

V*10, моль/мг*мин

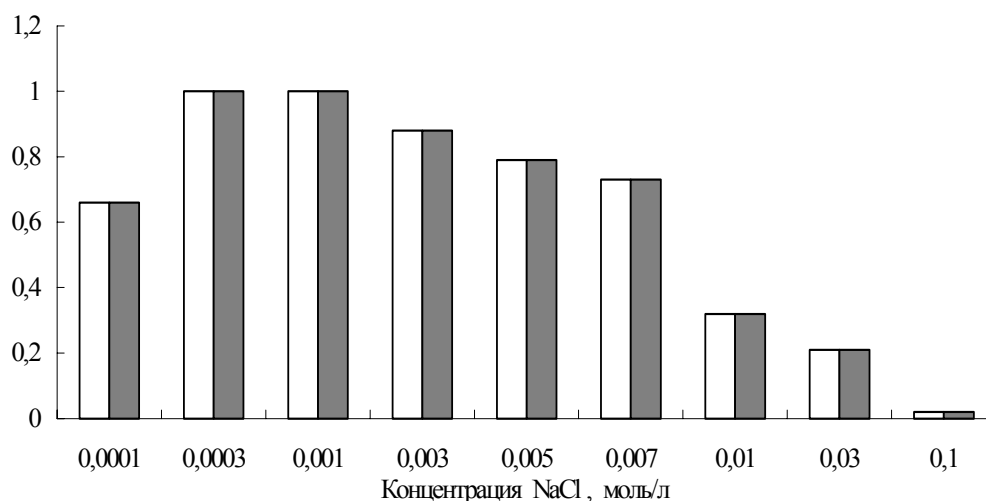


Рис.3. Зависимость потока нитрат ионов в корнях проростков ячменя от содержания хлорида натрия в среде

Вероятно, NaCl напрямую воздействует на активность системы транспорта NO_3^- плазмалеммы растительной клетки вплоть до полной ее инактивации. Однако в проведенных нами исследованиях определялись лишь нетто-поток NO_3^- , а не однонаправленные потоки указанного иона. Полученные результаты поэтому можно интерпретировать и как изменение выходящего потока NO_3^- .

Выражаю благодарность за помощь в проведении экспериментов и написании статьи доценту кафедры физиологии и биохимии растений А. П. Кудряшову.

Литература

1. Полевой В. В. Физиология растений. 1989. М.: Высш. шк. С. 216–271.
2. Чесноков В. А., Базырина Е. Т., Бушцева Т. М., Ильинский И. И. Выращивание растений без почвы. Л.: Ленинградский ун-т, 1967. 160 с.
3. Ullrich W.R. Transport of nitrate and ammonium through plant membranes // In Nitrogen metabolism of plants. Oxford: Clarendon Press, 1992. P. 121–138.

ГЕНОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА ФЛАВОЛИГНАНОВ ИЗ СЕМЯН РАСТОРОПШИ ПЯТНИСТОЙ

Е. М. Червяковский

С давних времен в традиционной медицине для лечения заболеваний печени используется препарат плодов расторопши пятнистой – силимарин. Силимарин обладает антиоксидантными свойствами, сти-

мулирует биосинтез белка и ускоряет регенерацию поврежденных гепатоцитов [1]. Терапевтический эффект препаратов расторопши связывают с наличием в них флаволигнанов, соединений флавоноидной природы, содержащих один остаток кониферилового спирта. Основными флаволигнанами в силимарине являются силибинин, силидианин и силикристин. Уместно предположить, что, обладая антиоксидантными свойствами, данные соединения будут препятствовать свободнорадикальной модификации молекул ДНК. С целью проверки этого предположения было проведено изучение защитной способности флаволигнанов в модельной системе повреждения ДНК промежуточными продуктами окисления бензидина.

Методы исследования

Выделение суммы флаволигнанов из плодов расторопши пятнистой вели методом спиртовой экстракции согласно [2]. Очистку индивидуальных флаволигнанов проводили с использованием метода препаративной колоночной хроматографии. В качестве сорбента использовали Тоуорепарл HW-40 (20×2,8 см, элюент – 50 % изопропанол). Способность флаволигнанов предотвращать повреждение ДНК фага λ продуктами окисления бензидина определяли по изменению электрофоретической подвижности модифицированных молекул ДНК. Реакцию повреждения молекул ДНК проводили в 0,015 М трис-НСl буфере рН 7,4 с добавлением 0,05 % Tween-20 в общем объеме реакционной смеси, равном 20 мкл. Реакционная смесь содержала фаговую ДНК (0,14 мкг), бензидин ($5 \cdot 10^{-6}$ М), пероксидазу из корней хрена (ПХ) (10^{-7} М) и различные концентрации флаволигнанов ($1,03 \cdot 10^{-6}$ – $1,5 \cdot 10^{-5}$ М, с шагом разведения 1,25 раз). Определение концентраций флаволигнанов проводили спектрофотометрически с использованием коэффициента молярной экстинкции для силибинина $\varepsilon = 2,15 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Реакцию запускали добавлением перекиси водорода (10^{-3} М), после чего смесь инкубировали в течение 45 мин при 30 °С. Для разделения и идентификации ДНК проводили горизонтальный электрофорез в 0,9 % агарозном геле в 0,1 М трис-фосфатном буфере рН 8,0 с 0,001 М ЭДТА [3]. Окисление силибинина проводили в 0,015 М трис-НСl буфере рН 7,4. Реакционная смесь содержала 10^{-3} М силибинин, 10^{-3} М перекись водорода и ПХ в различных концентрациях (10^{-6} - 10^{-9} М). Реакцию проводили в течение 1 часа при температуре 30 °С, после чего в реакционную смесь добавляли 96 % этанол в соотношении 1:1. Анализ продуктов окисления проводили методами ТСХ [4] и ВЭЖХ (колонокка 4,6×250, стационарная фаза TSK-gel C-18, 5 мкм) [5].

Результаты и их обсуждение

В настоящее время в лабораторной практике используются самые разнообразные подходы для оценки генотоксичности различных химических соединений [6]. Суть самых простых из них состоит в использовании модельных систем повреждения молекул ДНК. Необходимо отметить, что эти системы не описывают изменения функционирования генов, а лишь указывают на возможность физического повреждения носителей генетической информации. Наши исследования защитной активности флаволигнанов проводились в системе повреждения ДНК фага λ свободнорадикальными продуктами пероксидазного окисления бензидина (БД). Результаты электрофоретического анализа показаны на рис. 1.

На приведенной электрофореграмме имеются полосы нативной фаговой ДНК (рис. 1, дорожки 1, 2) и полоса ДНК, агрегированные свободнорадикальными продуктами окисления бензидина (рис. 1, дорожка 3). При внесении в реакцию смесь различных концентраций силибинина наблюдается постепенное появление неповрежденной фаговой ДНК (рис. 1, дорожки 4–16). Все остальные индивидуальные флаволигнаны (силикрестин и силидианин), также как и силимарин, предотвращали процесс образования сшивок между молекулами ДНК, что свидетельствует об их способности эффективно взаимодействовать с радикальными продуктами пероксидазного окисле-

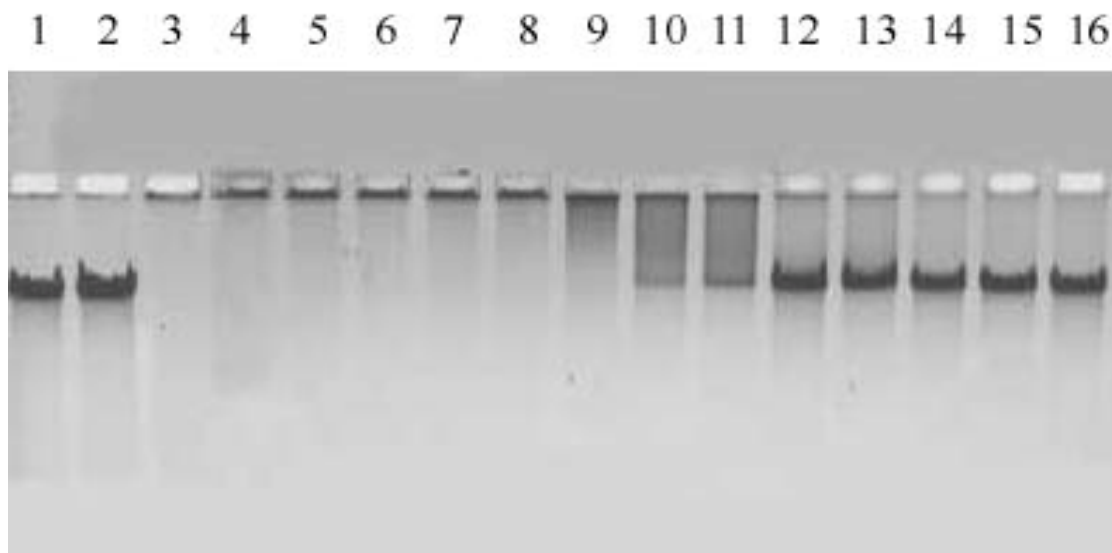


Рис. 1. Ингибирование процесса образования сшивок ДНК фага λ в зависимости от концентрации силибинина.

Дорожка 1 – ДНК фага λ ; 2 – ДНК фага λ +ПХ+БД; 3 – ДНК фага λ +ПХ+БД+H₂O₂; 4–16 – ДНК фага λ +ПХ+БД+H₂O₂+силибинин (концентрация возрастает слева направо)

ния БД. В пользу последнего предположения свидетельствует тот факт, что различные флаволигнаны препятствуют образованию сшивок ДНК, находясь в реакционной смеси в эквимольных концентрациях по отношению к концентрации бензидина. Необходимо отметить, что силибинин (СБ) может выступать в качестве субстрата для окисления. Это предположение подтверждается результатами тонкослойной хроматографии, приведенной на рис. 2.

На хроматограмме четко прослеживается тенденция к исчезновению пятна, характерного для нативного силибинина, по мере увеличения концентрации ПХ и появлению, по меньшей мере, двух новых продуктов окисления этого флаволигнана (рис. 2, дорожки 3–5), обладающих меньшей хроматографической подвижностью. Дальнейшее увеличение концентрации ПХ приводит к исчезновению всех описанных выше соединений и накоплению продуктов окисления в области старта. Особенности хроматографического разделения продуктов пероксидазного окисления флаволигнанов в стандартной системе разделения позволяют предположить, что происходит образование реакционноспособных метаболитов, способных к образованию конденсированных продуктов. Данные положения подтверждаются и методом ВЭЖХ.

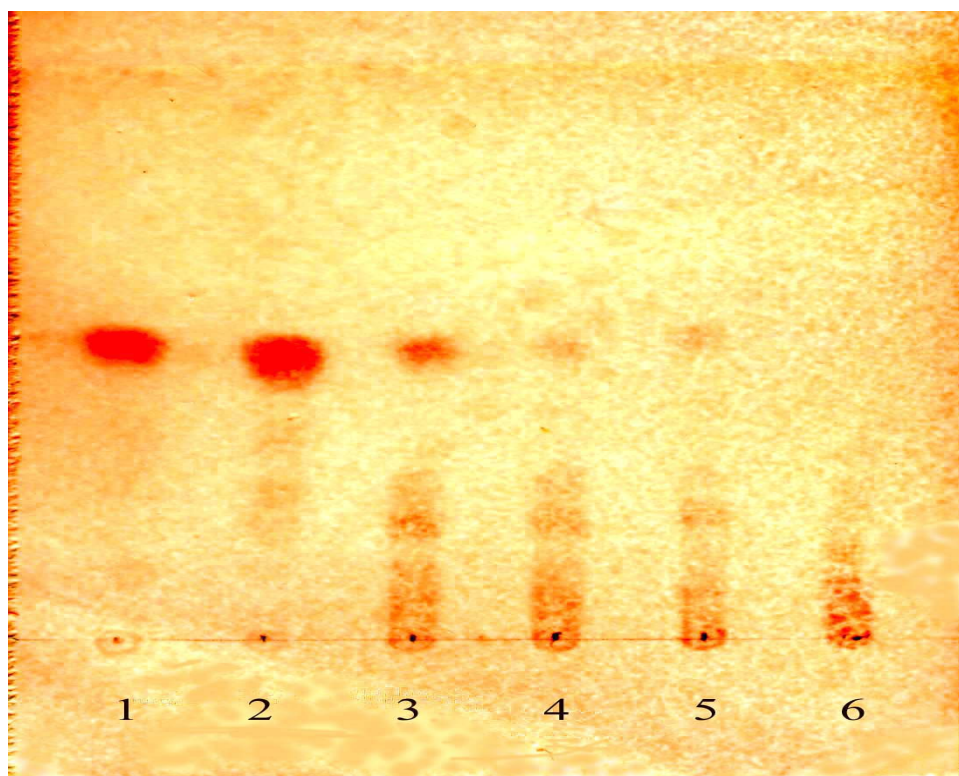


Рис. 2. Хроматограмма продуктов пероксидазного окисления силибинина. Дорожка 1 – СБ; 2 – СБ+ПХ (10^{-6} М); 3 – СБ+ПХ (10^{-9} М)+ H_2O_2 ; 4 – СБ+ПХ (10^{-8} М)+ H_2O_2 ; 5 – СБ+ПХ (10^{-7} М)+ H_2O_2 ; 6 – СБ+ ПХ (10^{-6} М) + H_2O_2

Один из вопросов, который представлял особый интерес, заключался в исследовании генопротекторных свойств продуктов пероксидазного окисления силибинина в системе повреждения ДНК оксидантами бензидина. Оказалось, что продукты окисления силибинина, также как и неокисленные флаволигнаны, способны препятствовать образованию перекрестных сшивок ДНК, вызванных метаболически активированным бензидином.

Таким образом, различные индивидуальные флаволигнаны, будучи антиоксидантами, способны эффективно предотвращать повреждения ДНК промежуточными продуктами окисления бензидина. В основе защитного действия флаволигнанов лежит их способность непосредственно реагировать со свободнорадикальными продуктами пероксидазного окисления бензидина. Конкурентному ингибированию флаволигнанами ферментативных реакций активации ксенобиотиков, вероятно, принадлежит меньшая роль.

Литература

1. Бунятян Н. Д., Герасимова О. А., Сахарова Т. С., Яковлева Л. В. Природные антиоксиданты – как гепатопротекторы. // Экспериментальная и клиническая фармакология. 1999. Т. 62. № 2. С. 64–67.
2. Куркин В. А., Запесочная Г. Г., Авдеева Е. В. и др. // Способ получения экстракта расторопши пятнистой // Патент РФ № 2102999. 1998.
3. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. / М.: Наука, 1981. 288 с.
4. Wagner H., Bladt S., Zgoinski E. M. Plant Drug Analysis: A Thin-Layer Chromatography Atlas. / NY.: Springer Verlag, 1984. 320 p.
5. Куркин В. А., Запесочная Г. Г., Авдеева Е. В. и др. // Количественное определение силибина и суммы флаволигнанов в плодах *Silybum marianum* (L.) Gaerth // Растительные ресурсы. М. Вып. 3. 1996. С. 80–86.
6. Абилев С. К., Порошенко Г. Г. Ускоренные методы прогнозирования мутагенных и бластомогенных свойств химических соединений // Итоги науки и техники ВИНТИ. Токсикология. 1986. Т. 14. 171 с.

ДИАТОМОВЫЕ ВОДОРОСЛИ ПЕРИФИТОНА ОЗЕР ЮЖНЫЙ И СЕВЕРНЫЙ ВОЛОСО

Н. М. Котова

Перифитон является важным компонентом водных экосистем, в связи с чем его изучение имеет не только теоретическое, но и практическое значение.

Перифитон широко используется в системе мониторинга поверхностных вод, особенно в реках, где в связи с течением видовой состав планкто-