



УДК 581 (132 + 174)

А. В. МАЛАШЕВИЧ, Л. Ф. КАБАШНИКОВА,
С. А. МИХАЙЛОВА, С. Н. КАБАНОВА

СОСТОЯНИЕ ХЛОРОФИЛЛА РАЗЛИЧНЫХ СОРТОВ ТРИТИКАЛЕ

Chlorophyll triticales exists in two physical-chemical forms, those can be divided with helping of solvents with different degree of polarity. Content of chlorophyll, extracted by solvents with poor polarity, determines the protein component of chloroplasts.

Исследование фотосинтеза стимулируется не только желанием проникнуть в его сущность, но и уверенностью в том, что это будет способствовать повышению продуктивности растений и урожая сельскохозяйственных культур. Высокопродуктивные сорта некоторых сельскохозяйственных растений обладают фенотипической адаптивностью к условиям окружающей среды за счет высокой лабильности метаболических и фотосинтетических процессов.

Одним из факторов адаптации растений к условиям окружающей среды является неоднородность фотосинтетических пигментов по своим физико-химическим свойствам. Обнаружено, что на всех этапах онтогенеза в обычных условиях высокоурожайные сорта ячменя характеризуются низкой извлекаемостью хлорофиллов *a* и *b* малополярными растворителями. Обеднение фотосинтетического аппарата легкоизвлекаемой формой хлорофилла способно, по мнению авторов, трансформироваться на процессы, связанные с продуктивными особенностями злака [1].

В этой связи исследование физико-химических свойств хлорофилла тритикале вызывает несомненный интерес благодаря уникальности генетической природы этого злака и перспективности его использования в сельскохозяйственной практике. Данные этих исследований будут полезны при отборе исходных форм этой культуры и оценке их перспективности в селекционной работе.

Материал и методика

Для анализов использовали 7—8-дневные проростки тритикале сорта Дар Беларуси и формы БАД-246, Л-374, различающиеся скоростью созревания. Проростки выращивали в климатокамере ВКШ на водопроводной воде при комнатной температуре и 12-часовом фотопериоде. Из проростков выделяли хлоропласты в фосфатном буфере, используя стандартные методические приемы [2].

Свежевыделенные хлоропласты обрабатывали гексаном или смесью гексана и ацетона, взятых в различных пропорциях. Содержимое проб тщательно перемешивали и помещали в холодильник до следующего дня для лучшего извлечения пигментов. По окончании экстракции пигментов малополярными растворителями их остаточные количества доизвлекали неразбавленным ацетоном. Концентрацию пигментов определяли спектрофотометрически, а затем рассчитывали содержание хлорофилла *a* и *b* в единице массы сырых хлоропластов.

В параллельных опытах анализировали содержание белка в сырых хлоропластах по методу Лоури в интерпретации О. П. Осиповой [3]. Для

нахождения их концентрации заранее строили калибровочную кривую по сывороточному альбумину.

Результаты и их обсуждение

Первоначально нами рассмотрен ход кривых извлекаемости хлорофилла ($a + b$) в зависимости от степени полярности растворителя для различных форм тритикале. Известно, что кинетика экстракции пигментов неактивными растворителями использовалась как один из главных аргументов в пользу наличия в листьях растений различных физико-химических форм хлорофилла [4]. Однако, в отличие от ранее описанных работ, мы свои исследования проводили по другой схеме.

Из выделенных в одном опыте хлоропластов готовили серию проб, содержание пластид в которых было выравнено по массе. Затем каждую пробу обрабатывали растворителем определенной полярности, получая в конечном итоге экстракты, концентрация ацетона в которых нарастала от 10 до 60 %. Изменение полярности растворителя от пробы к пробе сопровождалось изменением доли экстрагируемых этими растворителями пигментов.

