

ЕЛЕНА КОСТОВА ШОПОВА

АНАЛИЗ НА ОКСИДАТИВНИТЕ ПРОЦЕСИ В ГРАХ
(*PISUM SATIVUM* L.), ИНДУЦИРАНИ ОТ ФОТОАКТИВНО ГЕНЕРИРАН
СИНГАЛЕТЕН КИСЛОРОД

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация
за присъждане на образователната и научна и степен “Доктор”

Научна специалност:
01.06.16 – Физиология на растенията

Дисертацията е написана на 109 печатни страници и включва 18 фигури, 5 таблици и 5 фотографии. Списъкът на цитираната литература съдържа 405 източника, 8 от които на кирилица.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на Разширен Научен Съвет на секция „Регулиране на растежа и развитието на растенията” при Институт по физиология на растенията и генетика, БАН, проведено на 27.07.2010г.

Изследванията по дисертационния труд са извършени в ИФР „Акад. М. Попов”, БАН и ИМБ, БАН.

Дисертантът към момента работи като асистент в ИФРГ, БАН.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на .07.2011г. от ч. в заседателната зала на Института по физиология на растенията и генетика, БАН, ул. „Акад. Г. Бончев”, бл. 21, ет. 2, на открито заседание на Научното жури, определено за защитата.

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в библиотеката на Института по физиология на растенията и генетика, БАН, ул. „Акад. Г. Бончев”, бл. 21, ет. 2, ст. 225.

ЕЛЕНА КОСТОВА ШОПОВА

АНАЛИЗ НА ОКСИДАТИВНИТЕ ПРОЦЕСИ В ГРАХ
(*PISUM SATIVUM* L.), ИНДУЦИРАНИ ОТ ФОТОАКТИВНО ГЕНЕРИРАН
СИНГЛЕТЕН КИСЛОРОД

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация
за присъждане на образователната и научна и степен “Доктор”

Научен ръководител:

доц. д-р Вера Алексиева

Репензенти:

проф. дбн Иван Йорданов

доц. д-р Петранка Йонова

Научна специалност:

01.06.16 – Физиология на растенията

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

Кирилица

АКФ - активни кислородни форми

ААФ - активни азотни форми

МДА - малондиалдехид

ССК - светосъбиращ антенен комплекс

ТХО - трихлорооцетна киселина

ФС - фотосистема

Латиница

APX - аскорбат пероксидаза

BSO - бутионин сулфоксимин

CAT - каталаза

CDNB - 1-хлоро-2,4-динитробензен

DTNB - 5,5'-дитиобис-2-нитробензоена киселина

GP - глутатион пероксидаза

GR - глутатион редуктаза

GSH - редуциран глутатион

GSSG - окислен глутатион

GST - глутатион-S-трансфераза

LOOH - липидни хидропероксиди

NADH - никотинамидадениндинуклеотид

NADPH - никотинамидадениндинуклеотид фосфат

PCD - програмирана клетъчна смърт

Pheo - феофитин

POX - гваякол пероксидаза

SOD - супероксиддисмутаза

I. УВОД

По време на своето онтогенетично развитие растенията са подложени на действието на различни стресови фактори (стресори). Натрупването на тежки метали, пестициди и остатъци от производствени химикали в почвите и водите, замърсяването на въздуха с аерозолни емисии, засушаването и изчерпването на минералните елементи са само част от последствията в резултат на човешката дейност. Установено е, че почти всички стресови въздействия водят до развитието на оксидативен стрес, засягащ живите организми, в това число и човека. Добре известни са редица заболявания при хората, в чиято основа стои именно образуването на активни кислородни форми. Така например, страдащите от порфирия (от гръцкото *porphurus*- пурпурен) пациенти, с дефект в синтеза на порфиринови хемове, получават сериозни увреждания като резултат от акумулираните в кожата порфиринови прекурсори (фототочувствителни съединения), които при облъчване със светлина водят до образуването на синглетен кислород.

Човекът е успял да вперегне познанията си в тази насока в различни области. Така например, при лечение на рак с т.нар. прозален UV-A терапия се използва също фотосенсибилизатор - прозален (продуцира се от някои растения, например целина) в смес с хематопорфиринови производни, които се натрупват в туморните образувания и при облъчване с UV светлина водят до поразяване на раковата тъкан. Неинвазивният характер на фотодинамичната терапия я прави все по-често използван метод за лечение на определени ракови и неонкологични заболявания. В последните години фармацевтичната индустрия разработва нови лекарствени продукти, в основата на които са именно фотосенсибилизаторите. Така например се смята, че еозин В е подходящ субстрат за направата на по-добър антималяриен препарат.

Много растения синтезират подобни фотосенсибилизатори, превръщайки оксидативния стрес в свое “преимущество” в борбата си с други растителни видове и животни. Такива са гъбите *Cercospora*, синтезиращи церкоспорин, който при осветяване генерира активни кислородни частици и така обуславя преминаването си през клетъчните мембрани на растителните клетки, невенът (*Calendula officinalis* L.), който продуцира “фотодинамичния инсектицид” α -тертиенил, и влакнестата звъника (*Hypericum hirsutum*), синтезираща хиперицин.

Детайлното изучаване на оксидативния стрес като съвкупност от предизвикани и взаимосвързани реакции в клетките е ключът към разгадаване същността на действие на отделните стресори върху комплексната система “жив организъм”.

В процеса на еволюция растенията са изградили сложни защитни механизми, осигуряващи нормалното им съществуване. Тяхното познаване

е безспорно необходимо и полезно за човека и му дава своеобразна преднина в борбата с главоломно нарастващите негативи на заобикалящата ни околна среда. Новите растителни сортове, притежаващи повишен капацитет на антиоксидантните защитни системи, е един от пътищата за увеличаване на устойчивостта към стресови въздействия на основните земеделски култури.

Създаването на подходяща и изчистена моделна постановка като основа на научните експерименти е първата стъпка в тази насока. В нашата работа бе използван фотосенсибилизаторът еозин Y, който при облъчване със светлина продуцира синглетен кислород. Така се създава една изчистена моделна постановка, подходяща за изучаване както на уврежданията, предизвиквани от действието на синглетния кислород, така и на отговора на защитните механизми, участващи в обезвреждането на активните кислородни форми.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Изследване на влиянието на продуцирания от багрилото еозин синглетен кислород върху ендогенните оксидативни увреждания и антиоксидантната защита при грах.

Поставената цел бе осъществена чрез реализиране на следните задачи:

1. Оптимизиране на моделна система, позволяваща изследване на влиянието на продуцирания от еозина синглетен кислород.

2. Определяне в динамика на ефекта от действието на еозина върху растежа на млади грахови растения с отстранена коренова система и охарактеризиране на физиологичното състояние на фотосинтетичния апарат, чрез измерване на хлорофилна флуоресценция.

3. Анализ на промените в количеството на някои неспецифични защитни съединения - пролин, общи феноли, глутатион, свободни нискомолекулни тиоли и водородния пероксид.

4. Определяне на нивата на $^1\text{O}_2$ -предизвиканите увреждания в мембранните липиди, белтъците и ДНК.

5. Проучване на функцията на глутатиона при защитата на растенията от синглетен кислород.

6. Изследване на измененията в активността и изоензимния профил на основните антиоксидантни ензими в растенията.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Експериментална постановка

1.1. Растителен материал и условия за отглеждането му

Като моделна система е използван грах (*Pisum sativum* L.), сорт Скинадо. Семената се накисват за 4-ри часа в чешмяна вода, след което се поставят върху филтърна хартия на тъмно в термостат за период от 72 часа. Покълналите семена се отглеждат като водна култура на хранителен разтвор на Хогланд-Арнон (Гродзинский, 1973) в климатична камера при контролирани условия (12/12 часа фотопериод; интензивност на светлината $\sim 70\text{-}90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; температура – $25 \pm 1.8^\circ\text{C}$). За експериментите се използват 10 – дневни растения (фаза напълно развит 2 лист), на които чрез отрязване се отстранява кореновата система.

1.2. Третиране с еозин

Надземната част се поставя в съдове с общ обем 80 ml, с различна концентрация на воден разтвор на еозин Y. Във всеки съд има по 6/4 растения. Опитните варианти са четири:

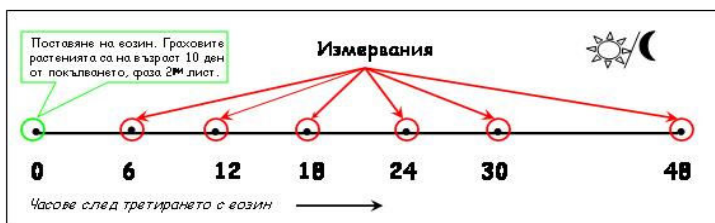
На светло

1. Контрола - дестилирана вода;
2. Еозин -1 μM ;
3. Еозин -10 μM ;
4. Еозин -50 μM .

На тъмно

1. Контрола - дестилирана вода;
2. Еозин -1 μM ;
3. Еозин -10 μM ;
4. Еозин -50 μM .

Вариантите на светло са под непрекъснато осветяване ($70\text{-}90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) - за период от 48 часа. Граховите растения от втората група са на тъмно, отново от 0 до 48 ч. По-долу е представена схемата на опитите:



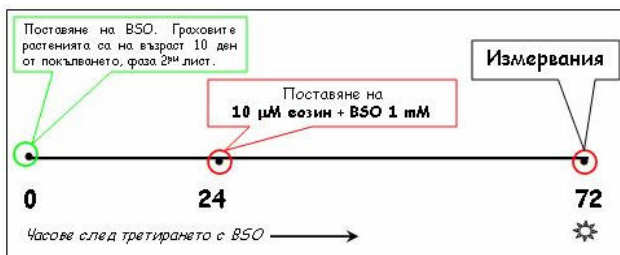
Растителен материал за експериментите е събиран 6, 12, 24, и 48 час след началото на експеримента, а за някои показатели и на 18 и 30 ч. Представените резултати са средна стойност от три независими опита. Материалът за всяка проба е събиран от 2-ри листен етаж на 4 растения.

1.3. Третиране с BSO (buthionine sulfoximine)

Десетдневните грахови растения, с отстранена коренова система се поставят на съдове с 1 mM BSO (воден разтвор) за 24 ч., при непрекъснато

осветяване (контролните растения са на дестилирана вода). Част от вариантите с BSO се прехвърлят на разтвор с $10\ \mu\text{M}$ концентрация на еозин и $1\ \text{mM}$ BSO, а част от контролите на разтвор само с $10\ \mu\text{M}$ еозин. Следва 48 ч. период на осветяване. Опитните варианти са следните:

1. Контрола - дестилирана вода
2. Еозин $10\ \mu\text{M}$
3. BSO $1\ \text{mM}$
4. Еозин $10\ \mu\text{M}$ + BSO $1\ \text{mM}$



Измерванията са правени 72 ч. след претретирането с BSO (48 ч. след третирането с еозин).

1.4. Сравнителна оценка на токсичността на някои инициатори на АКФ

Граховите растения, отгледани по описания в т. 1.1. начин, са поставени на съдове с различни концентрации на ацифлуорфен, диурон, паракват, водороден пероксид, атразин и Бенгалска роза (4,5,6,7-тетрахлоро-2',4',5',7'-тетрайодофлуоресцин) при непрекъснато осветяване ($70\text{--}90\ \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). За всяко съединение са приложени 6 различни концентрации в диапазон $1\text{--}500\ \mu\text{M}$. Свежите тегла на експерименталните растения (по 6 растения за всяка работна концентрация) от всеки вариант са измерени на 0 и 48 ч. ID50% е изчислена като нелинейна функция с помощта на софтуер Table Curve. Резултатите са средна стойност от два независими опита.

2. Експериментални процедури

Морфологични показатели

Определяне на количеството на отделени електролити - Dexter et. al. (1932)

Определяне степента на липидно пероксидиране – МДА - Dhindsa et al. (1981); липидни пероксиди - Buege and Aust (1978)

Определяне на карбонилното съдържание - Reznick and Packer (1994)

Определяне количеството водороден пероксид - Alexieva et al. (2001)

Определяне съдържанието на свободен пролин - Bates (1973)

Определяне количеството на свободни тиолови групи – по Ellman (1959) с модификации на Едрева и Хаджийска (1984)
Определяне на съдържанието на общи феноли - Swain и Goldstein (1964)
Определяне съдържанието на тотален и окислен глутатион - Gronwald et al. (1987)
Измерване съдържанието на разтворими белтъци - Bradford (1976)
Активност на Пероксидазата (EC 1.11.1.7) - Dias and Costa (1983)
Активност на Каталазата (EC 1.11.1.6) - Aebi (1983)
Активност на Супероксиддисмутазата (EC 1.15.1.1) - Beauchamp and Fridovich (1971)
Активност на Глутатион-S-трансферазата (EC 2.5.1.18) - Gronwald et. al. (1987)
Активност на Глутатион редуктазата (EC 1.8.1.7) - Smith et al. (1988)
Нативна полиакриламидна гел електрофореза (PAGE) на:

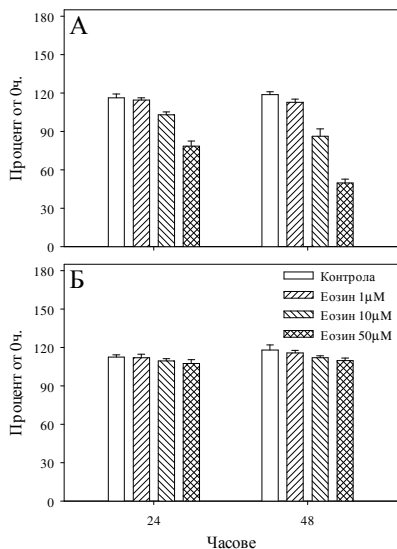
- *Каталаза (EC 1.11.1.6) - оцветяване на гела по Woodbury et al. (1971)*
- *Супероксиддисмутаза (EC 1.15.1.1) - оцветяване на гела по Beauchamp и Fridovich (1971)*
- *Глутатион редуктаза (EC 1.8.1.7) - оцветяване на гела по Ye et al. (1997)*

Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) или Comet Assay – изолиране на ядра по Peycheva et al., (2010), оцветяване на гела по Nadin et al. (2001)
Измерване на хлорофилната флуоресценция

IV. РЕЗУЛТАТИ

1. Ефект на третирането с еозин върху свежото тегло на надземната част на грахови растения

Съществуват два основни подхода за изучаване на физиолого-биохимичните ефекти на синглетния кислород в растенията – екзогенно инфилтриране с продуценти (Knox and Dodge, 1985c) или използването на мутанти (Op den Camp et al., 2003; Wagner et al., 2004), които натрупват метаболити, продуциращи $^1\text{O}_2$. И в двата случая наличието на светлина е съществен фактор. В нашата работа използвахме фотосенсибилизатора-еозин Y. Обикновено изследванията с фотосенсибилизатори имат за обект листни дискове, а не интактни растения. Разработената от нас моделна система позволява провеждането на обективен и достоверен анализ на оксидативните процеси в растителния организъм, в сравнение с използването на листни дискове. Посредством вариантите без осветление се отчита предполагаемия физиологичен ефект на еозина (без наличието на синглетен кислород), тъй като еозин-свързаната продукция на $^1\text{O}_2$ е строго светлинно зависима. За по-бърза и ефективна абсорбция на багрилото се наложи отстраняване на кореновата система на граховите растения. За да



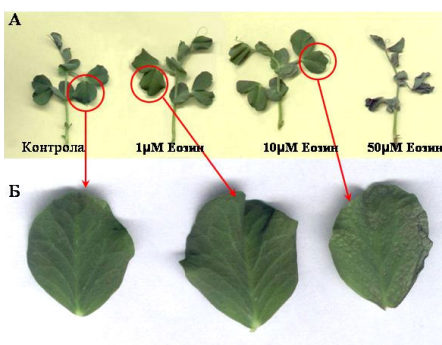
Фиг. 1 Влияние на третирането с еозин върху теглото на надземната част, при непрекъснато осветление (А) и на тъмно (Б).

илюстрира отчетената редукция в теглото на граховите растения. Второто измерване отговаря на крайната фаза на експерименталния период. Третирането с 10 μM еозин понижава с 15%, а 50 μM - с 45% теглото на третираните растения за 48 ч. На тъмно не се отчитат изменения, независимо от концентрацията на еозина (фиг. 1Б).

На снимка 1 са показани визуалните изменения, наблюдавани при третираните с еозин и осветявани растения. Сврху генерирането на $^1\text{O}_2$ в инфилтрираните с еозин растения води до развитие на хлорози, които на по-късен етап преминават в некрози. На 48-ия час растенията, третирани с най-високата концентрация на багрилото, са напълно изсъхнали, а при тези от вариант 3 (10 μM) се наблюдават множество некротични петна (снимка 1). В инфилтрираните с 1 μM еозин растения не се установяват визуални изменения.

се изследват в динамика наблюдаваните ефекти от $^1\text{O}_2$ -продукция подбрахме различни часове на вземане на пробите. Времетраенето на опита е определено експериментално, като за краен етап избрахме 48 ч., т.к. на този етап и растенията, третирани със средната еозинова концентрация, развиват некрози, а 50 μM са загинали още на 24 ч. Така се създава една изчистена моделна постановка, подходяща за изучаване както на уврежданията, предизвиквани от действието на синглетния кислород, така и на отговора на защитните механизми, участващи в обезвреждането на АКФ.

Третирането с еозин повлиява значително свежето тегло на опитните растения, подложени на непрекъснато осветяване. Установена е ясно изразена зависимост доза-ефект. Фиг. 1А



Снимка 1 Визуални ефекти от третирането с еозин след 48ч. на непрекъснато осветяване. А-грахови растения с отстранена коренова система; Б-грахови листа.

Сравнен с други съединения, водещи до образуването на синглетен кислород (ацифлуорфен, диурон, бенгалска роза, атразин) и такива, чието въздействие е свързано с генерирането на други АКФ - паракват (индуцира образуване на супероксидни радикали) и водороден пероксид, еозинът предизвиква най-силен ефект в най-ниски концентрации (табл. 1). В таблицата са представени стойностите за **ID50%** на шестте изследвани съединения. Въз основа на получените резултати вниманието ни се съсредоточи върху еозина като източник на $^1\text{O}_2$.

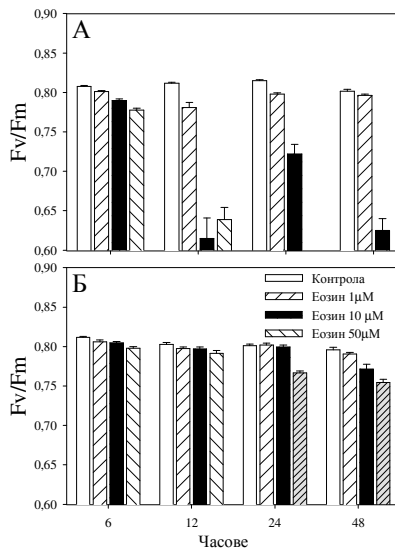
2. Хлорофилна флуоресценция

Индукционните флуоресцентни криви и произлизащите от тях параметри са често използвани за оценка на биотични и абиотични въздействия върху растенията в стресовата физиология. Отношението F_v/F_m представлява максималния квантов добив на първичната фотохимична реакция във ФС2 и е важен параметър, отразяващ физиологичното състояние на фотосинтетичния апарат. Стресови въздействия, които повлияват ефективността на ФС2, водят и до понижаване на отношението F_v/F_m .

Еозинът, приложен на тъмно, слабо понижава максималния квантов добив на първичната фотохимична реакция. Ефектът е по-добре изразен при по-високите концентрации: след 48 ч. за $10\ \mu\text{M}$ и след 24 и 48 ч. за $50\ \mu\text{M}$ концентрации на еозина. Физиологичното действие на еозина върху фотосинтетичния апарат се проявява при осветяване. Понижението на F_v/F_m в резултат от комбинацията еозин/светлина е очевидна още след първите 6 часа, и се засилва както с увеличаването на концентрацията на еозина, така и с увеличаване на продължителността на въздействието. Трябва да отбележим разширяването на диапазона, в който варират стойностите от отделните извадки с увеличаване на концентрацията на еозина и продължителността на въздействието.

Вещество	ID50% (μM)
Ацифлуорфен	158.47
Диурон	493.68
Паракват	331.27
Атразин	714.44
Водороден пероксид	1020.39
Бенгалска роза	1285.92
ЕОЗИН	40.36

Таблица 1 Концентрации (μM) на ацифлуорфен, диурон, паракват, атразин, водороден пероксид, Бенгалска роза и еозин, които предизвикват 50% инхибция на FW (ID50%), след 48ч. въздействие (при непрекъснато осветяване).



Фиг. 2 Влияние на третирането с еозин върху съотношението F_v/F_m при непрекъснато осветление (А) и на тъмно (Б).

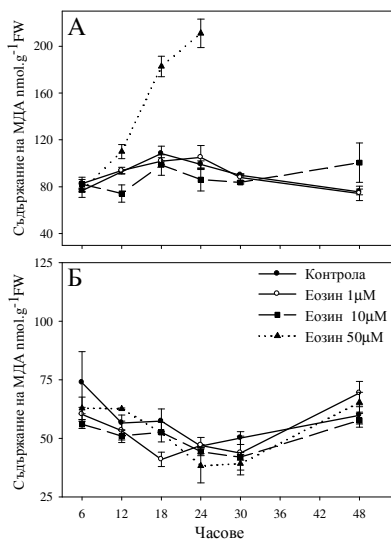
Налага се уточнението, че отделните стойности са измерени от различни растения и изчислената стандартна грешка отразява както различията между растенията, така и разликите в поглъщането на еозина и в чувствителността на различните растения към неговото действие. Резултатите показват ясно изразена и статистически достоверна зависимост доза-ефект.

3. Влияние на третирането с еозин върху нивата на оксидативни увреждания в липидите, белтъците и ДНК

Известно е, че АКФ, в това число и синглетният кислород, предизвикват оксидативно модифициране в структурата на липидите и като следствие от този процес – нарушения във функционалната цялост на клетъчните мембрани (Davey et al., 2005). Получените липидни

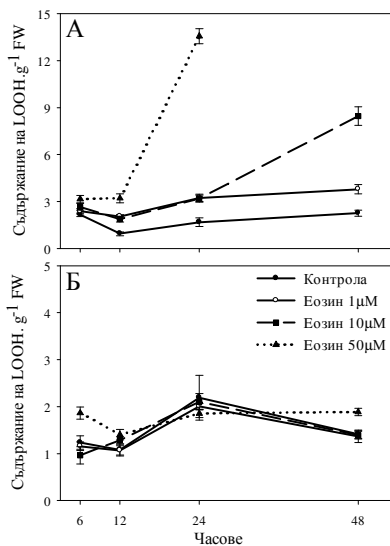
хидропероксиди (LOOH) могат да участват в различни редокс реакции, да се транспортират до по-чувствителни за действието им места в клетката, действайки по този начин като огнища за развитието на оксидативен стрес (Girotti, 1998).

Малондиалдехидът (МДА) е един от крайните продукти от пероксидирането на ненаситените мастни киселини (Halliwell and Gutteridge, 2000). Промяната в количеството на МДА е надежден индекс за определяне на степента на липидно пероксидиране в растителната клетка (Davey et al., 2005). От фигура 3А се вижда, че за разлика от липидните хидропероксиди и подобно на водородния пероксид, съдържанието на МДА се повишава 12 часа след началото на експеримента, при граховите растения третирани с най-високата (50 μM)



Фиг. 3 Влияние на третирането с еозин върху количеството на МДА, при непрекъснато осветление (А) и на тъмно (Б).

концентрация на еозин и поставени на непрекъснато осветление. Дванадесет часа по-късно (24 час), количеството на МДА е повече от 2 пъти по-високо, в сравнение със стойностите на контролата. Известно покачване в нивото му е отчетено и при последното измерване (48 час) на растенията от 3-ти експериментален вариант (10 μM еозин). При растенията третирани с най-ниската концентрация на багрилото (1 μM), не се наблюдават съществени изменения в съдържанието на МДА. Както се вижда от фигура 3Б, въздействието с еозин на тъмно, не води до статистически достоверни промени в количеството на малондиалдехида.

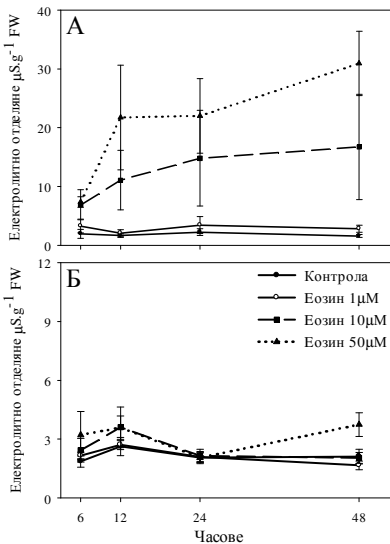


Фиг. 4 Влияние на третирането с еозин върху количеството на LOON при непрекъснато осветление (А) и на тъмно (Б).

съответните варианти са 192 и 190%. Не са установени значителни изменения в нивата на LOON, при растенията поставени на тъмно (фиг. 4Б).

Един от основните показатели за оценка на уврежданията в тъканите е промяната в пропускливостта на мембраните. В тази връзка отделянето на електролити е достоверен количествен маркер за степента на деструктивните изменения. Редица автори показват, че електролитното отделяне се повишава значително при растения, подложени на серен диоксид (Navari-Izzo et al., 1989), ниски температури (Dörffling et al., 1990), хербициди (Kenyon and Duke, 1985; Chen and Kao, 1993; Hara et al., 2010) и др. Ефектът от третирането с еозин и спрегнатото с това генериране на синглетен кислород върху отделянето на електролити е представен на фиг. 5А. Вижда се, че приложен в 1 µM концентрация, фотосенсибилизаторът не предизвиква значителни промени в стойностите на този показател. В растенията от 3 и 4-та опитна група (10 µM и 50 µM) еозинът води до

Непосредствено след началото на експеримента (6 ч.) е установено повишение в количеството на LOON във всички експериментални групи (фиг. 4А). Максимални стойности са отчетени при растенията, третирани с 50 µM еозин. Дванадесет часа след инкубиране с багрилото в същата опитна група са измерени 3 пъти по-високи количества на LOON в сравнение с контролата. На 24 час тези стойности са вече 8 пъти по-високи от контролните. По-ниските еозинови концентрации (1 µM и 10 µM) предизвикват по-малко, но устойчиво във времето покачване в нивата на LOON. Измерванията на 12 ч. показват съответно 216% и 199 % завишение в количеството на измервания показател. При третото измерване (24 ч.) стойностите за



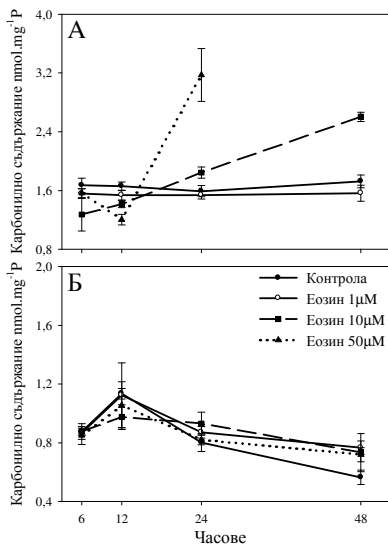
Фиг.5 Влияние на третирането с еозин върху промените в електролитното отделяне при непрекъснато осветление (А) и на тъмно (Б).

екстремално нарастване в отделянето на електролити. Тенденцията се запазва през целия експериментален период, като в края растенията, третирани с 10 μM еозин, отделят три пъти повече електролити от контролите. За третираните с 50 μM увеличението е четирикратно. Прилагането на багрилото в отсъствие на светлина води до незначителни промени в електролитното отделяне, в сравнение с осветените растения (фиг. 5Б).

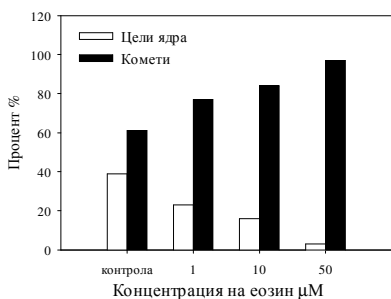
Получените резултати за липидното пероксидиране и електролитното отделяне предполагат развитие на окислителни процеси и в мембранните белтъци. Добре известно е, че синглетният кислород е основната АКФ, свързана с оксидативното модифициране на белтъчните молекули, водещо до повишаване на съдържанието на карбонилните съединения (Davies, 2003). Интересно е да се отбележи, че в нашата моделна система началните измервания показваха по-ниски или близки до контролните стойности за карбонилното съдържание при всички опитни варианти (фиг. 6А). Тази тенденция се запазва до 12 ч. след третирането с еозин, при непрекъснато осветление. От 24-ят час растенията третирани с 50 μM еозин, показват два пъти по-високи стойности за карбонилни съединения. На този етап и при третата експериментална група (10 μM еозин) има завишени нива на оксидативния маркер.

Четиридесет и осем часа след началото на инкубиране с еозин на светло при средната еозинова концентрация (10 μM) има двукратно завишени стойности на измервания показател. При вариантите без осветление е регистрирано леко завишение на стойностите, но като цяло те остават статистически неразличими от нивата на контролите (фиг. 6Б).

Растителната ДНК е една от мишените на $^1\text{O}_2$ (Halliwell and Gutteridge, 2002). Кометният анализ е най-широко прилаганият метод за оценка на увреждания в ДНК. На фигура 8 са

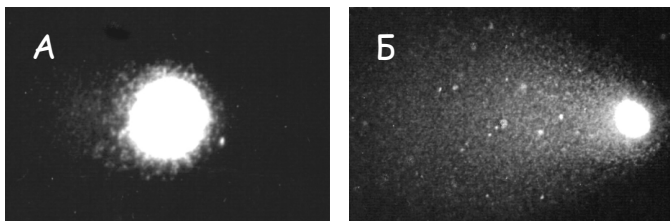


Фиг. 6 Влияние на третирането с еозин върху карбонилното съдържание при непрекъснато осветление (А) и на тъмно (Б).



Фиг. 7 Ефект на третирането с еозин за 24ч. на светло върху разпределението на здрави/увредени (комети) ядра.

показани снимки от здрави (А) и увредени (Б) ядра (комети), получени след третиране за 24 часа с еозин на светло. Контрастно ярките петна (с формата на опашка или комета) на фигура 8 са следствие от разпръскването на фрагментираната под въздействието на $^1\text{O}_2$ ДНК. Третирането с еозин за 24 часа на светло води до значително увеличаване на броя на кометите във фракцията на ядрата. Например при растенията, инфилтрирани с 50 μM от багрилото, броят на здравите ядра намалява 13 пъти в сравнение с контролите (фиг. 7). Наблюдава се ясно изразена зависимост доза-ефект.



Фиг. 8 Снимка на комети, получени от грахови растения третиран с еозин: **А** – Ядро от нетретираны клетки. **Б** – Комети IV клас, получени от третираны с 10 μM еозин растения (на светло).

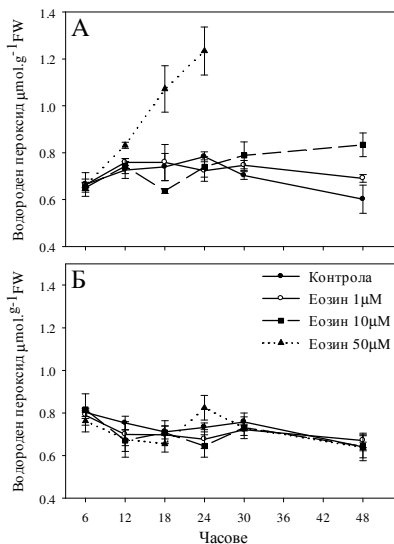
От представените резултати се установява ясно, че третирането с еозин на светло предизвиква драстично повишаване на оксидативните увреждания в граховите растения, като степента на повишение на стресовите маркери е пропорционална на приложената концентрация. Изследваните показатели имат различна чувствителност спрямо действието на синглетния кислород. Най-бързо в началото на експеримента се променя съдържанието на липидните пероксиди, отделянето на електролити от растителните тъкани и уврежданията в ДНК. Този резултат потвърждава теорията, че *in vivo* първоначална мишена на синглетния кислород са ненаситените мастни киселини (Triantaphylides et al., 2008), което от своя страна води до моментално нарушаване на интегритета на мембраните, т.е. изпускане на електролити. Повишението в МДА и карбонилното съдържание в белтъците закъснява и се проявява около 6 часа по-късно.

4. Влияние на третирането с еозин върху количеството на ендогенния водороден пероксид

Водородният пероксид се образува нормално в растителните клетки. Това става при редица неензимни и ензимно катализирани реакции. Основните източници на водороден пероксид в растенията са електрон-транспортните вериги в хлоропластите и митохондриите (Halliwell and Gutteridge, 2002; Cheeseman, 2007). Един от основните генератори на H_2O_2 е SOD (Cheesemen, 2007). В пероксизомите също са локализирани голям брой оксидази (гликолат оксидаза, урат оксидаза и ацил-СоА оксидаза), продуциращи H_2O_2 (Willekens, 1995). Пероксидът се получава и като краен продукт на процеса фотодишане (Foyer et al., 2009). Различните видове

стресови въздействия водят до акумулация на H_2O_2 в клетките. В тази връзка, повишените му ендогенни концентрации са достоверен показател за развитието на свободнорадикалови реакции в растенията. В ниски концентрации действа като сигнална молекула (Ślesak et al., 2007).

В проведените от нас, при непрекъснато осветление експерименти, се наблюдава значително покачване в количеството на водородния



Фиг. 9 Влияние на третирането с еозин върху промените в количеството на водородния пероксид при непрекъснато осветление (А) и на тъмно (Б).

пероксид, още на 12 час от началото на опита (при растенията третираните с най-висока концентрация на еозин – 50 μM ; фиг. 6А). Тази тенденция се запазва при тях до 24 час, след който те загиват. При останалите два опитни варианта, 1 и 10 μM еозин, има известно увеличение на 30 час, което става по-ясно изразено едва в края на експерименталния период (съответно 115% и 138% от контролата). Тези резултати показват, че H_2O_2 се акумулира по-съществено само в растенията, третираните с най-високата доза (50 μM), и следователно той не може да е основна причина за измененията в антиоксидантната защита и оксидативните увреждания на вариантите, инфилтрирани с 1 и 10 μM . За поставените на тъмно контролни растения

е установено понижение в съдържанието на H_2O_2 (фиг. 9Б). Най-вероятно, това е следствие от инхибирането на основния източник на водороден пероксид в растенията – фотосинтетичните електрон транспортни вериги. От фигура 9Б се вижда, че във вариантите, третираните с еозин на тъмно, не се отчитат съществени изменения, спрямо контролите, в количеството на пероксида.

5. Въздействие на третирането с еозин върху измененията в съдържанието на някои неспецифични защитни съединения

5.1. Пролин

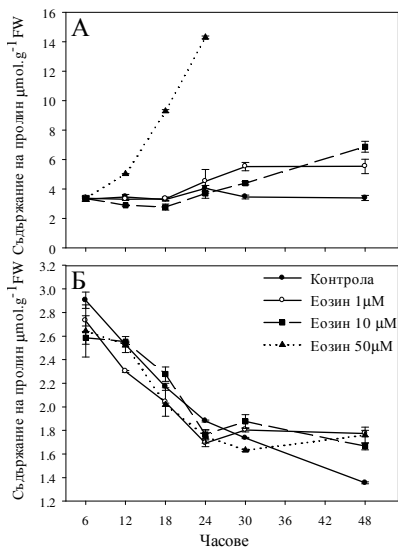
Пролинът е α -аминокиселина. В растителната клетка се среща в свободно или свързано състояние. Освен добре познатите му антиоксидантни и осморегулаторни функции се смята, че участва и в контрола на генната експресия (Hare and Cress, 1997). Взаимодейства директно или индиректно с макромолекулите, стабилизирайки тяхната пространствена структура. В известна степен функциите на осмопротектантите (като пролина, глицин-бетаина и др.) се припокриват с

тези на някои стрес индуцируеми белтъци, като дехидрините и чапероните, но разбира се на различно ниво на организация в клетките. Свободният пролин взаимодейства ефективно с $^1\text{O}_2$ (Alia et al., 2001; Matysik et al., 2002).

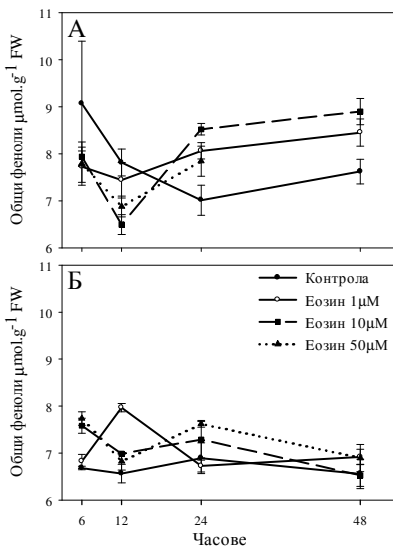
При опитите, проведени в нашата моделна система, бе установено, че при всички експериментални варианти на светло се наблюдава повишаване в ендегенното съдържание на пролин (фиг. 10А). Получените от нас резултати са в потвърждение на литературните данни за драстично покачване в нивото му при различни стресови въздействия (Saradhi et al., 1995; Matysik et al., 2002) - до 50 пъти повече от нормалните нива в растителната клетка (Alia et al., 2001). Най-значимо увеличение в нашата моделна система беше отчетено при използване на 50 μM еозин – четири пъти спрямо контролите на 24-ят час. Растенията от втори (1 μM) и трети (10 μM) вариант показват повишаване, в количеството на пролина, 30 часа след началото на експеримента, като тази тенденция се запазва и при последното измерване (48 час). При всички групи растения на тъмно се наблюдава тенденция за понижени в нивото на пролина. За варианта с най-висока еозинова концентрация на 6ч. то е с 9% по-ниско (в сравнение с контролата). На същия етап, 10 μM вариант е 89% от контролата. За най-ниската концентрация на багрилото, е отчетено понижени на пролиновото съдържание до 94% (от контролния вариант). При петото и последното измерване (съответно на 30 и 48 час) се наблюдава слабо покачване в концентрациите на иминокиселината при растенията, третирани с двете най-ниски еозинови концентрации. За 10 μM то е 107% (от контролата) на 30 ч. и 123% в края на експеримента. При 1 μM , съответните стойности са 104% (на 30 ч.) и 131% (на 48 ч.).

5.2. Общи и разтворими феноли

Еозинът, приложен самостоятелно (без светлина), не предизвиква съществени изменения в количеството на общите феноли (фиг. 11Б), сравнено с контролните растения. Подобна зависимост наблюдавахме и по отношение на съдържанието на свободни тиоли. За разлика от тях и пролина, фенолното съдържание не нараства значително след осветяване, а напротив. При първите две измервания всички третирани с багрилото



Фиг. 10 Влияние на третирането с еозин върху промените в количеството на пролина при непрекъснато осветление (А) и на тъмно (Б).



Фиг. 11 Влияние на третирането с еозин върху промените в количеството на общите феноли при непрекъснато осветление (А) и на тъмно (Б).

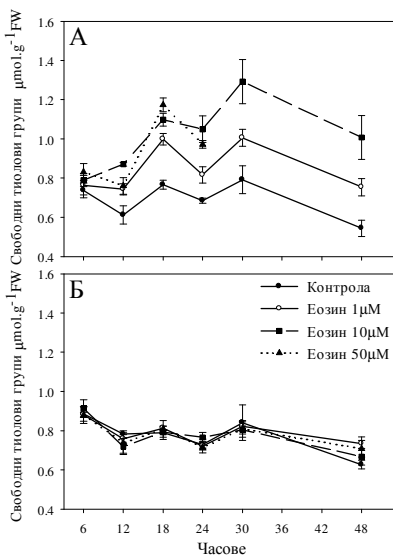
5. 3. Свободни, нискомолекулни тиолови групи

Растителните клетки съдържат съдържащи съединения с небелтъчна структура, които изпълняват множество физиологични и метаболитни функции (Foyer, 1993). Основен нискомолекулен тиолов компонент в растенията е глутатионът и неговите аналози и предшественици (хомоглутатион, цистеин и др; Alsher, 1989). Глутатионът има ключова роля в антиоксидантната защитна система на растенията. Някои автори предполагат, че количеството на свободните тиолови групи в растенията директно корелира с устойчивостта към въздействия с екстремални фактори на околната среда (Naugaard, 2000).

Нашите резултати показват, че съдържанието на свободни тиолови групи се увеличава при всички опитни варианти, на светло (фиг. 12А). Осемнадесет часа, след третирането

варианти (плюс светлина) бяха със занижено съдържание на феноли в сравнение с контролните растения. Едва на 24 час беше отчетено завишение при трите концентрации на фотосенсибилизатора (фиг. 11А). Максимално покачване беше регистрирано за варианта с 10 μМ концентрация. Интересен е фактът, че най-стабилно, макар и слабо завишение, установихме за растенията от групата на светло, с най-ниската приложена концентрация на еозин-1 μМ. Редица изследвания демонстрират, че много феноли са мощни антиоксиданти. В тази моделна постановка обаче, третирането с еозин на светло и тъмно не води до значителни изменения в количествата на фенолите, което сочи, че те не вземат съществено участие в защитата на растенията от $^1\text{O}_2$.

значително количество тиол



Фиг. 12 Влияние на третирането с еозин върху съдържанието на свободни тиолови групи при непрекъснато осветление (А) и на тъмно (Б).

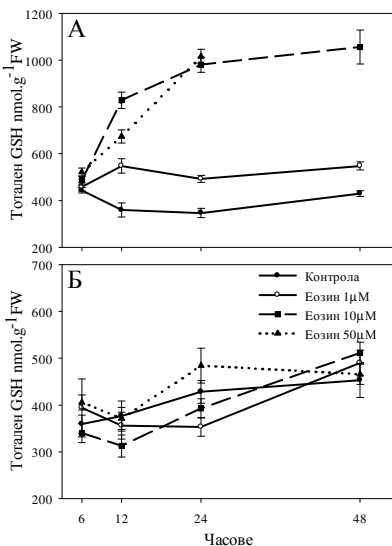
вариантът с най-висока концентрация на багрилото е 153% от контролния. Растенията с 10 μM разтвор на еозин показват 43% увеличение. По-голямо е количеството на свободните тиолови групи и при най-ниската работна концентрация – 1 μM , съответно 130% от контролата. Интерес представлява установената концентрационна зависимост. На 24 час всички групи третирани растения имат завишени стойности: 153% за вариант 3 (10 μM) и 119% за втори (1 μM) (от контролата). Тази тенденция се запазва до края на експеримента. При последния експериментален час (48-ми), процентното покачване на свободните тиолови групи е съответно с 85% за средната еозинова концентрация и с 38% за най-ниската. Стойностите от всички измервания, за вариантите на тъмно, се приближават до тези на контролните растения (фиг. 12Б).

6. Ефект от третирането с еозин върху съдържанието на глутатион

Глутатионът е широко използван маркер за оксидативен стрес в растенията (Tauzs et al., 2004). Доказано е антиоксидантното му действие не само в хлоропластите, но и в митохондриите, цитозола и пероксизомите (Noctor et al., 2002). Съдържа се във високи концентрации и в ядрото (Muller et al., 2002).

Комбинацията от еозин и осветяване води до значително повишаване в нивото на глутатиона, във всички експериментални групи (фиг. 13А). Тази тенденция се запазва през целия експериментален период.

Максимални стойности бяха отчетени на 24 ч. при растенията третирани с 50 μM еозин – 293%, сравнени с контролната група. Следващото измерване на 48 ч. показва последващото нарастване в количествата на тоталния глутатион. Увеличението за 10 μM еозин достига впечатляващите 246%, а при 1 μM еозин - 127%. На този етап растенията, инкубирани с най-висока концентрация на багрилото и светлина, са загинали. Подобни резултати публикуват през 2000 г. Gullner и Dodge (Gullner and Dodge, 2000). Те установяват завишени нива на GSH при третиране на листи дискове от грах с близки до използваните от нас концентрации на еозин (съчетани с непрекъснато осветяване), на 24 ч. след инкубацията с фотосенсибилизатора.

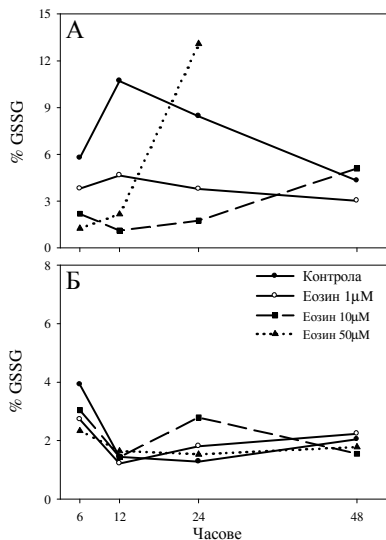


Фиг. 13 Влияние на третирането с еозин върху количеството на тоталния GSH при непрекъснато осветление (А) и на тъмно (Б).

Изследванията на съотношението GSH/GSSG допълват коментираните промени в количеството на глутатиона и дават яснота, по отношение на редокс статуса в нашата моделна система. Този показател е важен параметър, характеризиращ функционалната активност на антиоксидантната защитна система в растенията (Tausz et al., 2004; Noctor, 2006). В контролните растения процентът на GSSG варира от 4 до 11% на светло, и от 1.6 до 4% на тъмно—фиг. 14Б, като се покачва значително след 12 ч. на непрекъснато осветяване, последвано от леко понижение на 24 и 48 ч. Процентът на GSSG е по-нисък при растенията третирани с еозин, с едно изключение. Двадесет и четири часа след началото на експеримента при растенията, третирани с 50 μM еозин, е отчетено повишение в процентното съдържание на окисления глутатион. Това корелира с максималното повишение на тоталния GSH, последвано от загиването на растенията. Опитите без осветление показват различна тенденция. Както е показано на фиг. 13Б и 14Б, еозинът не предизвиква значителни изменения в GSH съдържание и върху процентното отношение на GSSG, при липса на светлина. Този факт не е изненадващ, т.к. еозин-свързаната продукция на синглетен кислород е строго зависима от светлината.

Провокирани от значителното повишение в количеството на глутатиона след въздействието с еозин (и светлина), за нас беше интересно да разберем дали GSH участва непосредствено в защитата от синглетен кислород. При блокиране на глутатионовия биосинтез можеше да се очаква значително намаляване на устойчивостта на растенията към въздействие с еозин. Обратно, при липса на връзка между GSH и детоксификацията на синглетния кислород, неговото отстраняване не може да промени значително описаните по-горе токсични ефекти на еозина. За проверка на тази хипотеза растенията бяха третирани с бутионин сулфоксимин (BSO), който инхибира γ -глутамилцистеин синтетазата (Yu et al., 2002) и води до драстично понижаване на съдържанието на глутатион.

Изследвани са измененията в свежото тегло и количеството на глутатиона в различните експериментални групи. Не бяха установени видими морфологични изменения след инхибиране на GSH синтеза при вариантите с BSO. Отчетено е значително повишение на GSH, при



Фиг. 14 Влияние на третирането с еозин върху процента GSSG при непрекъснато осветление (А) и на тъмно (Б).

растенията третирано само с 10 μM еозин – таблица 2, подобно на фиг. 13А. Инкубирането с BSO предизвиква драстично понижаване в съдържанието на GSH (15 пъти). Растенията, претретирано с BSO и еозин, имат по-високо съдържание на GSH, сравнени с тези само с BSO, но все пак 3 пъти по-ниски концентрации от контролните.

Две седмици след покълването на граховите растения те са във фаза на усилен растеж. През този период всяко външно, негативно въздействие върху тях понижава темповете на нарастване в свежото им тегло. Тази показател е широко използван индикатор за измерване на степента на външните въздействия върху растителния организъм (Alexieva et al., 2001; Ivanov and Kerchev, 2007). Нашите експерименти показаха 10.5% покачване в свежото тегло на контролните растения за период от 72 ч. (табл. 2). Третирането с еозин очаквано предизвиква редукия в теглото за разлика от BSO, който приложен самостоятелно води до обратния ефект – леко повишение спрямо контролите. Комбинираното третиране с еозин и BSO намалява нарастването на теглото спрямо контролите, но то остава по-високо, отколкото при самостоятелното използване на еозина. Парадоксално, но блокирането на глутатионовия биосинтез (и драстичното намаление на неговото съдържанието) не повишава чувствителността на растенията към предизвиканата от еозин свръхпродукция на синглетен кислород. Експериментът убедително доказва, че при грах глутатионът не участва в детоксификацията на синглетния кислород.

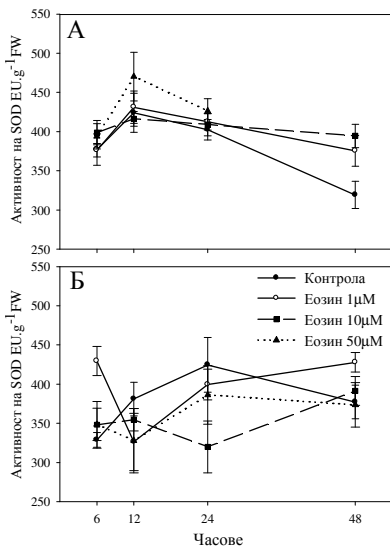
7. Влияние на третирането с еозин и свързаната с това продукция на синглетен кислород върху активността на някои ензими от антиоксидантната защитна система

7.1. Супероксиддисмутаза (SOD)

Супероксиддисмутаза е единственият ензим в растителните клетки, който обезврежда супероксидния радикал. Различните и изоформи са локализирано в цитозола, хлоропластите и митохондриите. Повишената активност на SOD най-често е следствие от увеличената продукция на супероксидни радикали в организмите. Нашите експерименти показват, че в края на опита (на светло), при растенията, третирано с ниска и средна

Варианти	FW 72ч.	GSH 72ч.
Контрола	110.5 ^a	492.2 ^a
Еозин 10 μM	99.70 ^b	764.8 ^b
BSO 1mM	114.1 ^a	33.60 ^c
BSO+Еозин	103.0 ^c	157.0 ^d

Таблица 2 Промени в свежото тегло (FW) и количеството на тоталния глутатион (GSH) в грахови растения, третирано с еозин (10 μM), BSO (1 mM) и комбинация от двете. Измерванията на FW са направени на 0 и 72ч. от началото на експеримента. FW е представено като процент от началното състояние (0ч.), а GSH като nmol.g^{-1} FW. Буквените индекси към стойностите представят статистически достоверните разлики за всяко измерване, определени по метода на Fisher ($\text{LSD}<0.01$).

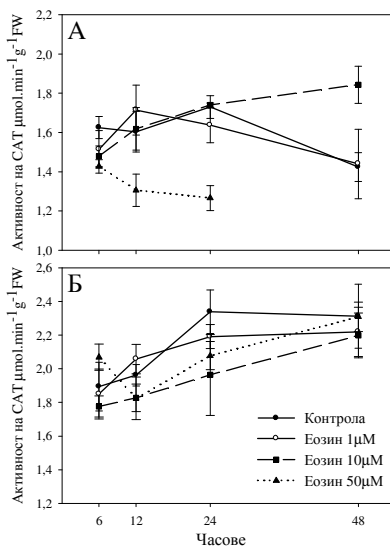


Фиг. 15 Влияние на третирането с еозин върху активността на SOD при непрекъснато осветление (А) и на тъмно (Б).

7.2. Каталаза (CAT)

Ензимът катализира директното разграждане на водородния пероксид. Локализиран е основно в цитозола и пероксизомите. Нашите резултати показват, че третирането с еозин понижава активността на каталазата при всички опитни варианти още в началото на експеримента (6 час). Прилагането на 50 μM еозин инхибира ензима с 12% при това измерване (фиг.16А). Най-силно изразено понижение в активността на каталазата (с 27%) се наблюдава на 24 час, при растенията, третирани с 50 μM от багрилото. Единствено при прилагане на средната еозинова концентрация активността на ензима се повишава с 20% на 48 час. Проведените опити на тъмно не показват съществени изменения в активността на каталазата (фиг. 16Б).

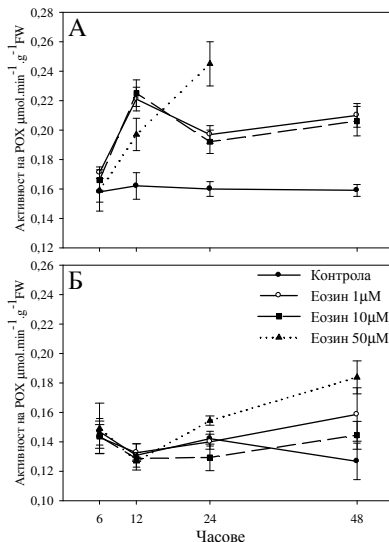
еозинови концентрации, активността на SOD се увеличава в известна степен (фиг. 15А). За растенията, третирани с 1 μM багрило, тя е със 17%, а при тези с 10 μM, промяната е с 23% над контролните стойности. При варианта с 1 μM еозин (на тъмно), активността на ензима е по-висока на 6 час, с 30% над контролната (фиг. 15Б). В края на експерименталния период при растенията от същата опитна група активността на SOD е 113% в сравнение с контролите. По отношение на другите работни концентрации на багрилото, наблюдаваните изменения са незначителни. Като цяло, в нашата моделна постановка не се наблюдават съществени изменения в активността на SOD.



Фиг. 16 Влияние на третирането с еозин върху активността на CAT при непрекъснато осветление (А) и на тъмно (Б).

7.3. Пероксидаза (POX)

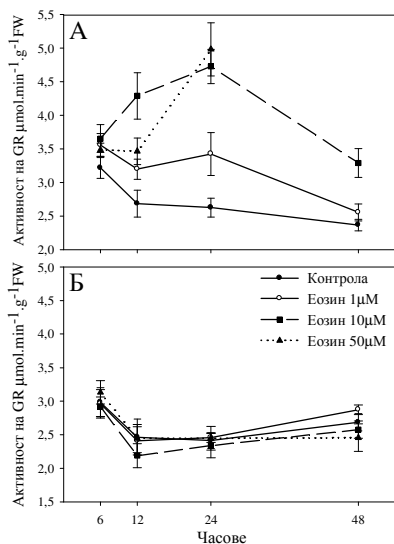
Подобно на каталазата, пероксидазата обезврежда водородния пероксид. За разлика от първата обаче, пероксидазата се нуждае от наличието на донор на електрони. Това изискване я поставя в зависимост от функционирането на редица вторични метаболитни процеси в растителните клетки. Третирането с еозин, на светло, предизвиква увеличение в активността на ензима във всички опитни групи (в сравнение с контролата; фиг. 17А). Най-вероятно, това е свързано с повишената продукция на водороден пероксид. В растенията, третирани с най-висока еозинова концентрация, максимални стойности са достигнати на 24 час (153% от контролата). При същата опитна група увеличена активност на пероксидазата се наблюдава още при второто измерване – с 21% над контролната. Високи са и нивата, отчетени при използване на средната и най-ниската концентрация на багрилото – 120% за 10 μM и 123% за 1 μM (от контролата), на 12 час. При контролните растения не се наблюдават изменения в активността на пероксидазата. При опитите проведени на тъмно, съществено изменение в ензимната активност е установено само при варианта с най-висока еозинова концентрация (фиг. 17Б). На 24 час растенията, третирани с 50 μM еозин, показват 108% от контролите. В края на експеримента увеличението в активността на пероксидазата достига 45% над стойностите отчетени за контролите.



Фиг. 17 Влияние на третирането с еозин върху активността на POX при непрекъснато осветление (А) и на тъмно (Б).

7.4. Глутатион редуктаза (GR)

Глутатион редуктазата катализира редукцията на окисления глутатион с участието на NADPH (Halliwell and Gutteridge, 2000). Локализирана е в хлоропластите, митохондриите и цитозола (Edwards et al., 1990; Creissen et al., 1995; Jiménez et al., 1997; Rudhe et al., 2004), както и в пероксизомите (Jiménez et al., 1997; del Río et al., 2002). Проведените от нас на светло опити показват, че третирането с еозин значително повишава активността на ензима. Прилагането на средно количество багрило (10 μM) води до увеличение с 59% на ензимната активност още на 12-я час. Отчетена е корелация между концентрацията на използвания в експеримента еозин и степента на повишение в активността на глутатион



Фиг. 18 Влияние на третирането с еозин върху активността на GR при непрекъснато осветление (А) и на тъмно (Б).

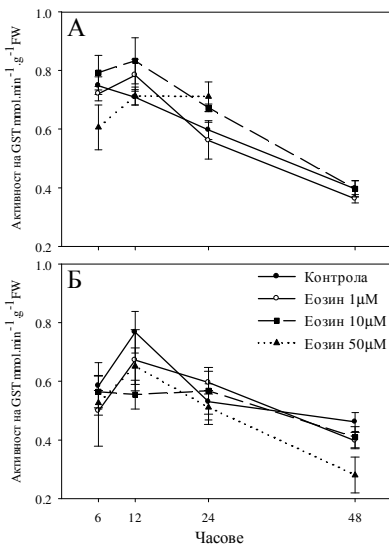
токсичните хидро– и ендопероксиди, получени при оксидативното модифициране на липидите (Roxas, 1997; Dixon et al., 2002). Тъй като еозинът предизвиква образуването на $^1\text{O}_2$, чиято основна мишена на действие са ненаситените мастни киселини, това наложи определянето на измененията в активността на GST като една от първостепенните цели в нашите експерименти.

Проведените експерименти (при непрекъснато осветяване) показват, че в началото на изследвания от нас период (на 6 час), активността и се понижава леко при растенията, третирани с най-високата еозинова концентрация – до 19% (от контролата; фиг. 19А). Следва повишаване на ензимната активност с 19% за 50 μM еозин (на 24 час). Третирането на растенията със средната концентрация на еозин (10 μM), води до увеличаване – с 13% (над контролата) и на 24-я час. От опитите, проведени на тъмно, най-ясно понижение на глутатион-S-трансферазата се наблюдава при трети вариант (10 μM) на 12 час – с 28% от контролата (фиг. 19Б). В

редуктазата. Например на 24 час, активността на ензима е съответно 189%, 180% и 130% (от контролата), по посока на понижаващата се концентрация на багрилото. В края на експерименталния период, нивата на глутатион редуктазата остават завишени – с 39% за третата група растения, и с 8% за втората. Като цяло на тъмно не се наблюдават ефекти, подобни на тези, предизвикани от еозина при осветяване на растенията.

7.5. Глутатион-S-трансфераза (GST)

Действието на GST е свързано с обезвреждане на различни ксенобиотици. Освен това, през последните години редица изследователи установяват, че тя участва в процесите на детоксификация на



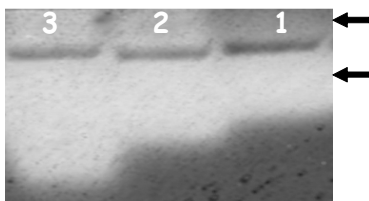
Фиг. 19 Влияние на третирането с еозин върху активността на GST при непрекъснато осветление (А) и на тъмно (Б).

края на експерименталния период се отчита инхибиране с 33% на ензимната активност и при растенията, третирани с най-високата еозинова концентрация (4-ти вариант). От приведените резултати се вижда, че въпреки наличните в литературата данни (получени обаче в други експериментални модели), въздействието с еозин не предизвиква значителни изменения в активността на GST.

8. Нативна PAGE на някои антиоксидантни ензими в грах

8.1. CAT

Повечето растения притежават 2–5 изоформи на каталазата.



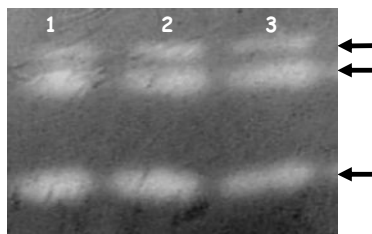
Снимка 2 Нативна PAGE на CAT. Линия 1: Контрола; Линия 2: 1μМ еозин; Линия 3: 10μМ еозин. Със стрелки са обозначени двете изоформи на CAT. Растителните проби са взети на 24ч., след третирането с еозин при непрекъснато осветяване.

Направената нативна PAGE показва наличието на две ивици, т.е две изоформи на CAT в грах. Този резултат съвпада с наличната литература. Съгласно електронните база данни (<http://www.uniprot.org/>), в грах се установяват 2 гена за каталаза (P25890 и C0STY9). Както се вижда от снимка 2, и двете изоформи на ензима са по-силно изразени при варианта, третиран с 10 μМ еозин на светло. По-високата интензивност

на избледняване съответства най-вероятно на повишена активност на каталазата.

8.2. SOD

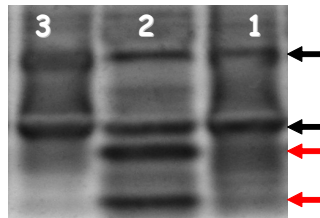
На снимка 3 е представена картина от проведената нативна PAGE за SOD на контролните и третирани с еозин растения, при постоянно осветяване. Ясно видимо оцветяване се установява за 3 изоформи. Най-вероятно най-леката е Cu/Zn цитозолна изоформа, продукт на гена Q02610 (SODC_PEA, 152 аминокиселини и молекулно тегло от 15 323 D), най-тежката е Cu/Zn хлоропластната P11964 (SODCP_PEA, 202 аминокиселини, молекулно тегло от 20 626 D), а средната е митохондриална MnSOD, генът за която до настоящия момент не е секвениран. Не се наблюдават различия между изследваните варианти.



Снимка 3 Нативна PAGE на SOD. Линия 1: Контрола; Линия 2: 1μМ еозин; Линия 3: 10μМ еозин. Със стрелки са обозначени трите изоформи на SOD.

8.3. GR

Електрофоретичният профил показва наличието на две основни изоформи в контролните и третираните с еозин на тъмно растения (линии 1, 3 на снимка 4). Този резултат съвпада с информацията за съществуването на два гена за GR в грах, кодиращи хлоропластна/митохондриална (P27456, 552 аминокиселини, 59 108 D) и цитозолна (Q43621, 498 аминокиселини, 53 897 D) изоформи. В инфилтрираните на светло растения се наблюдава появата на две нови нискомолекулни ивици (линия 2). Най-вероятно те са на $^1\text{O}_2$ - индуцируеми, но тази хипотеза, разбира се, се нуждае от допълнително потвърждение. Възможно е най-леката ивица да е наблюдаваният от Barroso et al. (2006) фрагмент. Появата на стрес-индуцируеми изоформи на ензима обяснява силното повишение в активността на ензима в третираните с еозин грахови растения (фиг. 18А).



Снимка 4 Нативна PAGE на GR изоформи. Линия 1: Контрол; Линия 2: 10 μM Еозин, при непрекъснато осветяване; Линия 3: 10 μM Еозин на тъмно. Черните стрелки отбелязват конститутивно експресиранияте GR (вероятно това са хлоропласт/митохондриалната P27456 и цитозолната Q43621). Червените стрелки отбелязват $^1\text{O}_2$ - индуцируемите ивици. Растителните проби са взети на 24ч. след третирането с еозин при непрекъснато осветяване.

V. ДИСКУСИЯ

Липидите са най-силно чувствителните към увреждащото действие на $^1\text{O}_2$ биополимери. Повишените нива на маркерите за увреждания на липидите са ясен индикатор за развитието на оксидативен стрес в растителния организъм. Многобройни са примерите в литературата за завишени концентрации на LOOH и МДА при различни стресови въздействия – в резултат на засушаване и високи температури в *Festuca arundinacea* L. и *Poa pratensis* L. (Jiang and Huang, 2001), при UV-B облъчване на грах и пшеница (Alexieva et al., 2001; Katerova et al., 2009) и др. Определянето на количествата на МДА, LOOH и отделянето на електролити ни позволява да оценим нивото на оксидативни модификации в липидите на фаза иницирането на процеса (липидните пероксиди), увреждащото действие от/и степента на развитието на верижно-радикалови реакции (МДА) и крайните последствия върху целостта на растителните тъкани (отделяне на електролити). Доказано е, че съединения, индуциращи образуването на синглетен кислород, повишават нивата на МДА. При въздействие с полски дози атразин, Pallet и Dodge (1980) отчитат увеличение в съдържанието на крайните продукти на липидното пероксидиране - МДА и етан. Аналогично, Ivanov и съавт. (2005) установяват, след третиране с атразин, завишени концентрации на МДА и водороден пероксид и активиране на антиоксидантните ензими в *Arabidopsis thaliana*. Интерес в нашата моделна постановка представлява

наблюдаваната времева последователност от оксидативни увреждания в третираните на светло растения. Първата отчетена промяна е в количеството на липидните хидропероксиди, които нарастват още на 6 час след началото на опита (фиг. 4А). Нито един от останалите показатели не претърпява изменения при това измерване. На 12 час се наблюдава повишаване в съдържанието на МДА и отделянето на електролити. Иницирирането на липидното пероксидиране от $^1\text{O}_2$ би могло да бъде определено като първична реакция в нашата моделна система. Логично възниква въпросът дали получените от нас стойности са резултат от неензимно или ензимно липидно пероксидиране? Тези два типа реакции са различни посредством анализ на получените липидни хидропероксиди. При неензимното пероксидиране се получава рацемична смес, докато ензимно катализирианият процес води до акумулация на енантиомери, като 13*S*-хидропероксиди (Feussner and Wasternack, 2002). Окислението на ненаситените мастни киселини и получаването на оксипипини се катализира от липооксигенази и/или липази (Feussner and Wasternack, 2002). Един от специфичните изомери на окислената линоленова киселина е 13-HOTE (13-хидроксипентадекатриенова киселина). През 2003 г. Op den Camp и колектив доказват бърза акумулация на това съединение в *flu* мутант на *Arabidopsis* след осветяване, без да установяват наличието на неензимни продукти. Авторите обясняват този факт с активиране на липазните и/или липооксигеназните ензими в резултат на продукцията на $^1\text{O}_2$. Това означава, че $^1\text{O}_2$ -сигнална система в *flu* мутантите реализира своята функция посредством вторични медиатори, каквито са LOOH. Това твърдение е подкрепено и от други автори (Girotti and Kriska, 2004; Ledford and Niyogi, 2005). По-нови изследвания доказат, че генерирането на $^1\text{O}_2$ във фотосинтетичните мембрани не предизвиква задължително неензимно окисление на мембранните липиди, а може да действа само като сигнал, водещ до активиране на определени гени, включително и тези за програмираната клетъчна смърт (Przybyla et al., 2008). Дали $^1\text{O}_2$ ще има основно цитотоксичен ефект и/или ще задейства определени сигнални механизми, зависи до голяма степен от интензитета на образуване. Високите нива на продукция ще индуцират оксидативни изменения в биомолекулите, неензимно липидно пероксидиране и смърт, докато средните нива ще активират процесите на ензимно пероксидиране на липидите и ще повлияят генната експресия, индуцирайки PCD (Triantaphylides and Navaux, 2009). Въз основа на нашите данни е трудно да се даде категоричен отговор за спецификата на процеса в нашата моделна система. Вероятно при инкубирането с 50 μM еозин (еозин-свързаната продукция на $^1\text{O}_2$ е концентрационно зависима), в съчетание с осветяване, доминантен е токсичният ефект на продуцирания $^1\text{O}_2$ - растенията са загинали на 48 ч.,

докато при по-ниските концентрации може да предположим едновременната проява и на двата ефекта.

Съдържанието на карбонилни групи в белтъците се приема като най-достоверния маркер за степента на оксидативни увреждания. По-значително повишаване в карбонилното съдържание на вариантите с гледани на светло растения се установява едва в средата на експеримента (24 и 48 час). Както се вижда от фигура 5А, на този етап се наблюдават най-отчетливо ефектите на различните концентрации от багрилото. С удължаване на времето на третиране, количеството на карбонилните групи нараства при 10 μM еозин (фиг. 5А). По-голяма част от процесите на белтъчно окисление са необратими, с изключение на окислението на няколко сяросъдържащи аминокиселини (Ghezzi and Bonetto, 2003). Въз основа на нашите резултати може да твърдим, че *in vivo* продукцията на $^1\text{O}_2$ предизвиква окисление на белтъците на по-късен етап, което най-вероятно се дължи на наличието на защитни механизми срещу това въздействие. Твърде е възможно повишените нива на тиолсъдържащите съединения (глутатион, цистеин, тиоредоксин и др.) (фигури 12А, 13А) да са в основата на механизмите за предпазване на белтъците от синглетен кислород.

Освен върху липидите и белтъците, генерирането на $^1\text{O}_2$ оказва токсичен ефект и върху растителната ДНК. За това свидетелства проведеният от нас анализ, посредством Comet assay. Този метод често се използва за установяване на ДНК повреди в растенията. Посредством Comet assay е установено увреждане на ДНК в коренови клетки на *A. cepa* след третиране с алуминий (Acharya et al., 2008). Използвайки Single Cell Gel Electrophoresis, Gichner et al. (2008) доказват по-високите нива на оксидативно увреждане на ДНК в коренови клетки на тютюн, в сравнение с листата, след третиране с олово. Методът дава възможност за сравнителен анализ на различни стресови въздействия върху растителната ДНК.

Установените от нас увреждания са категорично дозозависими (фиг. 7). Те, заедно с липидното пероксидиране, са първичните реакции на отговор към *in vivo* продукцията на $^1\text{O}_2$ в граховите растения след третиране с еозин (и светлина).

Аскорбатът е един от основните антиоксиданти в клетката, свързан с обезвреждането на $^1\text{O}_2$. (Kramarenko et al., 2006; Митева, 2008). Краен продукт от реакцията са дехидроаскорбат и H_2O_2 (Kramarenko et al., 2006). Свърхпродукцията на H_2O_2 , която установихме при растенията, инфилтрирани с 50 μM еозин, вероятно се дължи на това взаимодействие. Друга възможност е да се образува спонтанно при взаимодействието между $^1\text{O}_2$ и O_2 . Тази реакция е термодинамично осъществима, но протича с ниска скорост и е по-малко вероятна. В резултат на промяната в интегритета на мембраните приоритетно се увреждат електронтранспортните вериги в митохондриите и хлоропластите. Образуват се супероксидни радикали, при

чийто деградация се получава водороден пероксид. Това е и най-вероятната причина за отчетената от нас повишена концентрация на H_2O_2 при всички варианти, третирани с еозин на светло (фиг. 9А). В присъствието на метални йони от водородния пероксид и супероксидните радикали (по реакцията на Хабер-Вайс) се образуват най-реактивоспособните и токсични за клетките хидроксилни радикали. Те са способни да реагират с почти всички клетъчни биополимери, предизвиквайки по този начин неконтролируеми оксидативни увреждания в растенията, водещи до нарастване на крайните продукти от деградацията на липидите (МДА). Очевидно сходната динамика на измененията в количествата на водородния пероксид и МДА (фиг. 3) е доказателство на нашето предположение.

Съдържащите реактивоспособни тиолови групи молекули са едни от най-ефективните антиоксиданти *in vivo*. Тиоловите групи, включени в състава на белтъците, участват главно в регулацията на ензимната активност, докато функциите на нискомолекулните тиоли са свързани директно с обезвреждането на активните кислородни частици и предаване на многобройни клетъчни сигнали (Haugaard, 2000; Noctor et al., 2002; Gomez et al., 2004). Основните нискомолекулни тиоли в растенията са трипептидът глутатион и аминокиселината цистеин (Atmаса, 2004). Счита се, че тези съединения са главните клетъчни антиоксиданти (Noctor and Foyer, 1998; Ahmad et al., 2010 и др.). Трябва да се отбележи, че използваният от нас метод отчита количествата едновременно на глутатиона, цистеина и всички други съединения, имащи в молекулите си реактивоспособни тиолови групи. Получените резултати показват драстично увеличение в съдържанието на свободни тиолови групи във всички растения, третирани с еозин на светло (фиг. 12А). Силно увеличените нива на нискомолекулни тиоли се запазват до края на експерименталния период. Най-вероятно, установеното от нас повишение е пряко свързано с количеството на глутатиона. Това се потвърждава и от измерените от нас нива на GSH.

Глутатионът е ключов компонент от антиоксидантната защитна система в растенията. Нивата на GSH и съотношението GSH/GSSG (обикновено 9–10) са универсален стресов маркер (Tauzs et al., 2004; Noctor, 2006; Miteva et al., 2009; Miteva and Katerova, 2010). Завишени нива в количествата на GSH са измерени при различни стресови въздействия. GSH се повишава след въздействие с UV-B (Bolnik, 2001) и висока температура (Ivanov and Kerchev, 2007). Подобна зависимост е наблюдавана при листни дискове от грах, инфилтрирани с генериращи $^1\text{O}_2$ съединения (Gullner and Dodge, 2000). В тази връзка установеното от нас увеличение в концентрацията на глутатиона след третиране с $^1\text{O}_2$ – индуциращия еозин не е изненадваща (фиг. 12А). Най-ниската и средната еозинова концентрация (1 и 10 μM) понижават процента на GSSG, сравнени с контролата.

Аналогичен ефект, предизвикващ акумулация на GSH, е установен след въздействие с озон и ниски температури (Gupta et al., 1991; Gomez et al., 2004). От друга страна най-високата еозинова концентрация (50 μ M) увеличава GSH съдържание, повишавайки също и процента на GSSG (фиг. 14A), но няколко часа по-късно растенията бързо загиват. Като цяло повишените нива на GSH и по-ниският процент на GSSG в стресови условия се възприемат като положителна реакция на аклиматизация, докато GSH понижение и/или повишеният процент на GSSG имат отрицателен ефект върху растенията (Tausz et al., 2004; Noctor, 2006). Може да се каже, че нашите резултати потвърждават възприетата концепция за стрес реакция на глутатиона.

Обикновено, високите GSH нива предполагат по-добра адаптация на растенията към неблагоприятните условия на средата. Полски опити показват, че поносимостта на царевица към ниски температури е свързана със способността на растенията да повишават GSH концентрация при стресови условия (Leipner et al., 1999). Освен това увеличеното ендегенно съдържание на GSH след използване на хербицидни протектори води до увеличаване на поносимостта към ниски температури, докато инхибирането на GSH след третиране с BSO понижава тази толерантност (Koscy et al., 2001). Основавайки се на тези експерименти беше логично да предположим, че блокирането на GSH - биосинтез ще повиши чувствителността на граховите растения към $^1\text{O}_2$. Нашите резултати показаха точно обратното. Количеството на GSH в растенията, третирани с еозин и BSO (в комбинация), беше почти пет пъти по-ниско, но свежото тегло на растенията от варианта с комбинирано третиране беше по-високо в сравнение със самостоятелното третиране с еозин (табл. 2). Тези резултати показват, че ниските количества на GSH, предварително третирани с BSO, не повлияват устойчивостта на граховите растения срещу $^1\text{O}_2$. Същината на това явление не е съвсем ясна, но в литературата са описани подобни нелогични изменения. В трансгенни растения тютюн, с повишена експресия на хлоропластната γ -глутамилцистеин синтетаза, нивата на GSH в листа са повишени трикратно. Завишените ендегенни концентрации на GSH предизвикват нарастване на нивата на оксидативен стрес под формата на хлорози и некрози (Creissen et al., 1999). Това най-вероятно е свързано и с повлияване на редокс статуса в хлоропластите (Allen, 2002; Baier and Dietz, 2005; Fey et al., 2005). Толерантността на *Vigna radiata* към ниски температури, индуцирана след предварително третиране с H_2O_2 , зависи от акумулацията на GSH и значително намалява при инкубация на растенията с BSO. Когато обаче подобна толерантност е индуцирана в следствие на 48 ч. инкубация при 10°C, то тя не е свързана с акумулация на GSH и не се повлиява от BSO (Hung et al., 2007).

Можем да обобщим, че промените в GSH съдържание при свръх продукция на $^1\text{O}_2$ се вметват в общата концепция за стрес отговор и потвърждават предшестващите изследвания на други учени в тази насока, но резултатите при блокиране на синтеза му са изненадващи. Нашите изследвания показват, че растенията с блокиран глутатионов биосинтез са дори леко по-устойчиви към $^1\text{O}_2$. Следователно GSH не участва директно в детоксификацията на $^1\text{O}_2$. Явно в растенията се задействат други механизми за защита срещу $^1\text{O}_2$. Глутатионовата система реагира на ендегенната продукция на $^1\text{O}_2$, но това не е свързано с активиране на $^1\text{O}_2$ - специфичната защитна система. Функцията му по-скоро може да се свърже с появата на общ сигнал за инициране на оксидативни събития.

Фенолните съединения представляват многобройна група метаболити, с разнообразни функции в растенията. Добре известно е действието им като антиоксиданти (Rice-Evans et al., 1997; Blokhina et al., 2003; Edreva, 2005; Katerova et al., 2009). Фенолите могат да хелатират йони на преходни метали, прекъсвайки Фентъновата реакция, която е един от основните източници на хидроксилни радикали (Michalak, 2006). Arora и сътрудници (2000) демонстрират, че фенолните съединения (основно флавоноидите) повлияват процесите на липидно пероксидиране, модифицирайки мембранната подредба на липидите. Те стабилизират мембраните, понижавайки мембранныя флуидитет и ограничават по този начин дифузията на свободни радикали и съответно намаляват уврежданията в клетъчните биополимери (Arora et al., 2000; Blokhina et al., 2003). Флаванолите и процианидините могат да взаимодействат с мембранните фосфолипиди, образувайки водородни връзки с полярните им глави (Verstraeten et al., 2003). Така те могат да бъдат акумулирани по повърхността на мембраните вътре и извън клетката. Резултатът е предотвратяване на достъпа на реактивоспособни частици до хидрофобната част на бислоя. *In vitro* проучвания показват, че флавоноидите могат директно да обезвреждат АКФ, в това число и синглетния кислород (Michalak, 2006). Това се дължи на тяхната висока реактивоспособност като донори на водород или електрони и на способността да стабилизират и делокализират несдвоените електрони, прекъсвайки радикаловите верижни реакции. Установено е, че *in vitro* те са по-ефективни като антиоксиданти от токоферола и аскорбата (Rice-Evans et al., 1997). Флаванолите и фенилпропаноидите от вакуолата и апопласта могат да служат като донор на електрони за гваякол пероксидазите от тези органели, участвайки по този начин в обезвреждането на H_2O_2 (Takahama and Oniki, 1997; Takahama, 2004; Pearse et al., 2005). В литературата могат да бъдат открити множество данни за значително покачване в количеството на общите феноли, като резултат от различни стресови въздействия. Индуциране на синтеза на изофлавонови и други фенолни съединения е установен при заразяване и механично

нараняване на растения (Takahama and Oniki, 2000). Нискотемпературният стрес и намаленият приток на хранителни вещества също предизвикват подобен ефект (Sakihama et al., 2002; Ruiz et al., 2003). Повишен синтез на феноли е установен при пшеница след третиране с никел (Diaz et al., 2001), както и при царевица след въздействие с алуминий (Winkel-Shirley, 2002). В мезофилни клетки от листа на *Phillyrea latifolia* е доказана обратна корелация между фотоиндуцираната продукция на $^1\text{O}_2$ и съдържанието на флавоноиди (Agati et al., 2007).

В нашата моделна постановка обаче, третирането с еозин на светло и тъмно не доведе до значителни изменения в количествата на фенолите (фиг. 11А), което предполага, че те не вземат участие в защитата на растенията от $^1\text{O}_2$. За да бъдат отчетени завишени нива на фенолното съдържание, трябва да е налице и пространствена близост между мястото им на синтез и продукцията на $^1\text{O}_2$. Вероятно други антиоксиданти (токоферол и аскорбат) успяват да неутрализират действието на $^1\text{O}_2$, или в клетките отсъства сигнал за активиране на тази част от вторичния метаболизъм.

Известно е, че съдържанието на иминокиселината пролин в растенията се повишава в резултат на различни стресови въздействия. Според класическите изследвания пролинът изпълнява ролята на осмопротектант, предпазващ растенията от загуба на тургур и дехидратация. Напоследък все по-често функциите му в клетката се свързват с обезвреждане на активните кислородни форми, в това число и на синглетния кислород. При нашите опити, бе установено, че при всички експериментални варианти на светло се наблюдава повишение в ендегенните концентрации на пролин (фиг. 10А). Най-значително е покачването на 24 час при използването на 50 μM концентрация на еозин - 3.5 пъти над контролните нива. Обратно, в растенията, поставени на тъмно, се наблюдава понижение в количеството на пролина (фиг. 10Б). Ние тълкуваме увеличението в ендегенната концентрация на пролин като общ, неспецифичен защитен отговор на растенията към развитието на оксидативни процеси в техните тъкани, а не конкретно, като следствие от третирането с еозин.

След прилагане на еозин и светлина Кнох and Dodge (1985a) докладват за бърза деструкция на хлоропластите и инактивиране на фотосинтетичния апарат в листи дискове на грах. Тази констатация ни провокира да измерим съотношението F_v/F_m като индикатор за функционалната активност на фотосинтезата. Индукционните флуоресцентни криви и произлизащите от тях параметри са често използвани за оценка на биотични и абиотични въздействия върху растенията в стресовата физиология. Стресови въздействия, които повлияват ефективността на ФС, водят и до понижение на отношението

Fv/Fm. Като цяло, получените по отношение на растежните параметри и индукционните флуоресцентни криви резултати са свидетелство, че увреждащи ефекти се наблюдават само в растенията, развиващи се на светло (фиг. 1А/Б; фиг. 2А/Б), което съвпада с предварително известната информация относно механизма на генериране на $^1\text{O}_2$ от фотоактивни багрила.

Неензимната защитна система при растенията функционира в тясна връзка с антиоксидантните ензими в клетката, за да минимизира вредния ефект на АКФ. Нормално всяка клетъчна органела съдържа повече от един ензим, свързан с обезвреждането на АКФ (Ahmad et al., 2010). За да охарактеризираме функционалната активност на ензимната антиоксидантна система в грах, при повишена продукция на $^1\text{O}_2$, ние изследвахме активността на SOD, CAT, POX, GST и GR.

Супероксиддисмутазата е единственият ензим в клетките, обезвреждащ директно супероксидния радикал и има съществено значение при оцеляването на растенията в условията на стрес (Ahmad et al., 2010). Доказана е повишената активност на ензима при солеви стрес в грах, царевица и чай (Ahmad et al., 2008; Tuna et al., 2008; Upadhyaya et al., 2008). Yang et al. (2008) показват, че в комбинация засушаването и високата осветеност предизвикват значително завишена SOD - активност в семена на *Picea asperata*. Високите нива на другите антиоксидантни ензими (APX, DHAR, MDAR), както и на глутатиона и аскорбата са необходимо условие за повишена експресия на SOD (Slooten et al., 1995). Тя увеличава устойчивостта към различни стресови фактори, само ако останалите антиоксиданти не съумеят да “преодолеят” вредното въздействие на генерираните АКФ (Ahmad et al., 2010). В литературата са налични данни и за обратния ефект. Подтискане на SOD е отчетена след UV - облъчване на картофи (Vyšniauskis et al., 2007), при високо температурен стрес в *Agrostis palustris* (Liu and Huang, 2000) и при солеви стрес при фасул (Brankova et al., 2005). Доказано е че $^1\text{O}_2$ инактивира SOD и CAT (Kim et al., 2001) в *in vitro* опити след екзогенно третиране с фотосенсибилизатор (метиленово синьо и Бенгалска роза). Макар, че точният механизъм на процеса не е изяснен вероятно основна причина е окислението на хистидиновите остатъци в ензимната молекула.

Ние установихме, че третирането с еозин умерено повишава активността на SOD (фиг. 15А). Най-значително увеличение беше отчетено на 12 ч. (за 50 μM еозин при осветяване), като стойностите в края на експеримента остават по-високи от контролните, но малко по-ниски в сравнение с отчетения пик. Възможно е $^1\text{O}_2$ да модифицира структурата на ензима, като това би обяснило понижената активност, измерена при най-високата еозинова концентрация (плюс светлина), в сравнение със стойностите при второто измерване. Тези резултати потвърждават

цитираните по-горе работа на Kim и сътрудници (2001). Друго важно заключение може да се направи въз основа на проведените нативни PAGE. Синглетният кислород не предизвиква промяна в изоензимния профил на SOD. Следователно промяната в активността е част от общата стресова реакция на растението към развитието на оксидативни събития, а не специфичен отговор към $^1\text{O}_2$. Завишената активност на ензима отчасти е отговорна и за значително повишените ендегенни концентрации на H_2O_2 (фиг. 9A).

Окислителното модифициране на белтъците вероятно е причина и за инхибицията в активността на каталазата, наблюдавана при третираните с 50 μM еозин на светло растения (фиг. 16A). CAT не изисква наличието на редуциращи еквиваленти, за да обезвреди H_2O_2 , като по този начин стресовите въздействия, повлияващи редокс статуса на клетката не повлияват нейната функция (Willekens et al., 2007). От друга страна е доказано, че салициловата киселина инхибира активността на ензима (Sánchez-Casas' and Klessig, 1994). Това, както и констатацията, че бенгалската роза (близък до еозина фотосенсибилизатор) предизвиква акумулирането на салициловата киселина в грах, при осветяване (Gullner and Dodge, 2000) показва, че е възможно и еозинът да предизвика същия ефект, който от своя страна да обясни занижената CAT - активност. В подкрепа на това твърдение е и фактът, че $^1\text{O}_2$ - зависимата продукция на оксипини в *flu* мутанти на *Arabidopsis* е съпроводено с леко повишение на количеството на салициловата киселина (Ochsenbein et al., 2006).

Каталазата обезврежда високите концентрации на H_2O_2 , докато POX трябва да се справи с онази част от H_2O_2 , която не е била редуцирана от нея (Willekens et al., 1997). Това обяснява значителното активиране на POX, която получихме при опитните варинати на светло (фиг. 17A). Явно POX компенсира липсата на по-висока каталазна активност. CAT-активност се повишава при използване на средната концентрация (10 μM) на еозин (фиг. 16A). Това се потвърждава от направената нативна PAGE (снимка 2), където по-леката изоформа на ензима е със силно увеличен интензитет. Активирането на CAT е нормална реакция на стрес и се наблюдава от много изследователи. Ashraf и Ali (2008) докладват за завишена CAT активност в *B. napus* при засоляване. Подобни са и резултатите за семена от *Picea asperata* при засушаване и висока осветеност (Yang et al., 2008). От друга страна, понижена активност измерват Parida et al. (2004) в листа от *Bruguiera parviflora* при третиране с NaCl. Смята се, че в някои растения намаляването в активността на ензима рефлектира както върху пероксидазите, така и върху SOD и аскорбат-глутатионовия цикъл (Narinasut et al., 2003). Като цяло, активността на каталазата очевидно зависи от много фактори, като спецификата и интензивността на стреса,

фазата на развитие на растението, взаимодействието с другите компоненти на клетъчната защита и др.

До скоро за основна функция на GST-те се приемаше способността им да обезвреждат различни ксенобиотици, катализирайки свързването им с глутатиона и последващото им транспортиране до вакуолата (Dixon et al., 2002; Katerova and Miteva, 2010). Най-общо растенията с по-високи нива на ензима са по-устойчиви на абиотичен стрес. Способността на GST да метаболизира атразина обуславя устойчивостта на царевица към този хербицид (Shimabukuro et al., 1971). По-нови изследвания показват, че GST имат значение, и при вътреклетъчното свързване и стабилизиране на флавоноидите (Mueller et al., 2000). Идеята, че функцията на GST-те не произлиза единствено от способността им да образуват GSH-конюгати, се потвърждава и от изследвания, които доказват, че няколко стрес индуцируеми GST предпазват растенията от оксидативни повреди, функционирайки като глутатион пероксидази (Roxas et al., 1997; Cummins et al., 1999). Повишената експресия на глутатион пероксидазни и GST гени води и до по-висока устойчивост към $^1\text{O}_2$ при *E. coli* (Ledfor et al., 2007). Високите нива на липидните хидропероксиди, които ние отчетохме при вариантите с еозин и осветяване, както и резултатите на Gullner и Dodge (2000) за завишена активност на ензима след третиране на листни дискове от грах с еозин (10-100 μM), при 24 ч. осветяване предполагаха и по-висока GST - активност в нашата моделна система на светло. Отчетеното от нас повишение беше незначително (фиг. 19). В началото на експерименталния период дори регистрирахме понижена GST - активност, при вариантите с 1 и 50 μM багрило. Това до известна степен се припокрива с опитите на същите автори, но с по-високи еозинови концентрации, при които се инхибира активността, не само на GST, но и на APX и GR. Трябва да се отбележи, че ние изследвахме само CDNB свързаната активност на GST. Но не всички изоформи на GST използват CDNB като субстрат (Marrs, 1996). Ние допускаме вероятността да се повишава активността на другите изоформи на ензима (например, в грах се открива GST, използваща канелена к-на като субстрат).

От всички изследвани ензими най-значително повишение в активността е наблюдавано по отношение на GR (фиг. 18A). Увеличението остава стабилно през целия изследван период (фиг. 18). