

Министерство образования и науки Российской Федерации

УДК 581.1, 574.2

ГРНТИ 34.31.00, 34.31.01, 34.31.17, 34.35.51

Инв. №

УТВЕРЖДЕНО:

Исполнитель:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н.Ельцина»

От имени Руководителя организации
Зам. проректора по науке

_____/ Иванов А.О.
М.П.

НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИЙ ОТЧЕТ

о выполнении 6 этапа Государственного контракта
№ П1301 от 09 июня 2010 г. и Дополнению от 05 марта 2011 г. № 1, Дополнению от 29
июня 2011 г. № 2

Исполнитель: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н.Ельцина»

Программа (мероприятие): Федеральная целевая программа «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг., в рамках реализации мероприятия № 1.3.1 Проведение научных исследований молодыми учеными - кандидатами наук.

Проект: Антиоксидантный статус как модель для исследования устойчивости растений к антропогенному воздействию

Руководитель проекта:

_____/Малева Мария Георгиевна
(подпись)

Екатеринбург
2012 г.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ИСПОЛНИТЕЛЕЙ
по Государственному контракту П1301 от 09 июня 2010 на выполнение поисковых
научно-исследовательских работ для государственных нужд

Организация-Исполнитель: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н.Ельцина»

Руководитель темы:

кандидат биологических наук, без ученого звания _____ Малева М. Г.
подпись, дата

Исполнители темы:

кандидат биологических наук, без ученого звания _____ Чукина Н. В.
подпись, дата

доктор географических наук, старший научный сотрудник _____ Борисова Г. Г.
подпись, дата

без ученой степени, без ученого звания _____ Ермошин А. А.
подпись, дата

без ученой степени, без ученого звания _____ Кислицина М. Н.
подпись, дата

без ученой степени, без ученого звания _____ Фазлиева Э. Р.
подпись, дата

Реферат

Отчет 123 с., 4 ч., 9 рис., 0 табл., 78 источн., 0 прил.

Устойчивость растений , тяжелые металлы , органические поллютанты , окислительный стресс , антиоксидантный статус , низкомолекулярные антиоксиданты , ферменты-антиоксиданты

В отчете представлены результаты исследований, выполненных по 6 этапу Государственного контракта № П1301 "Антиоксидантный статус как модель для исследования устойчивости растений к антропогенному воздействию" (шифр "НК-661П") от 09 июня 2010 по направлению "Общая биология и генетика" в рамках мероприятия 1.3.1 "Проведение научных исследований молодыми учеными - кандидатами наук.", мероприятия 1.3 "Проведение научных исследований молодыми учеными - кандидатами наук и целевыми аспирантами в научно-образовательных центрах" , направления 1 "Стимулирование закрепления молодежи в сфере науки, образования и высоких технологий." федеральной целевой программы "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России" на 2009-2013 годы.

Цель работы - провести обобщение и оценку результатов теоретических и экспериментальных исследований роли антиоксидантного статуса растений при действии неорганических (тяжелые металлы) и органических (мочевина, фенольные соединения) поллютантов.

Для реализации данной цели были поставлены следующие задачи:

- 1) выполнить сравнительную оценку антиоксидантного статуса высших наземных и водных растений из местообитаний с разной антропогенной нагрузкой;
- 2) провести сравнительный анализ устойчивости растений к неорганическим и органическим поллютантам;
- 3) выявить значимость низкомолекулярных и высокомолекулярных компонентов системы антиоксидантной защиты при формировании устойчивости растений к антропогенному стрессу.
- 4) разработать методологию и алгоритм, позволяющие увеличить объем знаний для более глубокого понимания изучаемого предмета исследования;
- 5) разработать методические рекомендации по использованию теоретических и экспериментальных данных о состоянии антиоксидантного статуса растений для комплексной диагностики их устойчивости к антропогенному воздействию;
- 6) разработать рекомендации по использованию материалов исследований в образовательном процессе.

На VI этапе (заключительном) были использованы современные методы анализа и статистической обработки данных с использованием прикладных

программ Excel 7.0 и Statistica 6.0.

1. Ресурсы научной библиотеки, в т.ч. доступ к электронным документам (статьи, патенты, базы данных), ресурсы Интернета.
2. Собственные экспериментальные данные и методические наработки.
3. Материально-техническая база: компьютер Centurion536, ноутбук Acer Aspire 4810TG-354G32Mi.

В результате проведения трехлетнего цикла научно-исследовательских работ:

- выполнена сравнительная оценка антиоксидантного статуса растений из местообитаний с разной антропогенной нагрузкой;
- проведен сравнительный анализ устойчивости растений к неорганическим и органическим поллютантам;
- выявлена значимость низкомолекулярных и высокомолекулярных компонентов системы антиоксидантной защиты при формировании устойчивости растений к антропогенному стрессу.
- разработаны методические рекомендации по использованию параметров антиоксидантной системы для комплексной диагностики устойчивости растений к антропогенному воздействию.

Содержание

Введение	6
1 Аннотированная справка по научным результатам НИР, полученным на предыдущих этапах	13
1.1 Аннотированная справка по научным результатам НИР, полученным на I и II этапах	13
1.2 Аннотированная справка по научным результатам НИР, полученным на III и IV этапах	17
1.3 Аннотированная справка по научным результатам НИР, полученным на V этапе	22
2 Аналитический отчет о проведении теоретических и экспериментальных исследований	26
2.1 Оценка антиоксидантного статуса растений из местообитаний с разной антропогенной нагрузкой	26
2.2 Сравнительный анализ устойчивости растений к неорганическим и органическим поллютантам	33
2.3 Роль низкомолекулярных и высокомолекулярных компонентов системы антиоксидантной защиты при формировании устойчивости растений к антропогенному стрессу	39
3 Отчет по обобщению и оценке результатов исследований	45
3.1 Методология и алгоритмы, позволяющие увеличить объем знаний для более глубокого понимания изучаемого предмета	47
3.2 Методические рекомендации по использованию результатов поисковой научно-исследовательской работы	50
4. Публикации результатов НИР	57
4.1 Заключение экспертной комиссии по открытому опубликованию	57
4.2 Копии статей	63
Заключение	112
Список использованных источников	117

Введение

Жизнь растений протекает в постоянном взаимодействии с биотическими и абиотическими факторами среды обитания, которые оказывают существенное воздействие на многие физиологические функции и даже выступают в качестве регуляторов роста, развития и продуктивности организма. Такое взаимодействие приводит к формированию комплекса защитных реакций, что позволяет растению выжить и приспособиться к изменяющимся условиям.

Ведущие прикрепленный образ жизни растения часто оказываются в неблагоприятных или даже стрессовых условиях. В последние десятилетия в связи с быстрым развитием промышленности во всем мире усиливается антропогенное воздействие, к которому растения эволюционно не приспособлены. С каждым годом антропогенные факторы становятся все более разнообразными, а их действие – все более интенсивным. Установлено, что эти факторы сужают пределы толерантности растений, то есть уменьшают их устойчивость к естественным факторам (температуре, влажности и др.). Поэтому исследование механизмов устойчивости растений к антропогенному воздействию является исключительно важным и актуальным.

Существует много сведений об антиоксидантных системах клеток и их активации при стрессе. Установлено, что, как правило, под воздействием неблагоприятных условий в клетках живых организмов развиваются процессы окислительного стресса, вызванные генерацией активных форм кислорода (АФК). АФК обладают высокой реакционной способностью и нарушают течение многих процессов в клетке, а также ее структуры, например мембраны, вызывая перекисное окисление липидов. Наши исследования подтверждают, что в растениях окислительный стресс возникает в результате воздействия факторов разной природы, в том числе под действием неорганических (тяжелые металлы) и органических

(мочевина, фенольные соединения) поллютантов. Антиоксидантный статус растений определяется в первую очередь сбалансированностью между прооксидантными и антиоксидантными реакциями, протекающими в клетке.

В клетках существуют антиоксидантные системы, осуществляющие нейтрализацию АФК и, следовательно, предотвращающие повреждения клеток. Эти системы включают в себя как низкомолекулярные небелковые антиоксиданты (каротиноиды, пролин, аскорбат, глутатион, флавоноиды и др.), так и специфические ферменты-антиоксиданты (СОД, КАТ, пероксидазы и др.) и SH-белки. Исследование особенностей функционирования антиоксидантных систем важно для понимания того, как растения адаптируются к антропогенно измененным условиям среды. Это знание позволит в будущем решать многие биотехнологические вопросы, касающиеся восстановления качеств среды методами фиторемедиации наземной и водной среды; увеличения продуктивности сельскохозяйственных культур путем создания сортов с повышенным антиоксидантным статусом, что позволит существенно увеличить их стрессоустойчивость и сократить потери урожая при неблагоприятных экологических условиях; использования антиоксидантных свойств растений в фармакологии и медицине; сохранения биоразнообразия дикорастущих и культурных растений в условиях климатических изменений и загрязнения окружающей среды.

Целью данного проекта было исследование роли антиоксидантного статуса растений в обеспечении устойчивости к антропогенному воздействию, в частности, к действию неорганических (тяжелые металлы) и органических (мочевина, фенольные соединения) поллютантов.

Для этого у наземных и водных растений из естественных местообитаний с разным уровнем антропогенной нагрузки, а также в модельных экспериментах были исследованы ответные прооксидантные и антиоксидантные реакции с использованием современных биохимических методов.

Проект реализован в 6 этапов.

Цель I этапа исследований: изучить состояние антиоксидантной системы у высших растений из местообитаний с разной антропогенной нагрузкой, в частности, *оценить роль низкомолекулярных компонентов антиоксидантной защиты (каротиноидов, аскорбата, глутатиона, пролина и флавоноидов).*

Для реализации данной цели были поставлены следующие задачи:

- 1) провести оценку характера и степени антропогенной нагрузки на выбранные наземные и водные экосистемы;
- 2) подобрать эффективные методики определения антиоксидантного статуса растений;
- 3) освоить новые методы определения свободных радикалов в растительном материале;
- 4) выявить оптимальные методики для определения содержания низкомолекулярных антиоксидантов в листьях растений;
- 5) протестировать выбранные методы на растениях из природных местообитаний с разной антропогенной нагрузкой.

Цель II этапа исследований: изучить состояние антиоксидантной системы у высших растений из местообитаний с разной антропогенной нагрузкой, в частности, *определить роль высокомолекулярных компонентов антиоксидантной защиты.*

Для реализации данной цели были поставлены следующие задачи:

- 1) провести анализ современных методов исследования активности антиоксидантных ферментов растений, выбрать наиболее эффективные методики;
- 2) определить активность ферментов-антиоксидантов в листьях растений из местообитаний с разной антропогенной нагрузкой;
- 3) измерить уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) у наземных и водных растений, как индикаторной реакции на окислительный стресс;

- 4) определить общее содержание водорастворимых антиоксидантов;
- 5) измерить содержание SH-белков, как компонентов антиоксидантной системы, в листьях растений из «условно чистых» и загрязненных экосистем.

Решение этих задач полностью выполнено, что позволило комплексно оценить роль низко- и высокомолекулярных компонентов антиоксидантной защиты у растений, длительно адаптированных к антропогенному воздействию и определить характер взаимосвязи между этими компонентами и устойчивостью видов в целом.

Цель III этапа исследований: изучить взаимосвязь между активностью антиоксидантных систем растений и их устойчивостью к тяжелым металлам в модельных системах, *в частности, выявить роль низкомолекулярных антиоксидантов при окислительном стрессе под действием тяжелых металлов.*

Для реализации данной цели были поставлены следующие задачи:

- 1) на основе изучения отечественной и зарубежной литературы представить аналитический обзор, отражающий современный опыт исследования роли низкомолекулярных и высокомолекулярных антиоксидантов в формировании устойчивости высших растений к действию неорганических поллютантов (тяжелых металлов);
- 2) в модельных экспериментах провести оценку аккумулятивной способности растений в зависимости от дозы токсиканта и времени воздействия;
- 3) освоить методику гистохимического анализа распределения металлов в тканях растений и применить ее в модельных экспериментах;
- 4) выявить взаимосвязь между накоплением тяжелых металлов и изменениями в антиоксидантном статусе изучаемых растений, для этого:

выявить степень окислительного повреждения в клетках растений при действии тяжелых металлов (уровень перекисного окисления липидов и др.); исследовать влияние тяжелых металлов на содержание низкомолекулярных антиоксидантов в листьях растений;

- 5) изучить роль экзогенных низкомолекулярных антиоксидантов (антоцианов, аскорбата, пролина) при действии тяжелых металлов.

Цель IV этапа исследований: изучить взаимосвязь между активностью антиоксидантных систем растений и их устойчивостью к тяжелым металлам в модельных системах, *в частности, выявить роль ферментов-антиоксидантов и SH-белков при окислительном стрессе под действием тяжелых металлов.*

Для реализации данной цели поставлены следующие **задачи:**

- 1) определить активность основных ферментов-антиоксидантов (супероксиддисмутазы, каталазы, пероксидазы, глутатионредуктазы) в листьях растений при действии тяжелых металлов;
- 2) изучить роль SH-белков при формировании устойчивости высших растений к действию тяжелых металлов;
- 3) с использованием метода гель-электрофореза (SDS-ПААГ) выявить наличие специфических низкомолекулярных белков в ответ на действие тяжелых металлов.

Решение этих задач полностью выполнено, что позволило оценить состояние антиоксидантного статуса высших растений в зависимости от их устойчивости к тяжелым металлам в модельных системах.

Цель V этапа исследований: изучить взаимосвязь между активностью антиоксидантных систем растений и их устойчивостью к мочеvine и фенольным соединениям в модельных экспериментах.

Для реализации данной цели были поставлены следующие задачи:

- 1) на основе изучения отечественной и зарубежной литературы представить аналитический обзор, отражающий современный опыт исследования роли низкомолекулярных и высокомолекулярных

антиоксидантов в формировании устойчивости высших растений к действию органических поллютантов (мочевины, фенольных соединений);

- 2) в модельных опытах оценить степень токсичности разных доз мочевины и фенольных соединений;
- 3) определить степень окислительного повреждения в клетках растений при действии органических поллютантов;
- 4) исследовать влияние органических поллютантов на содержание низкомолекулярных антиоксидантов в листьях растений;
- 5) измерить активность основных ферментов-антиоксидантов (супероксиддисмутазы, каталазы, пероксидазы и др.) в листьях растений при действии мочевины и фенольных соединений;
- б) изучить антиоксидантную роль SH-белков при формировании устойчивости растений к действию органических загрязнителей.

Решение этих задач полностью выполнено, что позволило оценить состояние антиоксидантного статуса высших растений в зависимости от их устойчивости к органическим поллютантам в модельных системах.

Цель VI этапа исследований: провести обобщение и оценку результатов теоретических и экспериментальных исследований роли антиоксидантного статуса растений при действии неорганических (тяжелые металлы) и органических (мочевина, фенольные соединения) поллютантов.

Для реализации данной цели были поставлены следующие задачи:

- 1) выполнить сравнительную оценку антиоксидантного статуса высших наземных и водных растений из местообитаний с разной антропогенной нагрузкой;
- 2) провести сравнительный анализ устойчивости растений к неорганическим и органическим поллютантам;
- 3) выявить значимость низкомолекулярных и высокомолекулярных компонентов системы антиоксидантной защиты при формировании устойчивости растений к антропогенному стрессу.

- 4) разработать методологию и алгоритмы, позволяющие увеличить объем знаний для более глубокого понимания изучаемого предмета исследования;
- 5) разработать методические рекомендации по использованию теоретических и экспериментальных данных о состоянии антиоксидантного статуса растений для комплексной диагностики их устойчивости к антропогенному воздействию;
- 6) разработать рекомендации по использованию материалов исследований в образовательном процессе.

1 Аннотированная справка по научным результатам НИР, полученным на предыдущих этапах

1.1 Аннотированная справка по научным результатам НИР, полученным на I и II этапах

Целью I и II этапа исследований было изучение состояния антиоксидантной системы у высших растений из местообитаний с разной антропогенной нагрузкой. Для этого на I этапе исследований была проведена оценка роли *низкомолекулярных компонентов антиоксидантной защиты* (каротиноидов, аскорбата, глутатиона, пролина и флавоноидов) у высших наземных и водных растений из природных местообитаний с разной степенью загрязнения тяжелыми металлами. На II этапе исследований была выявлена степень окислительного повреждения в клетках этих же растений и определена роль *высокомолекулярных компонентов антиоксидантной защиты*, в частности ферментов-антиоксидантов – супероксиддисмутазы, каталазы, пероксидазы и полифенолоксидазы.

Для достижения цели были проведены теоретические и экспериментальные исследования, благодаря которым выбранные эффективные методики для определения содержания низкомолекулярных антиоксидантов и активности ферментов-антиоксидантов были апробированы на 5 видах наземных и 10 видах водных растений из местообитаний с разной антропогенной нагрузкой. В окрестностях промышленных предприятий Среднего Урала были определены территории сбора растений, характеризующиеся разным уровнем техногенного воздействия от импактных зон до фоновых.

Исследования на наземных растениях были проведены в пяти местообитаниях города Нижний Тагил, одном из крупных промышленных регионов Среднего Урала, почвенный покров которого испытывает загрязнение тяжелыми металлами, а также на биостанции УрГУ («условный контроль»). Исследования на высших водных растениях были проведены в

водоемах и водотоках Свердловской области, характеризующихся различным уровнем техногенного воздействия, и, следовательно, разной степенью загрязненности вод.

Были использованы следующие методы исследования:

Количество хлорофиллов *a*, *b*, каротиноидов определяли в 80% ацетоновом экстракте, спектрофотометрически на цифровом UV-VIS спектрофотометре PD 303 UV “APEL” (Япония), при длинах волн 440, 649 и 665 нм соответственно. Содержание хлорофиллов рассчитывали по Vernon, количество каротиноидов рассчитывали по Wettstein [1].

Содержание тяжелых металлов в листьях растений определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии после мокрого озоления 70% HNO₃ (осч) [2]

Определение содержания свободного пролина проводили по методике Bates [3]. Содержание аскорбиновой кислоты и глутатиона определяли трилонометрическим методом [4]. Содержание флавоноидов и водорастворимых антиоксидантов определяли по Рогожину [5].

Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли в бутанольном экстракте по изменению содержания продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой [6].

Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли методом, основанном на измерении ингибирования фотохимического восстановления нитросинего тетразолия [7].

Активность гваяколовой пероксидазы (ГП) оценивали по увеличению оптической плотности реакционной среды при 470 нм в результате окисления гваякола [8].

Активность каталазы (КАТ) и полифенолоксидазы (ПФО) в листьях гидрофитов определяли титрометрическим методом [9].

Содержание SH-групп в общей растворимой фракции и мембранно-связанных белках определяли с помощью 5,5'-дителиобис(2-нитробензойной) кислоты (ДТНБК) (“Fluka”, Германия) по методу Ellman [10]. Небелковые

тиолы определяли по Nagalakshmi и Prasad [11]. За содержание SH-групп в растворимых белках принимали результат вычитания количества небелковых тиолов из общего количества сульфгидрильных групп в растворимой фракции. Количество растворимых и мембранно-связанных белков определяли по Shakterle и Pollack [12].

Статистическую обработку проводили с помощью пакетов прикладных программ Excel 7.0 и Statistica 6.0. Для проверки достоверности полученных результатов использовали непараметрический критерий Манна-Уитни.

Анализ результатов исследования позволил сделать следующие выводы:

1. Обнаружено, что у исследованных наземных растений в зависимости от интенсивности антропогенной нагрузки увеличивалось содержание каротиноидов и уменьшалось содержание хлорофиллов. Вероятно, это связано с защитной, антиоксидантной функцией каротиноидов.
2. Выявлено существенное увеличение содержания каротиноидов (в среднем в 1.6 раза) у гидрофитов из более загрязненных водотоков. Двукратное повышение данного параметра отмечено в листьях *Lemna gibba*.
3. Установлено, что накопление металлов в листьях гидрофитов из водных объектов, подвергающихся значительному антропогенному воздействию, существенно выше в сравнении с растениями из менее загрязненных водоемов и водотоков.
4. Выявлена разная аккумулялирующая способность у исследуемых видов водных растений: так, больше всего металлов обнаружено в листьях *Batrachium trichophyllum*, *Ceratophyllum demersum* и *Lemna gibba*, наименьшее содержание тяжелых металлов зафиксировано в листьях *Potamogeton alpinus* и *Saggitaria saggitifolia*.
5. Показано, что возрастание антропогенной нагрузки приводит к усилению перекисного окисления липидов у большинства изученных

растений и формированию ответных реакций, связанных с увеличением в листьях тиолсодержащих соединений и возрастанием количества водорастворимых антиоксидантов.

6. Обнаружено, что у исследованных наземных растений в большинстве случаев активность супероксиддисмутазы возрастает, в то время как активность пероксидазы уменьшается при увеличении стрессовых нагрузок.
7. Установлено, что водные растения, обладающие повышенной аккумулярующей способностью, отличаются более высоким антиоксидантным статусом, выраженным в повышенном количестве низкомолекулярных небелковых антиоксидантов (аскорбата, глутатиона, пролина и флавоноидов) и высокой активностью ферментов-антиоксидантов. Данный факт является подтверждением повышенной устойчивости видов-накопителей к стрессорам химической природы, что обуславливает высокую эффективность их использования для целей фиторемедиации.

Таким образом, в условиях хронического загрязнения окружающей среды у изученных видов наземных и у ряда водных растений в градиенте антропогенной нагрузки происходят существенные изменения на разных уровнях организации – молекулярном, клеточном, тканевом, организменном. Данные изменения можно рассматривать как защитно-приспособительные реакции, которые представляют собой общие неспецифические механизмы защиты растений. Результаты проведенных комплексных исследований позволяют оценить роль низко- и высокомолекулярных компонентов антиоксидантной защиты у растений, длительно адаптированных к антропогенному воздействию и определить характер взаимосвязи между этими компонентами и устойчивостью видов в целом.

1.2 Аннотированная справка по научным результатам НИР, полученным на III и IV этапах

Целью III и IV этапа исследований было изучение взаимосвязи между активностью антиоксидантных систем растений и их устойчивостью к тяжелым металлам в модельных системах. Для этого на III этапе исследований была выявлена роль *низкомолекулярных антиоксидантов (каротиноидов, глутатиона, пролина и др.) при окислительном стрессе под действием тяжелых металлов* у наземных и водных растений в контролируемых условиях. На IV этапе исследований была более подробно изучена *роль ферментов-антиоксидантов и SH-содержащих соединений*.

Были выбраны объекты, пригодные для планируемых исследований. Этот выбор включал ряд наземных и водных растений, собранных из типичных для данного вида условий (места с его максимальным обилием), однородные по внешнему виду. Водные растения предварительно длительно адаптировали к лабораторным условиям.

Были выбраны следующие объекты исследований:

наземные растения – подорожник большой (*Plantago major* L.), одуванчик лекарственный (*Taraxacum officinale* L.), клевер средний (*Trifolium medium* L.), и их семенное потомство, выращенное в условиях благоприятного экофона и подвергнутое кратковременным воздействиям неорганических поллютантов (тяжелых металлов);

водные растения (макрофиты) – элодея канадская (*Elodea canadensis* Michx.), элодея густолиственная (*Elodea densa* Planch.), роголистник погруженный (*Ceratophyllum demersum* L.).

Семенное потомство исследуемых наземных растений было выращено в лабораторных условиях из семян, собранных из пяти участков, отличающихся по уровню техногенной нагрузки. Дополнительно сбор растений осуществляли на биологической станции в Сысертском районе Свердловской области («условный контроль»). Полученные растения были

пересажены в условия выровненного агрофона на территории биологической станции Университета.

Были использованы следующие методы исследования:

Количество фотосинтетических пигментов (хлорофиллов, каротиноидов) определяли в 80% ацетоновом экстракте. Содержание хлорофиллов рассчитывали по Vernon, количество каротиноидов рассчитывали по Wettstein [1].

Содержание тяжелых металлов в листьях растений определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии после мокрого озоления 70% HNO_3 (осч) [2].

Содержание антоцианов определяли спектрофотометрически после экстракции в 1%-ном растворе соляной кислоты [13]. Общее содержание флавоноидов определяли с лимоннокислым борным реактивом при длине волны 420 нм [5].

Определение содержания свободного пролина проводили по методике Bates [3]. Содержание аскорбиновой кислоты определяли согласно Hewitt и Dickes [14]. Содержание перекиси водорода определяли согласно Bellincampi с соавт. [15].

Активность СОД определяли по Beauchamp и Fridovich [7]. Активность каталазы измеряли по методу Aebi [16]. Активность гваяколовой пероксидазы (ГП) оценивали по увеличению оптической плотности реакционной среды при 470 нм в результате окисления гваякола [8]. Активность глутатионредуктазы измеряли согласно Foyer и Holliwell [17].

Содержание сульфгидрильных групп в растворимой фракции и мембранно-связанных белках определяли с помощью 5,5'-дителиобис(2-нитробензойной) кислоты (ДТНБК) по методу Ellman [10]. Небелковые тиолы (глутатион) определяли по Nagalakshmi и Prasad [11], осаждая белки 50% трихлоруксусной кислотой. Содержание белка определяли по Бредфорду [18].

Электрофорез белков проводили по методике Laemmli [19] в 18% SDS-ПААГ. Окраску белков проводили азотнокислым серебром по Blum и др. [20].

Статистическую обработку проводили с помощью пакетов прикладных программ Excel 7.0 и Statistica 6.0. Для проверки достоверности полученных результатов использовали непараметрический критерий Манна-Уитни.

Анализ результатов исследования позволил сделать следующие выводы:

1. Обнаружено, что водные растения отличаются высокой аккумулятивной способностью в отношении Ni, Cu, Cd, Zn, Mn, при этом скорость накопления зависит как от концентрации металла в среде, так и времени экспозиции. Совместное присутствие металлов в среде приводит к снижению аккумуляции отдельных ионов, вероятно, вследствие их конкурентных взаимоотношений.
2. Показано, что метод гистохимического анализа с использованием дитизона удобен для биотестирования содержания металлов в окружающей среде и позволяет выявлять степень накопления и распределения металлов в тканях растений.
3. Выявлена прямая связь между накоплением тяжелых металлов и степенью окислительного повреждения в листьях наземных и водных растений.
4. Обнаружена быстрая активация синтеза низкомолекулярных антиоксидантов (каротиноидов, глутатиона) при действии тяжелых металлов (1-4 часа) и резкое уменьшение количества этих протекторных соединений при длительном воздействии (более 24 часов)
5. Выявлено, что у семенного потомства *Plantago major* L. и *Taraxacum officinale* s.l. из загрязненных биотопов хорошо выражена устойчивость к действию меди, о чем свидетельствует высокий уровень пролина.

6. Установлено, что добавление экзогенных антоцианов и аскорбата снижает накопление кадмия в листьях элодеи. При этом содержание внутриклеточных низкомолекулярных антиоксидантов изменяется незначительно.
7. Показано, что характер влияния экзогенного пролина при совместном действии с кадмием имеет неоднозначный характер: наблюдается ослабление токсического эффекта действия металла на фотосинтетические пигменты и негативное влияние на содержание внутриклеточных низкомолекулярных антиоксидантов.
8. Обнаружено, что у наземных растений из загрязненных биотопов и их семенного потомства активность ферментов-антиоксидантов (СОД, пероксидазы) в модельных условиях достоверно выше, чем у ранее не адаптированных видов из «условно чистых» местообитаний.
9. Выявлено, что на низких концентрациях Ni (до 0.5 мг/л) в листьях *Elodea canadensis* происходит активация антиоксидантных ферментов (СОД, КАТ, ГР), в то время как на повышенных – активный синтез SH-белков.
10. Показана последовательность развития защитных реакций на действие высоких концентраций Ni, Zn (3 мг/л) и Cu (1.5 мг/л) в листьях *E. canadensis*: быстрая активация антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионредуктазы) при кратковременном (4-8 часов) действии ТМ и последующее доминирование SH-белковой защитной системы (после 12-часовой экспозиции).
11. Обнаружено, что погруженные водные растения содержат больше SH-групп в растворимых и мембранно-связанных белках, чем плавающие. Наибольший рост SH-групп на белках вызывает медь, вероятно из-за высокой токсичности.
12. Получены данные о возможности синтеза в листьях разных видов водных растений добавочных низкомолекулярных металл-

связывающих SH-белков при действии повышенных концентраций Ni, Cu и Cd.

Таким образом, результаты модельных экспериментов доказывают, что наземные и водные растения проявляют качественно сходные ответные реакции клеточного уровня. Значительное увеличение продуктов ПОЛ в присутствии тяжелых металлов свидетельствует о накоплении в клетках повышенных количеств АФК ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , HO^{\cdot}), способных реагировать с липидами, белками, ДНК, повреждая структуру мембран и макромолекул. Пероксид водорода как вторичный мессенджер (Bhattacharjee, 2005) может индуцировать синтез ферментов-антиоксидантов, уровень которых определяет устойчивость клетки к действию тяжелых металлов.

Наши результаты указывают как на общие закономерности, так и специфику действия отдельных тяжелых металлов на растения: наиболее токсичен, судя по большинству показателей, металл с переменной валентностью – медь.

Выявлено, что совместное присутствие в среде большинства металлов в различных сочетаниях уменьшает негативное влияние отдельных ионов на физиологическое состояние *Elodea densa* за счет усиления активности супероксиддисмутазы и каталазы, а также значительного возрастания количества небелковых тиолов.

Показана повышенная активность антиоксидантных систем у наземных растений и их семенного потомства, длительно адаптированных в природных условиях к загрязнению тяжелыми металлами.

Таким образом, в ответ на «металлический стресс» в листьях высших растений включаются механизмы защиты клеточного уровня, обеспечивающие устойчивость в условиях повышенных концентраций тяжелых металлов. Как показывают данные литературы и результаты наших экспериментов, эти механизмы характерны для всех растений и являются частью гомеостатических процессов.

1.3 Аннотированная справка по научным результатам НИР, полученным на V этапе

Целью V этапа исследований было изучение взаимосвязи между активностью антиоксидантных систем растений и их устойчивостью к мочеvine и фенольным соединениям в модельных экспериментах.

Были выбраны объекты, пригодные для планируемых исследований. Этот выбор включал ряд водных растений, собранных из типичных для данного вида условий (места с его максимальным обилием), однородные по внешнему виду. Растения предварительно длительно адаптировали к лабораторным условиям.

Были выбраны следующие объекты исследований:

Elodea canadensis Rich. (элодея канадская), *Elodea densa* Planch. (элодея густолиственная), *Potamogeton perfoliatus* L. (рдест пронзеннолистный), *Potamogeton crispus* L. (рдест курчавый), *Potamogeton gramineus* L. (рдест злаковый), *Potamogeton alpinus* Balb. (рдест альпийский), *Lemna gibba* L. (ряска горбатая), *Ceratophyllum demersum* L. (роголистник темно-зеленый).

Были использованы следующие методы исследования:

Интенсивность ПОЛ определяли в бутанольном экстракте по изменению содержания продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой [6].

Содержание перекиси водорода определяли спектрофотометрически, согласно Bellincampi с соавт. [15]. Содержание супероксидного аниона определяли согласно Chaitanya с соавт. [21].