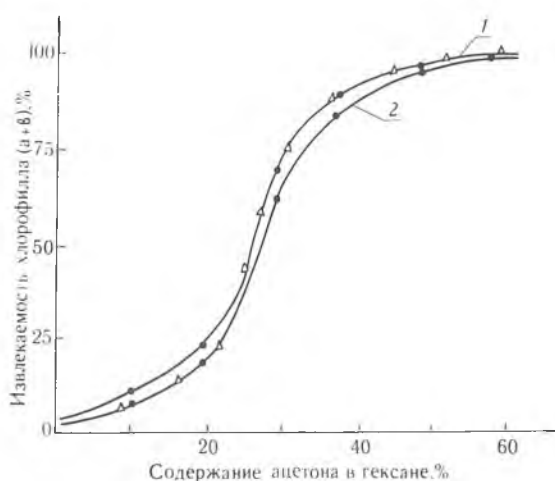


Рис. 1. Кинетика извлекаемости хлорофилла тритикале растворителями нарастающей полярности:
1 — Л-374; 2 — Дар Беларуси

На рис. 1 показаны кривые, отражающие извлекаемость хлорофилла (в % от общего содержания) в зависимости от степени полярности растворителя. Для расчета относительных величин использовали содержание хлорофилла в единице массы сырых хлоропластов (мкг хлорофилла/мг сырых хлоропластов).

Можно видеть, что на фоне линейно возрастающей полярности растворителя извлекаемость хлорофилла описывается S-образной зависимостью. Ход кривой показывает, что небольшая доля хлорофилла (5—7 %) поступает в малополярный растворитель (начальный участок), тогда как для получения основной массы пигментов требуются растворители с более высоким содержанием ацетона. При этом изменение экстрагируемости носит скачкообразный характер, как следствие наличия в хлоропластах двух дискретных форм хлорофилла. Обнаруженная особенность экстракции пигментов в равной мере касается как хлорофилла a , так и хлорофилла b , что позволило нам анализировать их сумму, не разделяя на компоненты. Отметим также, что для всех форм тритикале 50 %-с содержание ацетона в гексане оказывается достаточным, чтобы извлечь всю массу пигментов.

Выбранные нами формы тритикале отличаются скоростью созревания, что позволяет их характеризовать как разноспелый (Л-374), среднеспелый (БАД-246) и позднеспелый сорт (Дар Беларуси). Эти сортовые особенности могут быть следствием специфики онтогенеза фотосинте-

тического аппарата, который формируется и деградирует у раннеспелой формы быстрее, у позднеспелой — медленнее.

Для характеристики особенностей развития фотосинтетического аппарата в онтогенезе мы анализировали выход сырых хлоропластов из единицы сырой массы проростков, а также количество белков в пластидах. Эти показатели сопоставляли с результатами экстракции хлорофилла малополярными растворителями.

Выход хлоропластов и содержание в них белков
у разноспелых сортов тритикале

Форма тритикале	Выход хлоропластов (мг/гр сыр. массы)	Содержание белков в хлоропластах (мкг/мг сырых хлоропластов)
Л-374	32,1±1,9	43,9±0,9
БАД-246	28,1±1,2	33,7±0,8
Дар Беларуси	25,4±1,3	33,2±0,4

Из таблицы можно видеть, что наибольшее количество хлоропластов с высоким уровнем содержания в них белков обнаруживается у проростков раннеспелой формы Л-374 и наименьшее — у позднеспелого сорта Дар Беларуси. Среднеспелый сорт БАД-246 характеризуется промежуточными значениями этих показателей. Оценка вероятности случайного происхождения различий между крайними вариантами подтверждает их надежность ($p < 0,02$).

Сравнительно большой выход хлоропластов у скороспелого тритикале и обогащение пластид белками, по-видимому, является следствием относительно быстрого формирования фотосинтетического аппарата этой формы злака, влекущее за собой раннее созревание. Более мощно развитый фотосинтетический аппарат, показателем которого в нашем случае является выход хлоропластов с единицы сырой массы, позволяет растению быстрее накопить необходимые для созревания семян компоненты.

Состояние хлорофилла у разноспелых сортов тритикале показывает наличие взаимосвязи извлекаемости пигментов малополярными растворителями и содержания белков в хлоропластах. Как было показано ранее [5], большему накоплению белков в хлоропластах соответствует меньшая извлекаемость хлорофилла. Эта зависимость сохраняется при анализе извлекаемости хлорофилла у разноспелых форм тритикале, хлоропласты которых по-разному обогащены белками.

Можно видеть (рис. 2), что высокое накопление белков в хлоропластах Л-374 сопровождается незначительным (около 1,5 %) содержанием в них извлекаемой формы хлорофилла, и наоборот, у позднеспелой формы извлекаемость самая высокая при относительно небольшом содержании белков в хлоропластах.

Полученный экспериментальный материал свидетельствует, что у пшенично-ржаных гибридов тритикале существуют разные физико-химические формы хлорофилла. Причину гетерогенного состояния пигментов в мембранах хлоропластов, как правило, объясняют наличием различного микроокружения молекул хлорофилла и характером взаимодействия с липопротеиновыми компонентами мембран [6]. Тем не менее вопрос о взаимоотношениях белков, липидов и пигментов в фотосинтетической мембране не имеет окончательного решения.

В этой связи следует отметить, что внешние воздействия на биологические мембраны сопровождаются изменением их нативного состояния, в основе которого лежат конформационные перестройки белковых компонентов [7]. Непременным результатом таких влияний является увеличение извлекаемости хлорофилла малополярными растворителями [8].

Установленные нами изменения извлекаемости хлорофилла тритикале под действием прогрессивно нарастающей полярности растворителя

могут быть также обусловлены нарушением нативного состояния белков мембран хлоропластов, инициируемых действием повышенных концентраций ацетона. Низкие концентрации этого растворителя не способны повлиять на конформацию белка, поэтому малополярным растворителем извлекаются лишь те молекулы хлорофилла, которые взаимодействуют только с липидными компонентами мембран. Высокие же концентрации ацетона денатурируют белок. Переход белков из одного структурного состояния в другое носит S-образный характер [9], соответственно которому изменяется извлекаемость пигментов малополярными растворителями.

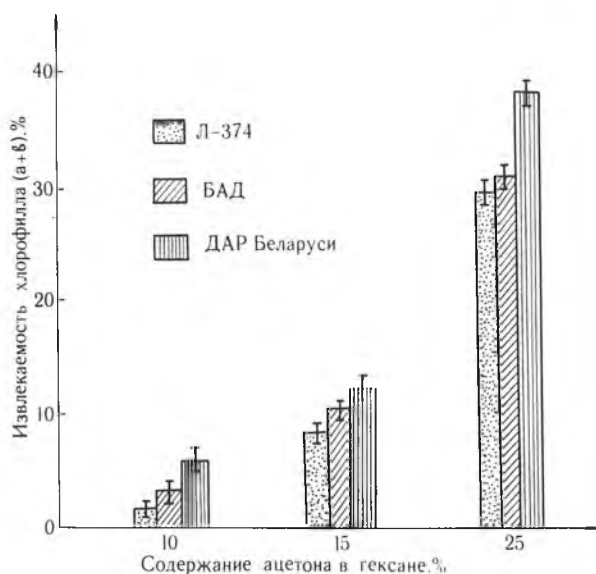


Рис. 2. Извлекаемость пигментов малополярными растворителями в хлоропластах сортов тритикале, различающихся временем созревания

Анализ совокупности представленных в работе данных и полученных нами ранее, показывает, что извлекаемость хлорофилла малополярными растворителями определяется количеством и состоянием белков хлоропластов вне зависимости от липидного компонента. Уменьшение белка в мембранах за счет гидролиза протеазами [10] или естественной деградации хлоропластов в ходе онтогенеза сопровождается адекватным увеличением экстрагируемой формы хлорофилла, тогда как обогащение хлоропластов белками сопровождается непременным уменьшением извлекаемости [5].

Помимо этого всевозможные воздействия, нарушающие нормальный ход синтеза белков в хлоропластах (ингибирование, действие стимуляторов, помещение растений в темноту), всегда сопровождаются соответствующим изменением доли экстрагируемого хлорофилла [11].

Следует также обратить внимание, что содержание белка в хлоропластах и количество извлекаемой формы пигментов проростков некоторых растений может быть показателем онтогенетических особенностей фотосинтетического аппарата и таких свойств растений, как скороспелость и продуктивность, что может быть использовано для ранней диагностики и отбора форм в селекционном процессе.

1. Кабашникова Л. Ф., Михайлова С. А., Чайка М. Т. // Весті АН БССР. Сер. біял. навук. 1987. № 6. С. 25.

2. Малашев А. В., Шлык А. А. // Физиол. растений. 1972. Т. 19. № 2. С. 273.

