устойчивости растений / В.А. Веселовский // Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии. — М.: Наука, 1982. — С. 150—152.
3. Владимиров Ю.А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю.А. Владимиров, А.И. Арчаков. — М.: Наука, 1972. — 252 с.
4. Гланц С.А. Медико-биологическая статистика / С.А. Гланц. — М.: Практика, 1998. — 459 с.
5. Жибоедов П.М. Белковый состав и мембранные липиды интродуцированных растений в Заполярье / П.М. Жибоедов, В.К. Жиров, С.М. Руденко. — Апатиты: Кольский филиал АН СССР, 1987. — 144 с.

6. Исследование перекисного окисления липидов в растительных митохондриях в связи с проблемой температурного стресса / Ю.М. Константинов, Г.Н. Луценко, В.А. Подсосный, В.В. Зыкова // Стрессовые белки растений. — Новосибирск: Наука, 1989а. — С. 88—113.
7. Кения М.В. Роль низкомолекулярных антиоксидантов при окислительном стрессе / М.В. Кения, А.И. Лукаш, Е.Н. Гуськов // Успехи современной биологии. — 1993. — Т. 113, Вып. 4. — С. 456—470.
8. Музалевская О.В. Изучение состава жирных кислот липидов семян голосеменных растений / О.В. Музалевская, Л.И. Донская // Сб. тезисов докладов V съезда Общества физиологов растений России. — Пенза, 2003. — С. 414—415.
9. Рубин Б.А. Окисление липидных компонентов в изолированных хлоропластах под действием света субстрата и продукты перекисления липидов / Б.А. Рубин, М.Н. Мерзляк, С.Г. Юферова // Физиология и биохимия культурных растений. — 1976. — Т. 23, № 2. — С. 254—261.
10. Скулачев В.П. Кислород в живой клетке: добро и зло / В.П. Скулачев // Соросовский образовательный журнал. — 1996. — № 3. — С. 4—10.
11. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот / И.Д. Стальная // Современные методы биохимии. — М.: Медицина, 1977. — С. 63—64.
12. Тарчевский И.А. Регуляторная роль деградации биополимеров и липидов / И.А. Тарчевский // Физиология растений. — 1992. — Т. 39, № 6. — С. 1215—1223.
13. Участие токоферола и его аналогов в процессах перекисного окисления липидов и транспорта электронов в митохондриях печени крыс *in vivo* / Н.И. Куница, И.В. Кузьменко, С.М. Алексеев, Е.И. Захарова и др. // Биохимия. — 1993. — Т. 5, Вып. 11. — С. 1709—1713.
14. Физиология и биохимия покоя и прорастания семян. — М.: Колос, 1982. — 495 с.
15. Филимонов В.Н. Определение жирорастворимых витаминов в кормовых препаратах методом ВЭЖХ / В.Н. Филимонов, И.Ф. Колосова, Л.Н. Баятинская // Ж. аналит. химии. — 1989. — Т. 44, Вып. 8. — С. 1433—1436.
16. Храпова Н.Г. О взаимодействии природных и синтетических антиоксидантов / Н.Г. Храпова // Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии. — М., 1982. — С. 59—73.
17. Folch J. // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 191. — P. 833—841.
18. Shewfelt R.L. Role of lipid peroxidation in the mechanism of membrane-associated disorders in edible plant tissue / R.L. Shewfelt, M.E. Erickson // Trends in Food Sci. Technol. — 1991. — Vol. 2. — P. 152—154.
19. The oxidative stress response in *Enterococcus faecalis*: relationship between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tolerance and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress proteins / S. Flahaut, J.M. Laplace, J. Frure, Y. Auffray // Lett. Appl. Microbiol. — 1998. — Vol. 26 (4). — P. 259—264.
20. Wilson D.O. The lipid peroxidation model of seed aging / D.O. Wilson, M.B. McDonald Jr. // Seed Sci. Tech. — 1986. — Vol. 14. — P. 269—300.