Количество фотосинтетических пигментов определяли спектрофотометрически в 80% ацетоновом экстракте. Содержание хлорофиллов рассчитывали по Vernon, количество каротиноидов рассчитывали по Wettstein [1].

Интенсивность потенциального фотосинтеза определяли радиоизотопным методом [22]. Экспозиция в $^{14}\text{CO}_2$ для всех определений

составляла 5 минут. Удельная радиоактивность в опытах была 1 ГБк/л. Для радиометрии использовали радиометр 20046 (“Veb Robotron-Messelektronik”, Германия).

Содержание флавоноидов и водорастворимых антиоксидантов определяли по Рогожину [5]. Содержание аскорбиновой кислоты определяли спектрофотометрически, согласно Hewitt, Dickes [14].

Активность уреазы измеряли колориметрически по количеству аммиачного азота, образовавшегося в результате взаимодействия фермента с мочевиной за единицу времени [23].

Активность глутатионредуктазы измеряли согласно Foyer и Holliwell [17].

Активность супероксиддисмутазы определяли согласно Beauchamp и Fridovich [7].

Активность каталазы измеряли методом Aebi [16].

Активность гваяколовой пероксидазы оценивали по увеличению оптической плотности реакционной среды при 470 нм в результате окисления гваякола [8].

Активность аскорбатпероксидазы измеряли с помощью метода Nakano, Asada [24].

Активность полифенолоксидазы определяли титриметрическим методом с использованием аскорбата и пирокатехина [9].

Содержание SH-групп в общей растворимой фракции и мембранно-связанных белках определяли с помощью 5,5'-дителиобис(2-нитробензойной) кислоты (ДТНБК) (“Fluka”, Германия) по методу Ellman [10]. Небелковые тиолы определяли по Nagalakshmi и Prasad [11].

Количество растворимого и мембранно-связанного белка определяли по Bredford [18].

Статистическую обработку проводили с помощью пакетов прикладных программ Excel 7.0 и Statistica 6.0. Для проверки достоверности полученных результатов использовали непараметрический критерий Манна-Уитни.

Анализ результатов исследования позволил сделать следующие выводы:

1. Обнаружено, что степень токсичности мочевины напрямую зависит от ее содержания в среде. Низкие концентрации мочевины (до 500 мг/л) стимулируют синтез фотосинтетических пигментов (как хлорофиллов, так и каротиноидов), интенсивность потенциального фотосинтеза и активность уреазы в листьях *Elodea densa*. Высокая концентрация мочевины (1000 мг/л) оказывает негативное влияние на фотосинтетический аппарат растений и угнетает активность уреазы.
2. Проведена оценка токсичности разных фенольных соединений по их влиянию на активность полифенолоксидазы в листьях элодеи. Выявлено, что наибольшее снижение активности фермента происходит под влиянием пирокатехина и резорцина (на 55% и 56% соответственно), наименьшее – при добавлении монофенола и гидрохинона (на 27% и 37% соответственно).
3. Не обнаружено четкой зависимости между концентрацией фенола и активностью полифенолоксидазы в листьях высших водных растений. Сопоставление активности фермента в листьях разных видов гидрофитов показало, что наибольшей активностью этого фермента отличался *P. crispus*.
4. Обнаружено, что мочевина, уже при низкой концентрации в среде (100 мг/л), вызывает окислительный стресс в листьях элодеи из-за образования повышенного количества АФК (супероксида и перекиси водорода) и активации перекисного окисления липидов. При этом наибольшую защиту обеспечивают небелковые антиоксиданты (аскорбат, каротиноиды) и некоторые ферменты-антиоксиданты (каталаза, аскорбатпероксидаза).
5. Показано, что высокие концентрации мочевины приводят к истощению пула низкомолекулярных антиоксидантов. При этом антиоксидантный статус растений поддерживается за счет высокой активности ряда

ферментов – супероксиддисмутазы, гваяколовых пероксидаз.

6. Выявлено, что большинство изученных фенольных соединений не влияют на содержание ТБК-реагирующих продуктов в листьях элодеи. Наблюдаемое снижение интенсивности ПОЛ на 30% по сравнению с контролем при действии пирокатехина свидетельствует лишь о разрушении ТБК-реагирующих продуктов под действием токсиканта, поскольку подавляется активность антиоксидантной системы.
7. Обнаружено значительное увеличение -SH в растворимых белках при действии возрастающих концентраций мочевины (на 30-60% от контроля). Это может быть неспецифической защитной реакцией на токсичное действие мочевины или структурной модификацией белков из-за разрывов S-S связей.

Таким образом, проведенные исследования показали, что такие органические поллютанты, как мочевина и фенольные соединения могут оказывать повреждающий эффект на растения как непосредственно, так и опосредованно, провоцируя образование активных форм кислорода и развитие окислительного стресса.

Возрастание активности антиоксидантных ферментов и увеличение содержания низкомолекулярных антиоксидантов при действии стрессоров химической природы непосредственно направлены на повышение резистентности растений в экстремальных условиях среды. Сопоставление про- и антиоксидантных процессов у разных видов гидрофитов свидетельствует о том, что растения с более высоким антиоксидантным статусом обладают и более высоким адаптивным потенциалом к различным неблагоприятным воздействиям, включая действие органических поллютантов. Следовательно, изучение антиоксидантного статуса является удобной моделью для оценки устойчивости растений к антропогенным воздействиям.

2 Аналитический отчет о проведении теоретических и экспериментальных исследований

2.1 Оценка антиоксидантного статуса растений из местообитаний с разной антропогенной нагрузкой

Проведенные на предыдущих этапах исследования показали, что адаптивные возможности растений определяются как их видовой спецификой, так и соответствующими условиями среды. Исследованные наземные и водные местообитания характеризуются многокомпонентным характером загрязнения. Высокий уровень загрязнения сформировался постепенно, в течение последних десятилетий. Повышенные концентрации поллютантов влияют на структуру и функционирование растительных популяций. Соответственно, ответные реакции растений являются сложными и неоднозначными, а характер их отклика на воздействие зависит от многих факторов.

Анализ результатов по оценке антиоксидантного статуса наземных и водных растений, собранных из местообитаний с разной антропогенной нагрузкой, показывает ряд общих ответных реакций на стресс. Эти изменения отражены на суммарных диаграммах (рис. 1-5).

Результаты экспериментов выявили тенденции в изменении компонентов антиоксидантных систем растений при воздействии разнообразных антропогенных факторов. В большинстве случаев возрастание антропогенной нагрузки приводит к усилению перекисного окисления липидов. Однако степень ПОЛ выражена неодинаково в зависимости от активации антиоксидантных систем клетки под воздействием стрессоров. В среднем количество продуктов ПОЛ у растений из импактной зоны (загрязненного водоема) возрастает в 1.5-2.0 раза по сравнению с фоновым (контрольным) участком.

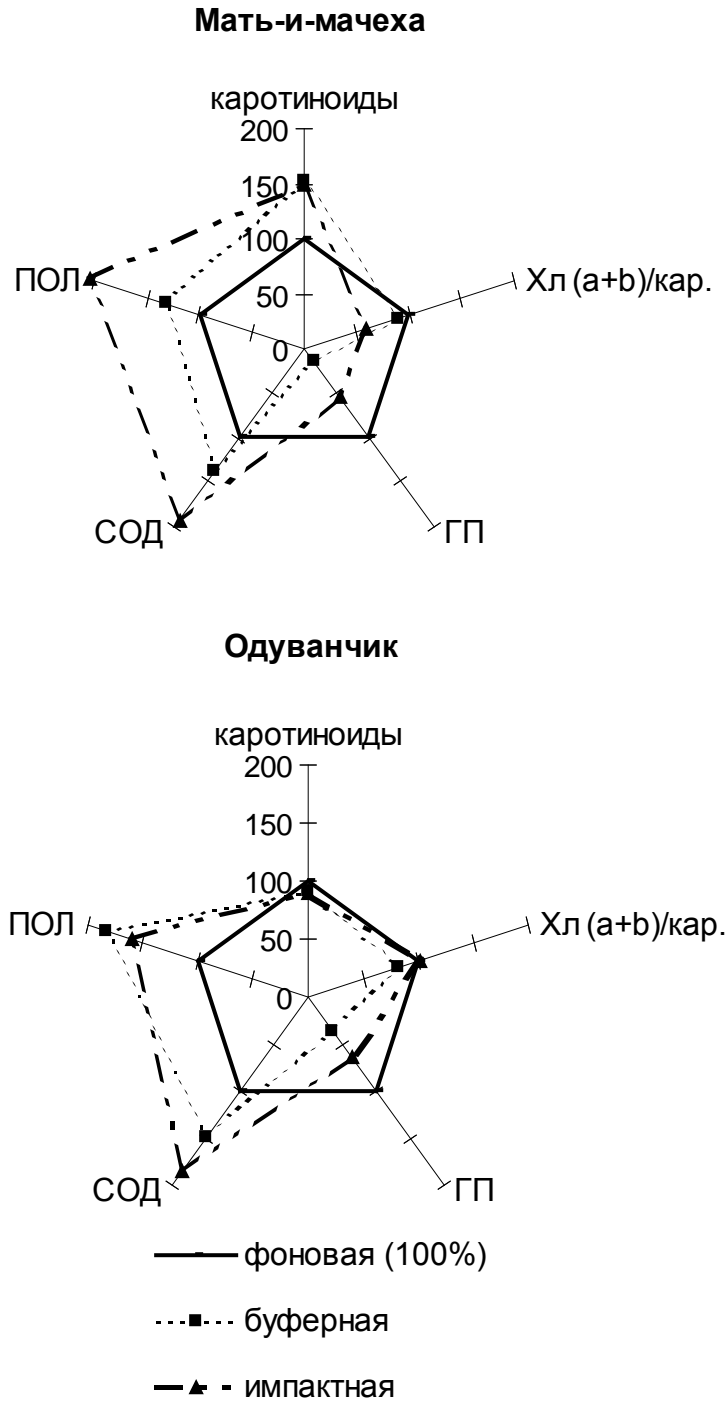


Рис. 1. Изменение про-/антиоксидантных параметров у *Tussilago farfara* и *Taraxacum officinale*, собранных из местообитаний с разной антропогенной нагрузкой. Данные выражены в процентах от фонового значения (фоновая зона –100%). СОД – супероксиддисмутаза, ГП – гваяколовая пероксидаза, ПОЛ – перекисное окисление липидов

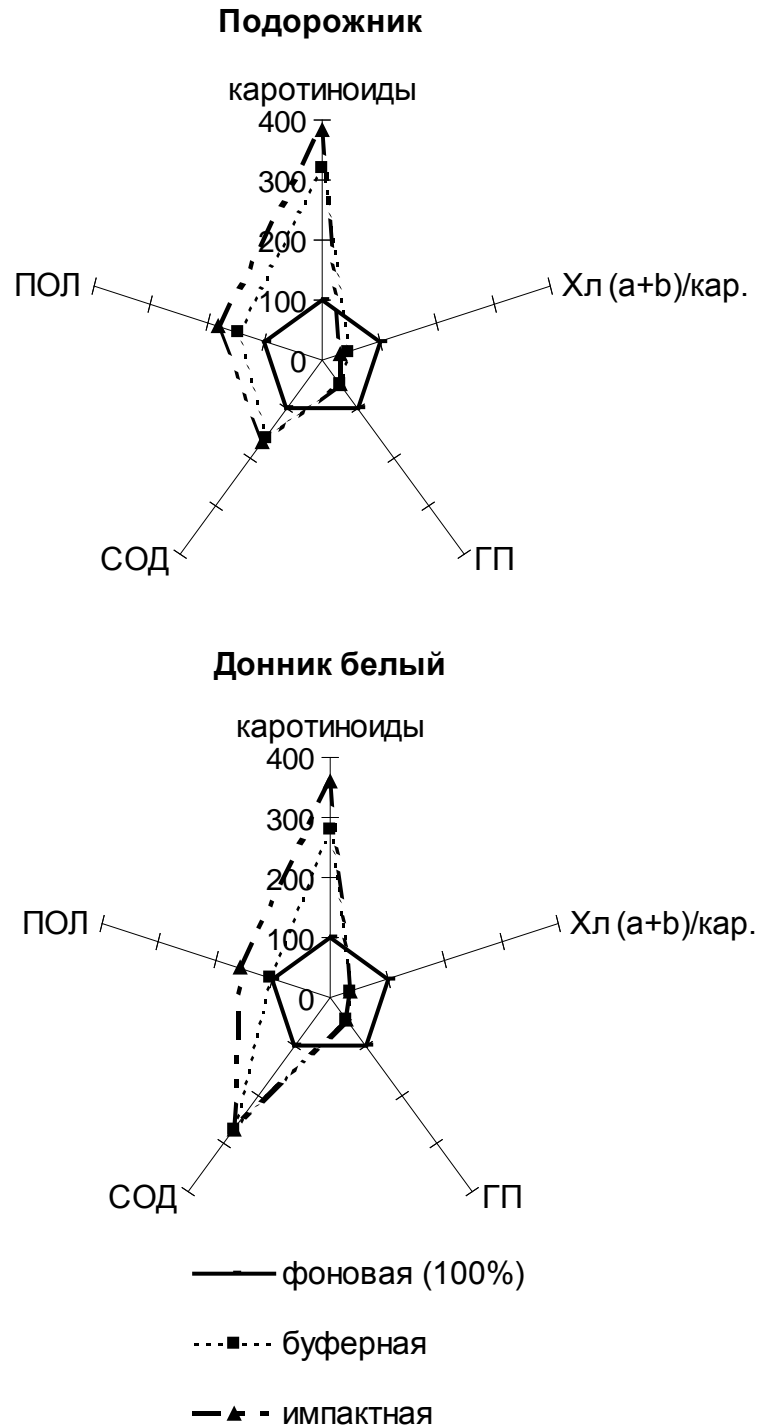


Рис. 2. Изменение про-/антиоксидантных параметров у *Plantago major* и *Melilotus albus*, собранных из местообитаний с разной антропогенной нагрузкой. Данные выражены в процентах от фонового значения (фоновая зона –100%). СОД – супероксиддисмутаза, ГП – гваяколовая пероксидаза, ПОЛ – перекисное окисление липидов

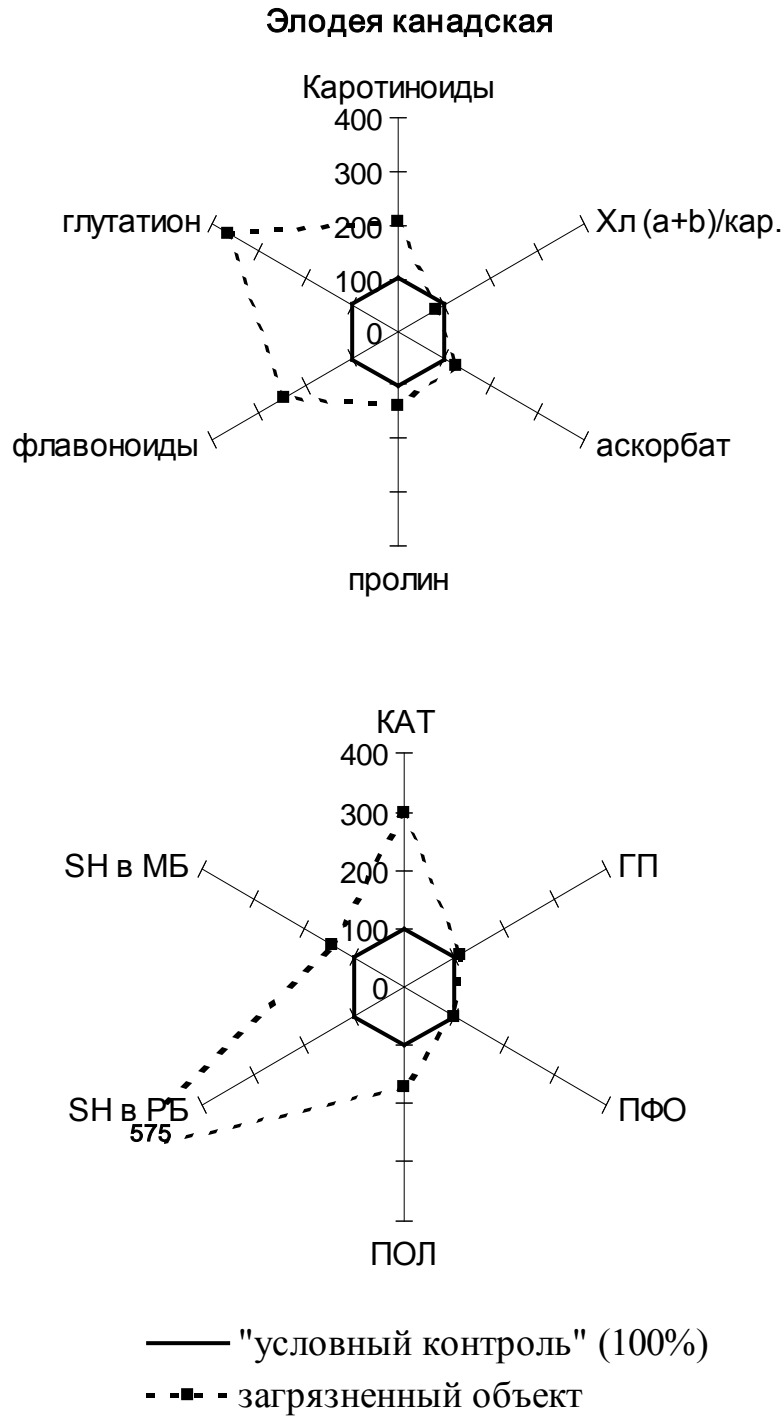


Рис. 3. Изменение про-/антиоксидантных параметров в листьях *Elodea canadensis*, собранной из водных объектов с разной антропогенной нагрузкой. Данные выражены в процентах от условного контроля («условный контроль» – 100%). КАТ – каталаза, ГП – гваяколовая пероксидаза, ПФО – полифенолоксидаза, ПОЛ – перекисное окисление липидов, РБ – растворимы белок, МБ – мембранносвязанный белок.

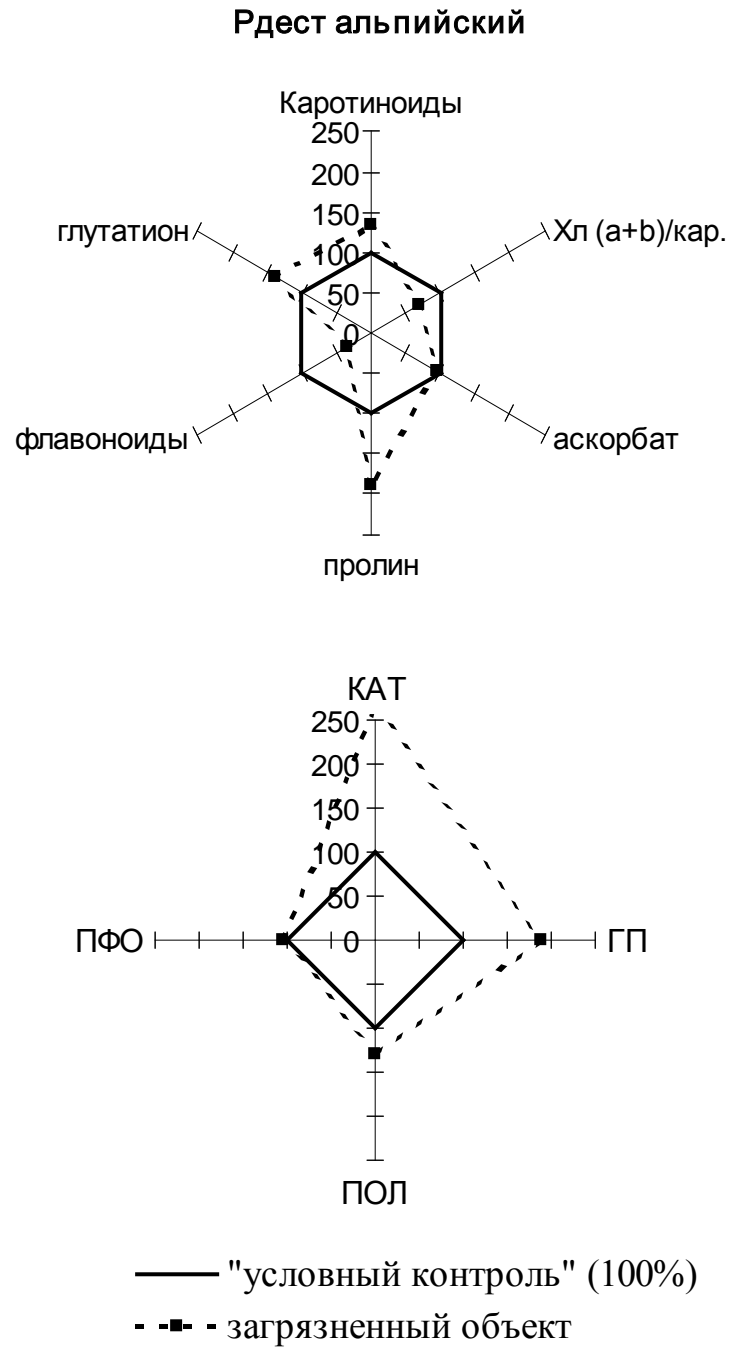


Рис. 4. Изменение про-/антиоксидантных параметров в листьях *Potamogeton alpinus*, собранного из водных объектов с разной антропогенной нагрузкой. Данные выражены в процентах от условного контроля («условный контроль» – 100%). КАТ – каталаза, ГП – гваяколовая пероксидаза, ПФО – полифенолоксидаза, ПОЛ – перекисное окисление липидов.

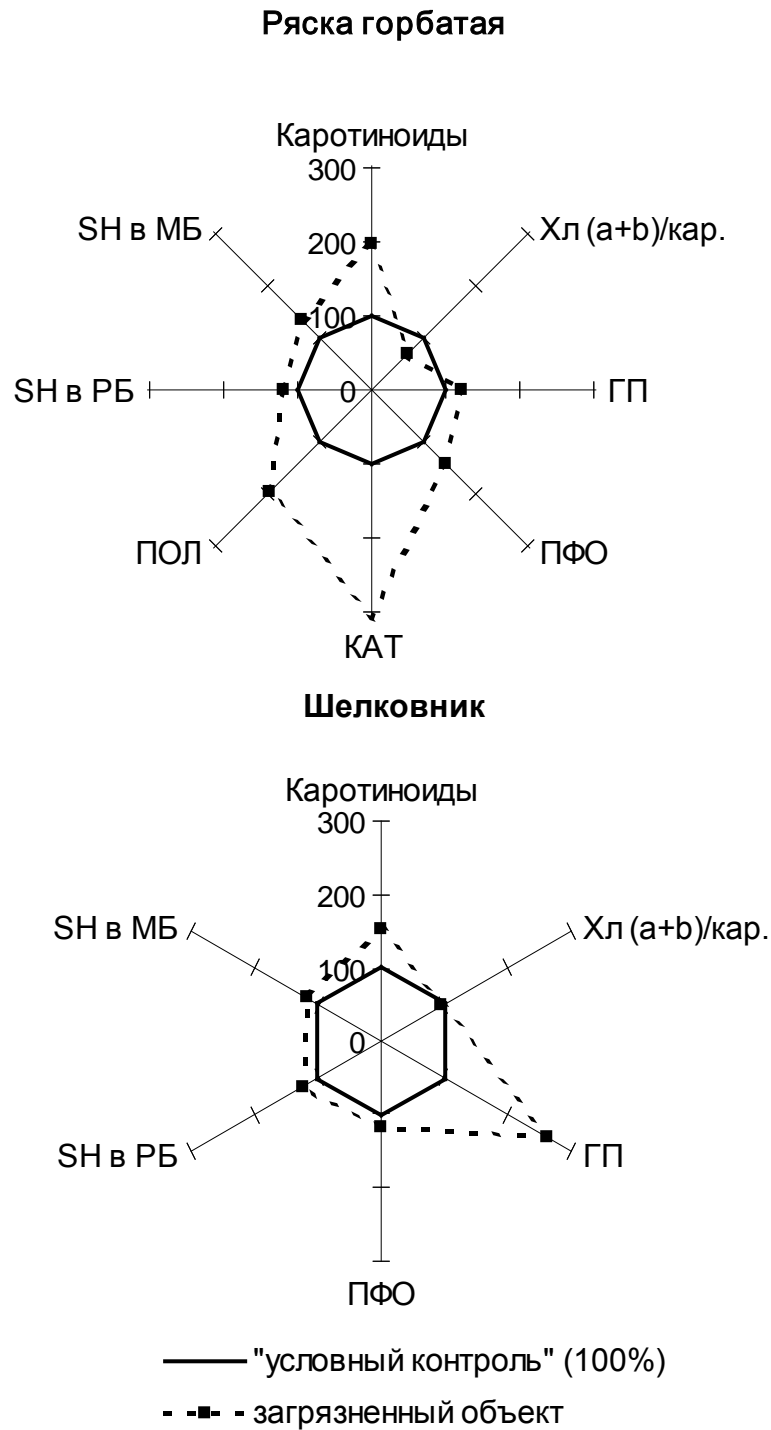


Рис. 5. Изменение про-/антиоксидантных параметров в листьях *Letna gibba* и *Batrachium trichophyllum*, собранных из водных объектов с разной антропогенной нагрузкой. Данные выражены в процентах от условного контроля («условный контроль» – 100%). ГП – гваяколовая пероксидаза, ПФО – полифенолоксидаза, ПОЛ – перекисное окисление липидов, РБ – растворимы белок, МБ – мембранносвязанный белок.

У многих исследованных растений, в зависимости от приближения к источнику загрязнения, наблюдается увеличение содержания каротиноидов. Особенно это выражено у наземных растений. Так, у *Plantago major* и *Melilotus albus*, собранных из импактной зоны, содержание каротиноидов возрастало почти в 4 раза, по сравнению с фоновыми значениями (рис. 2). У изученных нами водных растений из загрязненных водотоков содержание каротиноидов увеличивалось в среднем 1.6 раза по сравнению с «условно чистыми» (рис. 3, 4).

Более значительное (двукратное) повышение данного параметра отмечено в листьях *Elodea canadensis* и *Lemna gibba* (рис. 5). При этом практически во всех случаях отношение хлорофиллов к каротиноидам заметно уменьшалось, особенно в импактной (загрязненной) зоне. Вероятно, это связано с защитной, антиоксидантной функцией каротиноидов в сравнении с хлорофиллами. Вероятно, пигментная система этих растений приспособилась к условиям загрязнения среды за счет более высокой устойчивости каротиноидов.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в условиях возрастающих антропогенных нагрузок на наземные и водные объекты каротиноиды выполняют функцию дополнительных и защитных пигментов, таким образом, обеспечивается устойчивость фотосинтетического аппарата при стрессе.

Измерение содержания других небелковых антиоксидантов (аскорбата, глутатиона, пролина и флавоноидов) в листьях макрофитов из водных объектов, различающихся уровнем антропогенного воздействия, показало неоднозначный результат (рис. 3, 4). У элодеи, собранной из загрязненных водоемов, значительно возрастало содержание глутатиона и флавоноидов (рис. 3), в то время как у рдеста альпийского – содержание пролина (рис. 4).

Важную роль в защите растений от окислительного стресса играют специфические ферментативные антиоксиданты – супероксиддисмутаза, каталаза, различные пероксидазы [25-27]. Активность антиоксидантных

ферментов в зависимости от степени антропогенного воздействия изменялась неоднозначно у наземных и водных растений. Так, у исследованных наземных растений из импактной зоны в большинстве случаев возрастала активность супероксиддисмутазы, в то время как активность пероксидазы снижалась (рис. 1, 2). У водных растений, наоборот, активность пероксидазы значительно выше в зоне загрязнения, чем в контрольной. Кроме того, достоверно возрастала и активность каталазы.

Наши исследования показали (рис. 4, 5), что содержание SH-содержащих соединений в листьях изученных водных растений напрямую зависело от их местообитания. У растений, обитающих в водоемах с повышенным антропогенным загрязнением, наблюдалось достоверное возрастание SH-групп по сравнению с контролем. Известно, что сами по себе SH-соединения не определяют устойчивость растений к металлам. Однако они являются неотъемлемой частью программы ответа клетки на поступление тяжелых металлов и, вероятно, определяют антиоксидантный статус растений.

Таким образом, антиоксидантный статус растений из местообитаний с разной антропогенной нагрузкой поддерживается, в основном, за счет увеличения ряда небелковых и белковых антиоксидантов. Причем, ответ антиоксидантной системы на один и тот же тип воздействия зависит как от вида растения, так и, по-видимому, от характера стрессового фактора.

2.2 Сравнительный анализ устойчивости растений к неорганическим и органическим поллютантам

В модельных системах исследована взаимосвязь между активностью антиоксидантных систем растений и их устойчивостью к неорганическим (тяжелые металлы) и органическим (мочевина и фенольные соединения) поллютантам.

Выяснено, что и те, и другие поллютанты могут вызывать окислительные повреждения как напрямую, так и опосредованно, через подавление антиоксидантной системы. Причем тяжелые металлы более токсичны, чем мочевины и фенольные соединения, поскольку оказывают неблагоприятное воздействие на растения в гораздо меньших дозах.

Среди тяжелых металлов наиболее токсичными для большинства наземных и водных растений оказались медь и кадмий. Значительное увеличение продуктов ПОЛ может свидетельствовать о накоплении в клетках повышенных количеств АФК ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , HO^{\cdot}), способных реагировать с липидами, белками, ДНК, повреждая структуру мембран и макромолекул.

Динамика развития антиоксидантного ответа клетки на действие ряда металлов (Cu, Zn, Ni) показала общие характерные особенности: уже в первые часы экспозиции (1-4 часа) обнаружено возрастание низкомолекулярных антиоксидантов – каротиноидов и небелковых тиолов (глутатиона). Более длительная инкубация на среде с добавлением повышенных концентраций неорганических поллютантов приводила к истощению пула низкомолекулярных антиокислителей. Предполагается, что в этой ситуации основную роль в защите от окислительного стресса выполняют другие соединения, возможно, специфические ферменты-антиоксиданты и SH-содержащие соединения.

Выявлена роль низкомолекулярных антиоксидантов в формировании устойчивости высших растений к окислительному стрессу, вызванному действием тяжелых металлов. По-видимому, они могут дополнять или компенсировать действие друг друга, что обеспечивает более эффективную работу антиоксидантной системы. Обнаружено, что экзогенные низкомолекулярные антиоксиданты способны проникать в клетки водных растений и влиять на аккумуляцию тяжелых металлов (кадмия). Однако, их совместное присутствие с кадмием не вызывает существенных положительных изменений в состоянии растений – в клетках преобладают процессы окисления. Наблюдается истощение пула внутриклеточных

низкомолекулярных соединений, хоть и в меньшей степени, чем при действии отдельного металла. При этом накопление кадмия снижается. По-видимому, это связано с хелатирующей ролью этих соединений и конкурентными взаимоотношениями между ними и другими веществами.

Диаграммы, представленные на рис. 6, обобщают изменения всех про- и антиоксидантных параметров листьев элодеи под действием возрастающих концентраций никеля.

Анализ совокупности полученных данных свидетельствует о том, что пониженная концентрация никеля (0.05 мг/л) запускает ответные антиоксидантные реакции в клетках элодеи. Повышенная концентрация металла (0.5 мг/л) ускоряет окислительные процессы и подавляет активность КАТ. Одновременно с этим наблюдается активация компонентов антиоксидантной системы (СОД, ГР, каротиноидов, НРТ) и увеличение количества соединений, участвующих в связывании никеля (растворимых, мембранно-связанных SH-белков и небелковых тиолов).

Возрастание концентрации никеля до 3 мг/л приводит к дальнейшим нарушениям в работе основных систем в клетках элодеи, включая активность ферментов-антиоксидантов.

Диаграммы, представленные на рис. 7, обобщают изменения всех про- и антиоксидантных параметров листьев элодеи под действием возрастающих концентраций мочевины.

Так же, как и при действии неорганических поллютантов (никеля и др.), степень токсичности мочевины напрямую зависит от ее содержания в среде. Мочевина, уже при низкой концентрации в среде (100 мг/л), вызывает окислительный стресс в листьях элодеи из-за образования повышенного количества АФК (супероксида и перекиси водорода) и активации ПОЛ. При этом наибольшую защиту обеспечивают небелковые антиокислители (аскорбат, каротиноиды) и некоторые ферменты-антиоксиданты (каталаза, аскорбатпероксидаза). Высокие концентрации мочевины приводят к истощению пула низкомолекулярных антиоксидантов.

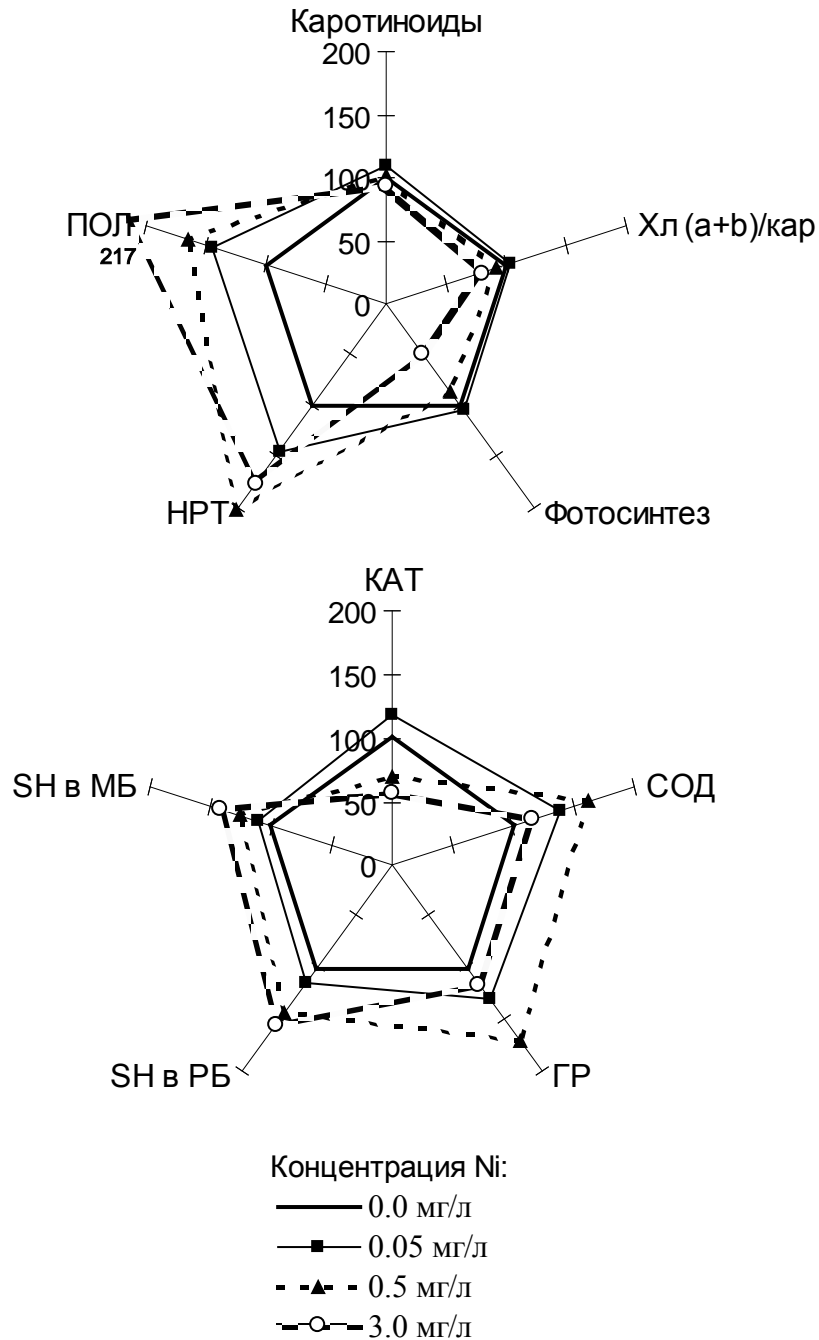


Рис. 6. Изменение про-/антиоксидантных параметров в элодеи, инкубированной на среде (5 суток) с возрастающими концентрациями никеля. Контролем служили растения, инкубированные без добавления металла (100%). НРТ – небелковые растворимые тиолы (глутатион), ПОЛ – перекисное окисление липидов, КАТ – каталаза, СОД – супероксиддисмутаза, ГР – глутатионредуктаза, РБ – растворимый белок, МБ – мембранносвязанный белок.

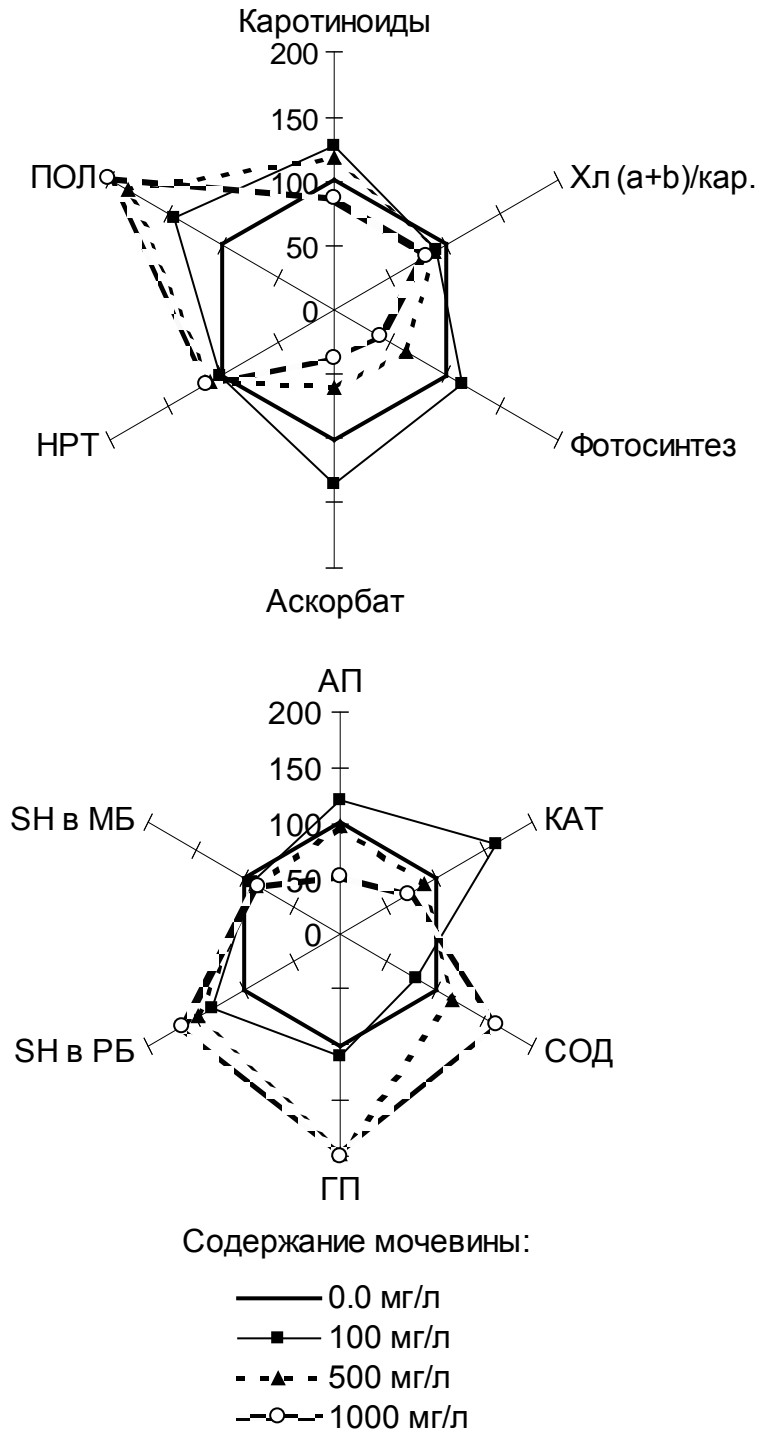


Рис. 7. Изменение про-/антиоксидантных параметров в листьях элодеи, инкубированной на среде (5 суток) с возрастающими концентрациями мочевины. Контролем служили растения, инкубированные без добавления мочевины (100%). НРТ – небелковые растворимые тиолы (глутатион), ПОЛ – перекисное окисление липидов, АП – аскорбатпероксидаза, КАТ – каталаза, СОД – супероксиддисмутаза, ГП – гваяколовая пероксидаза, РБ – растворимый белок, МБ – мембранносвязанный белок.

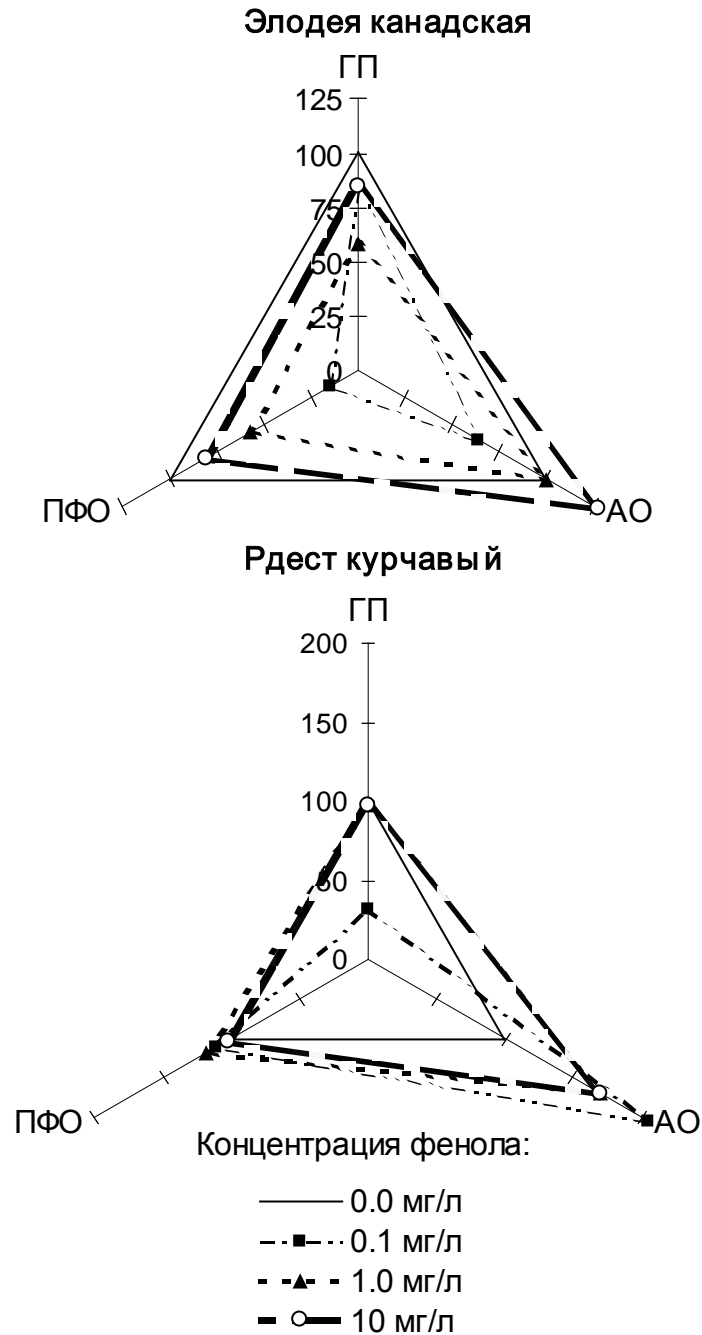


Рис. 8. Изменение антиоксидантных параметров в листьях *E. canadensis* и *P. crispus*, инкубированных на среде с возрастающими концентрациями монофенола. Контролем служили растения, инкубированные без добавления фенола (100%). ГП – гваяколовая пероксидаза, АО – общее содержание водорастворимых антиоксидантов, ПФО – полифенолоксидаза.

При этом антиоксидантный статус растений поддерживается за счет активации ряда ферментов – супероксиддисмутазы, гваяколовых пероксидаз.

Диаграммы, представленные на рис. 8, обобщают изменения ряда антиоксидантных параметров листьев элодеи и рдеста курчавого под действием возрастающих концентраций монофенола.

Токсичность фенольных соединений проявлялась неоднозначно. С одной стороны не было отмечено существенных изменений в содержании продуктов ПОЛ. Однако, возрастающие концентрации фенола приводили к значительному увеличению общего количества водорастворимых небелковых антиоксидантов, рис. 8. Особенно это было отмечено у *P. crispus*. При этом активность ферментов-антиоксидантов (пероксидазы и полифенолоксидазы) оставалась на уровне контроля или снижалась.

2.3 Роль низкомолекулярных и высокомолекулярных компонентов системы антиоксидантной защиты при формировании устойчивости растений к антропогенному стрессу

Имеющиеся в литературе данные, а также наши исследования свидетельствуют о том, что в результате действия стрессовых факторов разной природы, в том числе тяжелых металлов, мочевины и фенольных соединений, в тканях растений развивается окислительный стресс [25, 28-31]. Избыток АФК приводит к перекисному окислению липидов мембран клеток и органоидов, вызывая в остатках полиненасыщенных жирных кислот цепные реакции с образованием липидных радикалов, пероксидов, гидропероксидов и алкоксидов [32, 33].

Продукты ПОЛ, образовавшиеся в ответ на действие стрессового фактора, являются в свою очередь первичными медиаторами активации антиоксидантной системы. Это, прежде всего, антиоксидантные ферменты – супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза, а также жирорастворимые антиоксиданты – токоферол, убихинон, ретинол, каротиноиды;

водорастворимые – глутатион, аскорбиновая кислота, фенолы [31]. В настоящее время активно изучаются отдельные компоненты антиоксидантной системы, исследуется их роль в адаптации растений к различным стрессорам [25, 28, 34-36].

Механизм действия этих компонентов различен. Одни избавляют клетку от свободных радикалов, восстанавливая их до стабильных неактивных продуктов (играя роль «мусорщиков»), другие же имеют сродство к какому-то определенному свободнорадикальному продукту («ловушки» синглетного кислорода, гидроксил-радикала и т.д.) и, наконец, имеются антиоксиданты, обрывающие цепи. К числу последних относятся фенолы, легко отдающие свои электроны, превращая радикал, с которым они прореагировали, в молекулярный продукт, а сами при этом превращаются в слабый феноксил-радикал, не способный участвовать в цепной реакции.

Одним из ключевых компонентов системы защиты являются **ферменты:**

- супероксиддисмутаза (СОД, ЕС 1.15.1.1), катализирует реакцию восстановления супероксид радикала до пероксида водорода (реакция дисмутации супероксидных радикалов).
- каталаза (ЕС 1.11.16), катализирует реакцию разложения перекиси водорода с выделением молекулярного кислорода.
- пероксидазы (ЕС 1.11.17), способны восстанавливать пероксид водорода до воды, окисляя при этом различные соединения.

Низкомолекулярные небелковые соединения:

- ❖ аскорбиновая кислота (аскорбат, витамин С), которая восстанавливает свободные радикалы до стабильных продуктов, непосредственно может реагировать с супероксидом кислорода, перекисью водорода и радикалом токоферола;
- ❖ глутатион, один из главных небелковых тиоловых продуктов восстановления сульфатов в растительной клетке, представляющий собой пептид, состоящий из трех

аминокислотных остатков (γ -Глу, Цис, Гли). Его антиоксидантные свойства определяются как непосредственным взаимодействием с АФК, так и функционированием целого ряда ферментов;

- ❖ пролин, протеиногенная гетероциклическая аминокислота, индуцированный синтез которой наблюдается при действии многих неблагоприятных факторов среды, таких как водный дефицит, засоление, высокие и низкие температуры, атака патогенов и др. [36-39], а также при действии различных ксенобиотиков, в том числе и тяжелых металлов [40-43]. Выполнение пролином антиоксидантной функции связано с возможным участием данной аминокислоты в инактивации свободных радикалов путем образования с ними долгоживущих стабильных конъюгатов [44];
- ❖ каротиноиды, выполняют ряд важнейших функций в процессе фотосинтеза: антенную, фотопротекторную и защитную [45, 46]. Две последние функции непосредственно связаны с антиоксидантной защитой макромолекул клетки от окислительного стресса. Каротиноиды стабилизируют липидную фазу тилакоидных мембран, защищая пигменты и ненасыщенные жирные кислоты липидов от окислительного повреждения [47, 48];
- ❖ флавоноиды, играют важную роль в растительном метаболизме и очень широко распространены в высших растениях. Благодаря наличию гидроксильных групп, а также системе сопряженных двойных связей эти соединения способны выступать в качестве ловушек свободных радикалов [49, 50]. Известно, что флавоноиды, а также их метаболиты способны выступать не только в роли антиоксидантов, но и в роли сигнальных молекул в различных стрессовых условиях, таких например, как радиоактивное загрязнение [51, 52].

В природных местообитаниях, а также в условиях модельного эксперимента с различными концентрациями поллютантов на наземных и водных растениях нами была проведена оценка роли низкомолекулярных и высокомолекулярных компонентов системы антиоксидантной защиты при формировании устойчивости растений к антропогенному стрессу.

Результаты экспериментов показали, что в природных местообитаниях возрастание антропогенной нагрузки приводит к усилению ПОЛ у большинства изученных растений и формированию ответных антиоксидантных реакций. Так, например, у исследованных растений в большинстве случаев возрастает активность супероксиддисмутазы (наземные растения), каталазы (водные растения), в то время как активность гваяколовой пероксидазы или уменьшается при увеличении стрессовых нагрузок (наземные растения), или ее изменение неоднозначно у разных видов (водные растения). Установлено также, что загрязнение среды приводит к повышению содержания каротиноидов. Практически у всех исследованных растений наблюдается увеличение содержания каротиноидов из природных популяций импактных зон (загрязненных водоемов) по сравнению с фоновой (контрольной) зоной. Изменение данных показателей повышает адаптивные возможности растений и определяет их устойчивость к загрязнению среды обитания.

Для водных растений из природных экосистем обнаружена положительная корреляция между аккумулятивной способностью вида и содержанием в растениях низкомолекулярных антиоксидантов (рис. 9).

Результаты дискриминантного анализа двух групп водных макрофитов, противоположных по «аккумулятивной стратегии», показал, что видо-накопители, в противоположность видам-отражателям, характеризуются высоким содержанием в листьях низкомолекулярных антиоксидантов, что является подтверждением их повышенной устойчивости к стрессорам химической природы.

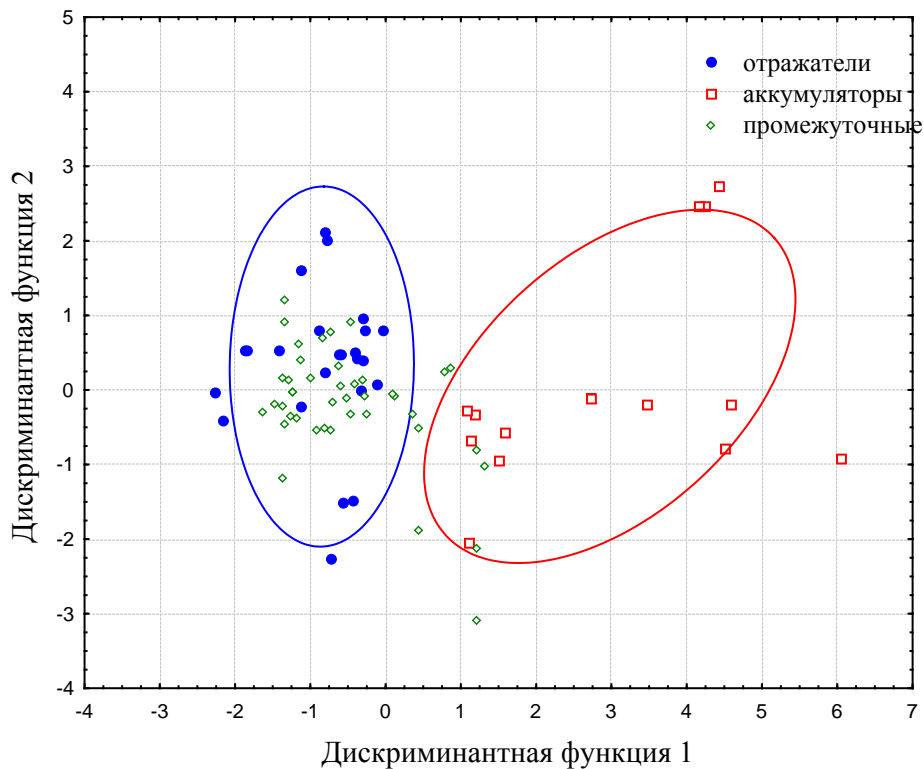


Рис. 9. Результаты дискриминантного анализа водных макрофитов с разной аккумулятивной способностью (тяжелые металлы) по основным показателям антиоксидантной системы.

Результаты модельных экспериментов по исследованию роли различных компонентов антиоксидантной системы показывают, что наземные и водные растения проявляют качественно сходные ответные реакции клеточного уровня. Так, например, установлено, что наземные растения и их семенное потомство (*Plantago major* L., *Taraxacum officinale* s.l.), длительно адаптированные в природных условиях к загрязнению тяжелыми металлами, характеризуются повышенной активностью антиоксидантных систем: при стрессе, вызванном медью, в листьях растений увеличивается содержание низкомолекулярного антиоксиданта пролина, а также повышается активность фермента СОД.

В условиях модельного эксперимента на водных макрофитах установлена быстрая активация синтеза низкомолекулярных антиоксидантов

(каротиноидов, глутатиона) при действии тяжелых металлов (1-4 часа) и резкое уменьшение количества этих протекторных соединений при длительном воздействии (более 24 часов). Показано, что при действии экзогенных низкомолекулярных антиоксидантов (аскорбат, глутатион, пролин) наблюдается ослабление токсического эффекта действия металлов, при этом содержание внутриклеточных низкомолекулярных антиоксидантов изменяется незначительно.

В целом отмечено, что низкие дозы металлов в большинстве случаев приводят к увеличению активности ферментов-антиоксидантов (СОД, КАТ, ГР), в то время как высокие концентрации усиливают синтез защитных металлсвязывающих SH-белков. Эти результаты подтверждают имеющиеся в литературе данные об активации компонентов антиоксидантной защиты в ответ на действие металлического стресса, наблюдаемые как в природных условиях, так и в условиях модельного эксперимента, а также способности экзогенных низкомолекулярных антиоксидантов снижать токсический эффект металлов [34, 53-57].

3 Отчет по обобщению и оценке результатов исследований

Растения – это уникальные организмы, которые не только способны осуществлять фотосинтез, но и могут подвергаться окислительной деградации попавшие в клетку ксенобиотики самой различной химической структуры [58]. Изучение этой роли растений является в высшей степени актуальным на современном этапе, а его практическое значение трудно переоценить.

Существующие химические, механические, физические и другие технологии по очистке и восстановлению окружающей среды эффективны лишь в конкретных случаях, имеющих локальное значение [59]. Реальную возможность глобального вмешательства в создающуюся неблагоприятную ситуацию, очевидно, несут в себе только растения. Способность растений усваивать и превращать токсиканты в обычные клеточные метаболиты и таким образом обезвреживать их, т.е. осуществлять детоксикационные процессы без всяких энергетических или материальных затрат и деструкции почвы, является большим преимуществом всех форм фиторемедиационных технологий [60].

Загрязнение окружающей среды химическими токсикантами имеет тенденцию к повышению. Проблема загрязнения различных компонентов окружающей среды органическими и неорганическими поллютантами и оценки участия антиоксидантной системы растений в их адаптации к этим поллютантам представляет не только научный, но и практический интерес, поскольку открывает широкие перспективы для биомониторинга и очистки загрязненных компонентов окружающей среды путем фиторемедиации.

Вопросы устойчивости растений и их адаптации к неблагоприятным воздействиям приобретают все большую актуальность. Они отражены в многочисленных публикациях [61-67]. В последнее время все более популярной становится гипотеза, согласно которой адаптация растений к действию стрессоров различной природы в значительной степени зависит от функционирования антиоксидантной системы, причем как от активности

ферментов-антиоксидантов, так и от накопления в клетке низкомолекулярных антиоксидантов (пролина, глутатиона, токоферола, сахаров, аскорбиновой кислоты, фенолов).

Исследования, направленные на выявление роли антиоксидантов в формировании устойчивости растений к стрессовым факторам, проводятся многими учеными как в России, так и за рубежом [68-77]. Существует точка зрения, что низкомолекулярные органические антиоксиданты в ряде случаев более эффективно защищают метаболизм от АФК, чем антиоксидантные ферменты [35].

Однако характер взаимодействия между этими двумя основными группами компонентов клеточной системы антиоксидантной защиты остается практически не изученным. Недостаточно изучено функционирование компонентов антиоксидантной системы у стрессированных растений в динамике и в градиенте нагрузки. Слабо исследовано на современном этапе соотношение вклада в защиту от АФК различных компонентов антиоксидантной системы. Не совсем понятно, какие показатели про- и антиоксидантных реакций растений являются наиболее информативными. Остаются нерешенными и другие вопросы, связанные с формированием устойчивости растений к неблагоприятным воздействиям. В связи с этим не теряют своей актуальности исследования, направленные на расширение и углубление представлений о функционировании антиоксидантной системы растений и изменении активности ее компонентов в условиях стресса. Особенно важным является совершенствование научно-методологических подходов к изучению антиоксидантного статуса растений и оценке возможности его использования для комплексной диагностики их устойчивости к антропогенному воздействию.

3.1 Методология и алгоритмы, позволяющие увеличить объем знаний для более глубокого понимания предмета исследований

На основе теоретических и экспериментальных исследований, проведенных в рамках выполнения данного проекта, сформулированы основные научно-методологические подходы к комплексной оценке антиоксидантного статуса растений при загрязнении среды обитания органическими и неорганическими поллютантами.

Выбор конкретного научно-методологического подхода осуществляется с учетом поставленной задачи:

- Для изучения действия поллютантов на показатели антиоксидантного статуса растений из природных местообитаний целесообразно определение физиолого-биохимических характеристик, отражающих про- и антиоксидантные реакции растений нескольких видов, взятых из *импактной зоны*, и сопоставление их с характеристиками растений этих же видов из *фоновой зоны (контроль)*.
- Для сопоставления антиоксидантного статуса у разных видов наземных и водных растений целесообразно определение физиолого-биохимических характеристик растений из одного и того же природного местообитания.
- Для изучения действия повышенных концентраций поллютантов на антиоксидантный статус наземных и водных растений необходимо проведение экспериментов в модельных условиях, основанных на инкубировании растений в среде в присутствии поллютантов. Причем, достаточно информативным является сопоставление результатов кратковременных и долговременных экспериментов, особенно если они предполагают определение показателей про- и антиоксидантных процессов в динамике.
- Для более детального и научно-обоснованного анализа изменения антиоксидантного статуса растений под действием поллютантов различной

природы рекомендуется оценивать ответные реакции растений при инкубировании их в среде с поллютантами в градиенте концентрации.

Комплексная оценка антиоксидантного статуса растений выполняется на основе изучения процессов развития про- и антиоксидантных реакций.

Для выявления действия поллютантов на состояние антиоксидантной системы наземных и водных растений рекомендуется проведение следующих исследований:

- определение активных форм кислорода как индикаторов окислительного стресса;
- определение перекисного окисления липидов как индикатора повреждения мембран;
- определение содержания низкомолекулярных антиоксидантов;
- определение активности ферментов-антиоксидантов;
- определение содержания SH-соединений (при изучении действия металлов).

Результаты проведенных исследований могут быть неоднозначными, поэтому при их анализе и интерпретации необходим комплексный подход с обязательной взаимоувязкой полученных данных по разным показателям про- и антиоксидантных процессов.

Так, например, если при определении содержания активных форм кислорода обнаружено, что их количество под действием исследуемого стрессора увеличилось, можно делать вывод о низкой эффективности работы антиоксидантной системы. Если их количество не изменилось, можно делать вывод либо о высокой эффективности антиоксидантов, либо о том, что данный фактор не индуцирует окислительный стресс, а значит, не вызывает накопления свободных радикалов и других активных форм кислорода. Для того, чтобы ответить на этот вопрос однозначно, необходимо проанализировать изменение активности антиоксидантных ферментов у стрессированных ферментов. К примеру, при возрастании количества

супероксид-радикала этот факт следует увязать с изменением активности супероксиддисмутазы.

Проведенные исследования показали, что результаты определения перекисного окисления липидов как индикатора повреждения мембран тоже могут быть неоднозначными. В большинстве случаев возрастание нагрузки приводило к усилению перекисного окисления липидов у растений. Однако у разных видов растений степень ПОЛ выражена неодинаково. Показано, что у растений, в клетках которых быстро активизируются СОД и другие ферменты-антиоксиданты, перекисная окисления мембранных липидов выражена слабее. Следовательно, эти растения являются более устойчивыми к действию стрессового фактора. Однако в некоторых экспериментах под действием стрессора интенсивность ПОЛ могла не только не изменяться, но и уменьшаться, что является следствием разрушения малонового альдегида и других ТБК-реагирующих продуктов.

Интерпретировать результаты оценки активности антиоксидантных ферментов во многих случаях также достаточно сложно. К примеру, показано, что у наземных растений при увеличении нагрузки в большинстве случаев активность СОД возрастала, в то время как активность пероксидазы уменьшалась. У некоторых видов растений из местообитаний с высокой техногенной нагрузкой (например, *Lemna gibba*) низкая активность ферментов-антиоксидантов компенсировалась высоким содержанием низкомолекулярных антиоксидантов и высоким уровнем SH-белков и небелковых тиолов.

Установлено, что у видов с максимальной накопительной способностью наблюдалось наибольшее содержание в листьях низкомолекулярных антиоксидантов, что является подтверждением их повышенной устойчивости к стрессорам химической природы. Однако накопление неферментативных антиоксидантов в условиях стресса в значительной степени зависит от длительности воздействия: в проведенных экспериментах обнаружена быстрая активация синтеза низкомолекулярных

антиоксидантов при кратковременном действии ТМ и резкое уменьшение количества этих соединений при длительном воздействии.

Таким образом, изучение антиоксидантного статуса является удобной моделью для оценки устойчивости растений к антропогенным воздействиям. В зависимости от антиоксидантного потенциала конкретного растения проявляется адаптивная способность этого организма к стрессовому воздействию. Растения с более высоким антиоксидантным статусом обладают и более высоким адаптивным потенциалом к различным неблагоприятным воздействиям, включая действие поллютантов.

3.2 Рекомендации по возможности использования результатов поисковой научно-исследовательской работы

Результаты выполнения проекта по теме «Антиоксидантный статус как модель для исследования устойчивости растений к антропогенному воздействию» обобщены и использованы при подготовке учебно-методических пособий, монографий и статей. Всего по итогам выполнения НИР членами исследовательского коллектива опубликовано 2 учебно-методических пособия для студентов биологического факультета, 5 статей в высокорейтинговых российских и зарубежных журналах, 5 статей в реферируемых журналах, 1 монография и 48 тезисов. Результаты исследований широко апробированы на международных и всероссийских конференциях. Материалы этих публикаций могут быть востребованы специалистами академических и отраслевых научно-исследовательских организаций, а также сотрудниками высших учебных заведений, осуществляющих свою деятельность в рамках данной проблемы в качестве научного фундамента для планирования дальнейших исследований.

На основе проведенных теоретических и экспериментальных исследований разработаны рекомендации по использованию теоретических и экспериментальных данных о состоянии антиоксидантного статуса растений

для комплексной диагностики их устойчивости к антропогенному воздействию.

Результаты исследования антиоксидантного статуса наземных и водных растений из природных местообитаний с разной антропогенной нагрузкой, а также в моделируемых условиях при воздействии органических и органических поллютантов могут быть использованы для биологического мониторинга техногенно нарушенных водных и наземных экосистем.

Под биологическим мониторингом понимают систему наблюдений, оценки и прогноза любых изменений в биотических компонентах, вызванных факторами антропогенного происхождения и проявляемых на организменном, популяционном или экосистемном уровнях. Таким образом, трактовка понятия «биомониторинг» весьма широка: от наблюдения за живыми организмами, до контроля за состоянием каких-либо факторов среды при помощи живых организмов.

На основе проведенных исследований выявлены наиболее чувствительные и информативные показатели, которые могут быть использованы для оценки техногенного загрязнения компонентов окружающей среды и токсичности проб воды. К таким показателям можно отнести:

- ❖ характеристики пигментного аппарата:
 - в модельных условиях при действии низких доз поллютантов содержание фотосинтетических пигментов может повышаться, а при увеличении концентрации поллютанта – снижается;
 - в природных условиях отмечено увеличение содержания каротиноидов.
- ❖ активность одного из ферментов антиоксидантной системы – каталазы
 - у растений из природных местообитаний с повышенной антропогенной нагрузкой активность фермента повышена;
- ❖ содержание SH-содержащих соединений:

- отмечено увеличение содержания SH-содержащих соединений в листьях растений в ответ на действие ТМ (как в природных местообитаниях с повышенной техногенной нагрузкой, так и в модельных исследованиях).

Полученные в ходе выполнения НИР материалы могут быть применены и для фиторемедиации техногенно нарушенных экосистем.

Фиторемедиация – комплекс методов очистки вод, почвогрунтов и атмосферного воздуха с использованием зеленых растений. Фиторемедиация основана на способности водных растений к накоплению, утилизации и трансформации разнообразных химических веществ. К ее преимуществам относятся: возможность проведения ремедиации *in situ*; безопасность для окружающей среды; относительно низкая себестоимость проводимых работ по сравнению с традиционными очистными сооружениями; возможность экстракции ценных веществ из зеленой массы растений [78].

Проведенные исследования позволили выделить виды водных растений с высокой аккумулярующей способностью по отношению к тяжелым металлам и высоким антиоксидантным статусом, а следовательно, наиболее перспективные для фиторемедиации сточных и поверхностных вод с многокомпонентным загрязнением: *Batrachium trichophyllum*, *Ceratophyllum demersum*, *Elodea canadensis* и *Lemna gibba*.

Для очистки сточных вод с повышенным содержанием Cu рекомендуется использовать *Batrachium trichophyllum*, *Ceratophyllum demersum*, *Lemna gibba*, *Potamogeton crispus*;

Ni – *Ceratophyllum demersum*, *Potamogeton crispus*;

Zn – *Batrachium trichophyllum*, *Elodea canadensis*, *Potamogeton crispus*;

Mn – *Batrachium trichophyllum*, *Ceratophyllum demersum*, *Elodea canadensis*, *Potamogeton perfoliatus*;

Fe – *Batrachium trichophyllum*, *Lemna gibba*.

Результаты исследований, проведенных в рамках проекта, могут использоваться в образовательном процессе при обучении студентов и

аспирантов биологического факультета Уральского федерального университета и других высших учебных заведений.

Основные направления внедрения результатов исследований в образовательный процесс:

1. Разработка и использование учебно-методических пособий.

В рамках выполнения проекта были разработаны следующие пособия:

- ✓ *«Физиологические основы устойчивости растений к неблагоприятным условиям» (2011 г.).*

Целью учебно-методического пособия является обеспечение эффективности и результативности самостоятельной работы студентов, обучающихся по направлениям: «Биология» (020400) и «Экология и природопользование» (020800) по освоению общепрофессиональных и специальных дисциплин, изучающих физиологические основы устойчивости растений к различным неблагоприятным факторам. Пособие содержит методические указания по изучению основных разделов, включающие развернутые комментарии по основным темам дисциплины, контрольные вопросы и тестовые материалы.

Учебно-методическое пособие может быть использовано студентами в качестве вспомогательного пособия как при самостоятельном освоении общих и специальных курсов, нацеленных на освоение физиологических основ устойчивости растений к неблагоприятным факторам, так и при закреплении теоретического материала и самоконтроле знаний.

- ✓ *«Методы оценки антиоксидантного статуса растений»(2012 г.).*

В учебно-методическом пособии отражены общие представления об окислительном стрессе у растений и антиоксидантных системах, представлены методики определения индикаторов окислительного стресса, низкомолекулярных антиоксидантов, тиолов, активности ферментов антиоксидантной защиты и содержания белков.

Данное учебно-методическое предназначено для студентов-биологов разных уровней подготовки. Оно может использоваться бакалаврами (направление 020400 «Биология») и специалистами (специальность 020401 «Биология») при проведении специального практикума по физиологии и биохимии растений; студентами-магистрантами при выполнении блока лабораторно-практических занятий в рамках специальных курсов («Физиология стресса», «Энзимология» и др.) в соответствии с магистерской программой «Физиология и биохимия растений», а также аспирантами при проведении экспериментальных исследований.

2. Модернизация общих и специальных курсов для студентов биологического факультета разных уровней подготовки (бакалавров, специалистов, магистров).

- Для студентов бакалавриата (направление 020400 «Биология»; профиль «Физиология растений») и специалитета (специальность 020401 «Биология»).

Материалы теоретических и экспериментальных исследований по антиоксидантному статусу растений могут быть использованы при изучении общего курса «Физиология растений» и специального курса «Устойчивость растений».

Материалы исследований по действию мочевины на антиоксидантный статус растений могут использоваться при изучении специального курса «Водно-солевой режим растений».

- Для студентов бакалавриата (направление 020800 «Экология»).

Новая информация по ответным реакциям растений на действие органических и неорганических поллютантов, полученная при выполнении теоретических и экспериментальных исследований, может использоваться при изучении общего курса «Организм и среда».

- Для студентов магистратуры (направление 020400 «Биология»; магистерская программа «Физиология и биохимия растений»).

Материалы теоретических и экспериментальных исследований по ответным реакциям растений на стрессоры химической природы, по выявлению роли ферментативных и неферментативных антиоксидантов в повышении устойчивости растений могут быть использованы при изучении специального курса «Физиология стресса».

Полученные в процессе выполнения проекта новые знания о роли антиоксидантных ферментов в адаптации организмов к стрессовым воздействиям могут использоваться при изучении специального курса «Энзимология».

Результаты исследования значимости флавоноидов (в том числе антоцианов) в формировании устойчивости растений к действию поллютантов, вызывающих окислительный стресс, и другим неблагоприятным факторам, могут применяться при изучении специального курса «Биохимия вторичного обмена».

3. Модернизация рабочей программы специального практикума для студентов бакалавриата, обучающихся по направлению 020 400 «Биология»; профиль «Физиология растений».

При выполнении проекта в многочисленных опытах были апробированы и адаптированы с учетом возможностей лабораторной базы методики определения индикаторов окислительного стресса (супероксид-радикала и пероксида водорода), индикаторов повреждения мембран, активности ферментов антиоксидантной защиты и неферментативных антиоксидантов, основанные на использовании спектрофотометрических методов. В результате этих исследований были выбраны наиболее эффективные варианты методик, которые являются наиболее доступными и вместе с тем информативными и могут быть успешно использованы при изучении антиоксидантного статуса и устойчивости растений к антропогенному воздействию.

4. Совершенствование основной профессиональной образовательной программы послевузовского профессионального образования (аспирантура: шифр специальности: 03.01.05 Физиология и биохимия растений).

Апробированные методики определения индикаторов окислительного стресса, низкомолекулярных антиоксидантов, тиолов, активности ферментов антиоксидантной защиты могут использоваться при изучении дисциплины «Физико-химические методы исследования растений», а также выполнении экспериментальных исследований по теме кандидатской диссертации.

Новые знания по механизмам функционирования антиоксидантных систем, полученные в результате экспериментальных и теоретических исследований в ходе выполнения проекта, могут быть использованы при изучении дисциплины «Современные проблемы физиологии и биохимии растений» (в разделе: Физиология растений и проблемы глобальной экологии) и дисциплины «Экологическая физиология растений» (в разделе: Устойчивость растений).

5. Использование полученных научных материалов при подготовке выпускных работ (включая дипломные работы, выпускные квалификационные работы бакалавров, магистерские диссертации), а также написании кандидатских диссертаций. По результатам работы соисполнитель ГК № П1301, Чукина Н.В., в 2010 г. защитила диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук. В 2012 г. соисполнителем Фазлиевой Э.Р. подготовлена к защите еще одна кандидатская диссертация на тему: «Морфо-физиологические и биохимические адаптации популяций дикорастущих видов растений к техногенному загрязнению в условиях Среднего Урала».

Таким образом, материалы исследований обобщены, опубликованы и широко апробированы на симпозиумах и научно-практических конференциях разных уровней. Они могут быть востребованы в разных сферах научной и практической деятельности, а также в учебно-образовательном процессе.

4 Публикации результатов ПНИР

4.1 Заключение экспертной комиссии по открытому опубликованию

4.2 Копии статей

Заключение

Растения, как и другие организмы, постоянно подвергаются действию различных факторов окружающей среды. В естественных условиях на растительные организмы действует, как правило, совокупность неблагоприятных факторов. Ответные реакции растений на действие различных стрессоров включают как специфические, так и неспецифические защитно-приспособительные механизмы. Неспецифические реакции возникают сразу же после воздействия стрессора за короткий промежуток времени, в отличие от специфических адаптивных реакций. Соотношение этих реакций различно и зависит от многих факторов, главным образом, от длительности стрессового воздействия.

Вопросы, связанные с изучением механизмов устойчивости у растений, являются весьма актуальными. Во-первых, развитие представлений об ответных реакциях растений на действие неблагоприятных факторов представляет научный интерес и позволяет лучше понять закономерности функционирования не только растений, но и других живых организмов. Во-вторых, эта область физиологии растений имеет прикладное значение, поскольку выявление механизмов устойчивости и адаптации растений к неблагоприятным экологическим условиям открывает широкие перспективы для развития селекции, биотехнологий и фиторемедиации.

При действии различных стрессоров, которые, как правило, вызывают образование в клетках растений повышенного количества АФК, у растений развивается окислительный стресс. Образование АФК происходит во всех частях растительной клетки. Это связано как с неферментативными, так и с ферментативными процессами.

Окислительный стресс в растениях возникает в результате действия практически всех неблагоприятных факторов внешней среды, включая засуху, почвенное засоление, низкие и высокие температуры, ультрафиолетовое излучение, загрязнение радиоактивными веществами,

различными ксенобиотиками и т. д. Известно, что окислительный стресс имеет место и в клетках других живых организмов, в том числе человека. Познание закономерностей проявления окислительного стресса и механизмов работы антиоксидантной системы у растений может пролить свет и на аналогичные процессы в организме человека.

Повреждающему эффекту свободных радикалов и активных форм кислорода противостоит система антиоксидантной защиты, функционирование которой является проявлением неспецифической устойчивости растений, поэтому особую актуальность имеют вопросы, связанные с изучением антиоксидантного статуса растений и возможности его использования для комплексной диагностики устойчивости растений к различным видам антропогенного воздействия.

Анализ результатов исследования позволил сделать следующие выводы:

- 1) возрастание антропогенной нагрузки на водные и наземные экосистемы приводит к усилению перекисного окисления липидов у большинства изученных растений и формированию ответных реакций, связанных с увеличением в листьях тиолсодержащих соединений и возрастанием количества каротиноидов;
- 2) выявлено, что водные растения, обладающие повышенной аккумулярующей способностью, отличаются повышенным количеством низкомолекулярных антиоксидантов и более высокой активностью ферментов-антиоксидантов, что свидетельствует об их высоком адаптивном потенциале по отношению к тяжелым металлам;
- 3) обнаружена повышенная активность антиоксидантных систем у наземных растений и их семенного потомства, длительно адаптированных в природных условиях к загрязнению тяжелыми металлами;

- 4) показано, что совместное присутствие металлов в среде приводит к снижению аккумуляции отдельных ионов в листьях растений, вероятно, вследствие их конкурентных взаимоотношений;
- 5) выявлено, что для биотестирования содержания металлов в окружающей среде весьма удобным является метод гистохимического анализа с использованием дитизона, который позволяет выявлять степень накопления и распределения металлов в тканях растений;
- 6) органические поллютанты (такие как мочевина и фенольные соединения) могут оказывать повреждающий эффект на растения как непосредственно, так и опосредованно, провоцируя образование активных форм кислорода и развитие окислительного стресса;
- 7) обнаружено, что низкие концентрации мочевины (до 500 мг/л) стимулируют синтез фотосинтетических пигментов, интенсивность потенциального фотосинтеза и активность уреазы в листьях *Elodea densa*. Высокая концентрация мочевины (1000 мг/л) оказывает негативное влияние на фотосинтетический аппарат растений и активность уреазы.

Научная новизна проведенных исследований заключается в следующем:

1. при кратковременном действии тяжелых металлов (1-4 часа) обнаружена быстрая активация синтеза низкомолекулярных антиоксидантов (каротиноидов, глутатиона) и резкое уменьшение их количества при длительном воздействии (более 24 часов);
2. при кратковременном (4-8 часов) действии тяжелых металлов наблюдается быстрая активация антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионредуктазы), а в дальнейшем (после 12-часовой экспозиции) происходит активация защитных систем, связанных с синтезом SH-содержащих соединений;

3. у наземных растений из загрязненных биотопов и их семенного потомства активность ферментов-антиоксидантов (СОД, пероксидазы) в модельных условиях достоверно выше, чем у ранее неадаптированных видов из «условно чистых» местообитаний;
4. у семенного потомства *Plantago major* L. и *Taraxacum officinale* s.l. из загрязненных биотопов хорошо выражена устойчивость к действию меди, о чем свидетельствует высокий уровень пролина;
5. добавление экзогенных антоцианов и аскорбата снижает накопление кадмия в листьях элодеи; при этом содержание этих внутриклеточных антиоксидантов изменяется незначительно;
6. на низких концентрациях Ni (до 0.5 мг/л) в листьях *Elodea canadensis* происходит активация антиоксидантных ферментов (СОД, КАТ, ГР), в то время как на повышенных – активный синтез SH-белков;
7. погруженные водные растения содержат больше SH-групп в растворимых и мембранно-связанных белках, чем плавающие; наибольшее увеличение количества SH-групп на белках вызывает медь, вероятно из-за высокой токсичности.

Таким образом, в условиях хронического загрязнения окружающей среды у изученных видов наземных и у ряда водных растений в градиенте антропогенной нагрузки происходят существенные изменения на разных уровнях организации – молекулярном, клеточном, тканевом, организменном. Результаты модельных экспериментов доказывают, что наземные и водные растения проявляют качественно сходные ответные реакции клеточного уровня. Данные изменения можно рассматривать как защитно-приспособительные реакции, которые представляют собой общие неспецифические механизмы защиты растений.

Возрастание активности антиоксидантных ферментов и увеличение содержания низкомолекулярных антиоксидантов при действии стрессоров

химической природы непосредственно направлены на повышение резистентности растений в экстремальных условиях среды. Сопоставление про- и антиоксидантных процессов у разных видов растений свидетельствует о том, что растения с более высоким антиоксидантным статусом обладают и более высоким адаптивным потенциалом к различным неблагоприятным воздействиям, включая действие органических поллютантов. Следовательно, изучение антиоксидантного статуса является удобной моделью для оценки устойчивости растений к антропогенным воздействиям.

Широкий спектр объектов, комплексный подход к оценке устойчивости растений на стрессовые факторы различной природы, сочетание полевого и лабораторного эксперимента, работа с растениями в условиях длительного и кратковременного загрязнения, с исходными формами и их семенным потомством, позволили оценить роль компонентов антиоксидантной защиты растений и определить характер взаимосвязи между этими компонентами и устойчивостью видов в целом.

Все задачи, поставленные для достижения основной цели проекта, выполнены. Все аспекты, которые обсуждаются в отчете, актуальны, обладают научной новизной и имеют практическую значимость, так как могут быть использованы при определении стратегических направлений научных исследований, при планировании и осуществлении мероприятий по контролю за состоянием природной среды и восстановлению ее качества, а также в учебном процессе. Эти знания в перспективе будут способствовать развитию биотехнологии и инновационного сельского хозяйства, оптимизации биомониторинга и фиторемедиации, сохранению биоразнообразия растений и поддержанию устойчивости экосистем.

Уровень разработок соответствует современному уровню научно-технического развития, так как все исследования проведены на единой методологической основе с использованием современных физиолого-биохимических методов, а также методов математической статистики.

Список использованных источников

1. Гавриленко В. Ф., Ладыгина М. Е., Хандобина Л. М. Большой практикум по физиологии растений. М.: Высшая школа, 1975. 392 с.
2. Ермаченко Л. А., Ермаченко, В. М. Атомно-абсорбционный анализ с графитовой печатью / Под ред. Л. Г. Подуновой. М.: ПАИМС, 1999. 219 с.
3. Bates Z. S. Rapid determination of free proline for water-stress studies // *Plant and Soil*. 1973. V. 39. P. 205–207.
4. Чупахина Г. Н. Физиологические и биохимические методы анализа растений: практикум. Калининград: Изд-во Калинингр. ун-та, 2000. 59 с.
5. Рогожин В. В. Практикум по биологической химии: уч.-метод. пос. / СПб.: Изд-во «Лань», 2006. 256 с.
6. Uchiyama M., Mihara M. Determination of Malonaldehyde Precursor in Tissues by Thiobarbituric Acid Test // *Anal. Biochem*. 1978. V. 86. P. 287–297.
7. Beauchamp C., Fridovich I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // *Anal. Biochem*. 1971. V. 44. P. 276–287.
8. Chance B., Maehly A.C. Assay catalase and peroxidase. *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York, 1955. P. 764–775.
9. Починок Х. Н. Методы биохимического анализа растений. Киев: Наукова думка, 1975. 335 с.
10. Ellman G. L. Tissue sulfhydryl groups // *Arch. Biochem. Biophys*. 1959. V. 82. P. 70–77.
11. Nagalakshmi N., Prasad M.N.V. Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus* // *Plant Scienc*. 2001. V.160. P. 291–299.
12. Shacterle T. R., Pollack R. L. A simplified method for the quantities assay of small amounts of protein in biological material // *Anal. Biochem*. 1973. V. 51. № 2. P. 654–655.
13. Муравьева Д. А., Бубенчикова В. Н., Беликов В. В. Спектрофотометрическое определение суммы антоцианов в цветках

- василька синева // Фармакология. 1987. Т. 36. С. 28–29.
14. Hewitt E. J., Dickes G. J. Spectrophotometric measurements on ascorbic acid and their use for the estimation of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in plant tissues // *Biochem. J.* 1961. V. 78. P. 384–391.
 15. Bellincampi D., Dipierro N., Salvi G., Cervone F. and De Lorenzo G. Extracellular H₂O₂ Induced by Oligogalacturonides Is Not Involved in the Inhibition of the Auxin-Regulated rolB Gene Expression in Tobacco Leaf Explants // *Plant Physiology*. 2000. V. 122. P. 1379–386.
 16. Aebi H. Catalases // *Methods of Enzymatic Analysis*. 1971. V. 3. P. 273–286.
 17. Foyer C.H., Holliwell B. The Presence of Glutathione and Glutathion Reductase in Chloroplasts: A Proposed Role in Ascorbic Acid Metabolism // *Planta*. 1976. V.13. P. 21–25.
 18. Bredford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analytical Biochemistry*. 1976. № 72. P. 248–254.
 19. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680–685.
 20. Blum H., Beier H., Gross H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels // *Electroph.* 1987. V. 8. P. 93–99.
 21. Chaitanya K. S. K., Naithani S. C. Role of superoxide lipid peroxidation and superoxide dismutation in membrane perturbation during loss of viability in seeds of *Shorea robusta* Faern, F. *New Phytol.* 1994. V. 126. P. 623–627.
 22. Мокроносов А. Т., Добров А. В. Камера для изучения фотосинтетического метаболизма. Определение потенциального фотосинтеза на изолированных листьях // *Вопросы регуляции фотосинтеза*. Под ред. А.Т. Мокроносова и др. Свердловск: Изд-во УрГУ, 1973. С.149–152.
 23. Минеев В. Г., Сычев В. Г., Амелянчик О. А. и др. Практикум по агрохимии 2-е изд.: Учебное пособие. М.: Изд-во МГУ, 2001. С. 340–341.
 24. Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific

- peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 1981. V. 22. P. 867–880.
25. Schutzendubel A., Polle A. Plant responses to abiotic stress: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization // *J. Exper. Bot.* 2002. V. 53. № 372. P. 1351–1365.
26. Андреева В. А. Фермент пероксидаза: участие в защитном механизме растений. М.: Наука, 1988. 128 с.
27. Полеская О. Г. Растительная клетка и активные формы кислорода. Москва, 2007. 139 с.
28. Лукаткин А. С. Вклад окислительного стресса в развитие холодового повреждения в листьях теплолюбивых растений. 2. Активность антиоксидантных ферментов в динамике охлаждения // *Физиол. раст.* 2002 б. Т. 49. № 6. С. 878–885.
29. Maleva M. G., Nekrasova G. F., Malec P., M.N.V. Prasad, Strzałka K. Ecophysiological tolerance of *Elodea canadensis* to nickel exposure // *Chemosphere.* 2009. V. 77. P. 392–398.
30. Чукина Н. В., Борисова Г. Г. Структурно-функциональные показатели высших водных растений из местообитаний с разным уровнем антропогенного воздействия // *Биология внутренних вод.* 2010. № 1. С. 49–56.
31. Малева М. Г., Некрасова Г. Ф., Борисова Г. Г., Чукина Н. В., Ушакова О. С. Влияние тяжелых металлов на фотосинтетический аппарат и антиоксидантный статус элодеи // *Физиология растений.* 2012. Т. 59. № 2. С. 216–224.
32. Барабой В. А. Механизмы стресса и перекисное окисление липидов // *Успехи современной биологии.* 1991. Т. 11. Вып. 6. С. 923–931.
33. Духовский П., Юкнис Р., Бразайтите И., Жукаускайте Л. Реакция растений на комплексное воздействие природных и антропогенных стрессоров // *Физиол. раст.* 2003. Т. 50. № 2. С. 165–173.
34. Курганова Л. Н., Веселов А. П., Гончарова Т. А., Сеницына Ю. В. Перекисное окисление и антиоксидантная система защиты в хлоропластах

- гороха при тепловом шоке // Физиол. раст. 1997. Т. 44. № 5. С. 725–730.
35. Радюкина Н. Л., Шашукова А. В., Шевякова Н. И., Кузнецов Вл.В. Участие пролина в системе антиоксидантной защиты у шалфея при действии NaCl и параквата // Физиология растений. 2008. Т. 55. № 5. С. 721–730.
36. Шевякова Н. И. Метаболизм и физиологическая роль пролина в растениях при водном и солевом стрессе // Физиол. растений. 1983. Т. 30. С. 768–782.
37. Бритиков Е. А. Биологическая роль пролина. М., 1975. 124 с.
38. Кузнецов В. В., Шевякова Н. И. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция // Физиол. раст. 1999. Т. 46. № 2. С. 321–336.
39. Chu TM, Jusaitis M., Aspinall D., Paleg L. G. Accumulation of free proline at low temperatures // *Physiol. Plant.* 1978. V. 43. P. 254–260.
40. Alia P., Saradhi P. P. Proline accumulation under heavy metal stress // *J. Plant Physiol.* 1991. V. 138. P. 554–558.
41. Bassi R., Sharma S. S. Changes in proline content accompanying the uptake of zinc and copper by *Lemna minor* // *Ann. Bot.* 1993. V. 72. P. 151–154.
42. Schat T. H, Sharma S. S., Vooijs R. Heavy metal-induced accumulation of free proline in a metal-tolerant and nontolerant ecotype of *Silene vulgaris* // *Phys. Plant.* 1997. V. 101. P. 477–482.
43. Mehta S. K., Gaur J. P. Heavy-metal-induced proline accumulation and its role in ameliorating metal toxicity in *Chlorella vulgaris* // *New Phytol.* 1999. V. 143. P. 253–259.
44. Matysik J., Alia B., Mohanty P. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants // *Curr. Sci.* 2002. V. 82. P. 525–532.
45. Озолина И. А., Мочалкин А. И. О защитной роли каротиноидных пигментов в растении // Изв. АН СССР. Сер. биологич. 1975. С. 387–392.
46. Lichtenthaler H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes // *Methods Enzymol.* 1987. V. 148. P. 350–382.

47. Burton. G. W., Ingold K. U. β -carotene: an unusual type of lipid antioxidant // Science. 1984. V. 224. P. 569–573.
48. Young A. J. The photoprotective role of carotenoids in higher plants // Physiol. Plant. 1991. V. 83. P. 702–708.
49. Husain S. R., Cillard J., Cillard J. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids // Phytochem. 1987. V. 26. P. 2489–2491.
50. Mira L., Fernandez M. T, Santos M., Rocha R., Florencio M. H, Jennings K.R. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity // Free Radic. Res. 2002. V. 36. № 11. P.1199–1208.
51. Никитина В. С., Шендель Г. В., Оразов О. Э. Растительные фенольные соединения–индикаторы промышленного загрязнения среды // Актуальные проблемы экологии: Матер. I Междунар. конф, Гродно, 2004. Ч. 1. Гродно: ГрГУ, 2005. С. 124–127.
52. Williams R. J, Spencer J. P, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? // Free Radic. Biol. Med. 2004. V. 36. № 7. P. 838–849.
53. Gupta A. S., Webb R. P., Holaday A. S., Allen R. D. Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. Induction of ascorbate peroxidase in superoxide dismutase-overexpressing plants // Plant Physiol. 1993. V. 103. P. 1067–1073.
54. Lee D. H., Kim Y. S., Lee C. B. The inductive e responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.) // J. Plant Physiol. 2001. V. 158. P. 737–745.
55. Kumar S. P., Khan H. M. Changes in growth and superoxide dismutase activity in *Hydrilla verticillata* L. under abiotic stress // Braz. J. Plant Physiol. 2004. V. 16. № 2. P.115–118.
56. Демидчик В. В., Соколик А. И., Юрин В. М. Токсичность избытка меди и толерантность к нему растений // Успехи современной биологии. 2001. Т. 121. №5. С. 511–525.
57. Балахнина Т. И., Кособрюхов А. А., Иванов А. А., Креславский В. Д. Влияние кадмия на CO_2 -газообмен, переменную флюоресценцию

- хлорофилла и уровень антиоксидантных систем в листьях гороха // Физиол. раст. 2005. № 1. С. 21–26.
58. Квеситадзе Г. И., Хатисашвили Г. А., Садунишвили Т. А. Метаболизм антропогенных токсикантов в высших растениях. М.: Наука, 2005. 198 с.
59. Орлов Д. С., Садовникова Л. К., Лозановская И. Н. Экология и охрана биосферы при химическом загрязнении: Учеб. пособие. М.: Высшая школа, 2002. 334 с.
60. Кортэ Ф., Бахадир М., Клайн В., Лай Я.П., Парлар Г., Шойнерт И. Экологическая химия. М.: Мир, 1996. 395 с.
61. Чиркова Т. В. Физиологические основы устойчивости растений. СПб: Изд-во СПб ун-та, 2002. 244 с.
62. Усманов И. Ю., Рахманкулова З. Ф., Кулагин А. Ю. Экологическая физиология растений. М.: Логос, 2001. 224 с.
63. Титов А. Ф., Акимова Т. В., Таланова В. В., Топчиева Л. В. Устойчивость растений в начальный период действия неблагоприятных температур. М.: Наука, 2006. 143 с.
64. Генкель П. А. Физиология жаро- и засухоустойчивости растений. М., 1988. 280 с.
65. Гродзинский Д. М. Надежность растительных систем. Киев: Наук. думка, 1983. 368 с.
66. Bolwell G. P. Role of active oxygen species and NO in plant defence responses // *Cur. Opin. Plant Biol.* 1999. V. 2. № 4. P. 287–294.
67. Inzu D., van Montague M. Oxidative stress in plants // *Curr. Opin. Biotechnol.* 1995. № 6. P. 153–158.
68. Кулинский В. И. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза вред и защита // *Соросовский образовательный журнал.* 1999. № 1. С. 2–7.
69. Мерзляк М. Н. Активированный кислород и жизнедеятельность растений // *Соросовский образовательный журнал.* 1999. № 9. С. 20–26.
70. Романова Е. В. Ферменты в антиокислительной системе растений.

1. Супероксиддисмутаза // АГРО XX I. 2008. № 7-9. С. 27–30.
71. Бараненко В. В. Супероксиддисмутаза в клетках растений // Цитология. 2006. Т. 48. № 6. С. 465–474.
72. Кения М. В., Лукаш А. И., Гуськов Е. П. Роль низкомолекулярных антиоксидантов при окислительном стрессе // Успехи современной биологии. 1993. Т. 113. № 4. С. 456–470.
73. Половникова М. Г., Воскресенская О. Л. Активность компонентов антиоксидантной защиты и полифенолоксидазы у газонных растений в онтогенезе в условиях городской среды // Физиология растений. 2008. Т. 55. № 5. С. 777-785.
74. Siess H., Stahl W. Antioxidant Functions of Vitamins – Vitamin E and Vitamin C, β -Carotene, and other Carotenoids and Intercellular Communication via Gap Junctions // Int. J. Vitam. Nutr. Res. 1997. V. 67. P. 364–367.
75. Hall J. L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance // J. Exper. Bot. 2002. V. 53. № 366. P. 1–11.
76. Hare P. D., Cress W. A. Metabolic implications of stress-induced proline accumulations in plants // Plant Growth Regulations. 1997. № 21. P. 79–102.
77. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // Trends in Plant Sci. 2002. V. 7. № 3. P. 405–410.
78. Прасад М. Н. Практическое использование растений для восстановления экосистем, загрязненных металлами // Физиология растений. 2003. Т. 50. № 5. С. 764–780.