3. Осипова О. П. // Физиол. растений. 1957. Т. 4. № 1. С. 28.

4. Шлык А. А., Прудникова И. В. // Весті АН БССР. Сер. біял. навук. 1958. № 3. С. 16.

5. М а л а ш е в и ч А. В., К а х н о в и ч Л. В. // Вестн. Белорус. ун-та. Сер. 2: Хим. Биол. Геогр. 1986. № 3. С. 40.
6. Ш л ы к А. А., М и х а й л о в а С. А. // Докл. АН СССР. 1973.
7. М о л о т к о в с к и й Ю. Г. // Физиол. растений. 1970. Т. 17. № 6.
8. Ш л ы к А. А., М а л а ш е в и ч А. В. // Докл. АН СССР. 1970. Т. 194. № 3.
9. К о н е в С. В., А к с е н ц е в С. Л., Ч е р н и ц к и й Е. А. Конформационно-кооперативные переходы белков в клетке. Мн., 1970.
10. М а л а ш е в и ч А. В. Влияние трипсина на состояние и метаболизм хлорофиллов *a* и *b* // IV науч. конф. молодых ученых: Тез. докл. Мн., 1970. С. 60.

УДК 616-006; 612.015.348

В. В. СЕНЧУК, Л. А. ЛАСТОВСКАЯ

СОСТОЯНИЕ ЦИТОСКЕЛЕТНЫХ БЕЛКОВ В ПРОЦЕССЕ РОСТА ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ

The study of actin and tubulin polymerization state, and their distribution within several cancer cells during the process of tumour progression showed the significant rearrangements of the cellular distribution of the cytoskeleton components and marked alteration of their organization pattern.

В исследовании биохимических особенностей злокачественных клеток важное значение придается изучению структурно-функционального состояния компонентов цитоскелета, в значительной степени определяющего протекание различных клеточных процессов — деления, формообразования, рецепции, секреции и др. [1, 2]. В настоящее время установлено, что нарушение организации цитоскелета является одним из характерных признаков злокачественных клеток [1]. В основе этого явления лежит изменение экспрессии изоформ актина [2] и появление в злокачественных клетках мутантных изоформ актина [3, 4]. Причиной обнаруживаемого в опухолях даже одинаковой локализации и гистогенеза многообразия нарушений экспрессии изоформ различных белков является высокий уровень генетической нестабильности опухолевых клеток, проявляющийся в прогрессии неоплазм [5]. Вместе с тем структурно-функциональное состояние цитоскелетных белков в процессе прогрессии злокачественных опухолей до настоящего времени не изучено.

Целью настоящей работы явилось исследование структурного состояния белков цитоскелета (тубулина, глобулярного актина (Г-актина), фибриллярного актина (Ф-актина)) в процессе роста перевиваемых злокачественных опухолей крыс различного гистогенеза, скорости роста и степени злокачественности.

Материал и методика

Эксперименты проведены на беспородных белых крысах массой 150—180 г, содержащихся на стандартном рационе вивария. В работе использовали перевиваемые злокачественные опухоли крыс саркома-45 и карциносаркома Уокера 256, полученные из коллекции штаммов злокачественных опухолей Института экспериментальной и клинической онкологии АМН России. Злокачественные опухоли поддерживали путем перевивания суспензии опухолевых клеток лабораторным животным в соответствии с общепринятыми методами [6]. Животных-опухоленосителей брали в опыт через определенные временные интервалы после перевивания злокачественных клеток, что обусловлено различной скоростью роста штаммов опухолей, использованных в настоящей работе [7].

Субклеточные фракции злокачественных клеток получали методом дифференциального центрифугирования [8]. Содержание Г-актина и Ф-актина измеряли в цитоплазматической фракции и в составе плазматической мембраны злокачественных клеток по степени ингибирования активности панкреатической ДНКазы 1 [4]. Суспензию изолированных клеток злокачественных опухолей получали по методу Jacob и Bhargava [9]. Жизнеспособность клеток оценивали по поглощению красителя трипанового синего [9]. Цитоскелет получали лизисом клеток в растворе, содержащем 0,5 %-й тритон X-100 [10]. Белковый состав цитоскелета и плазматических мембран опухолевых клеток анализировали электрофо-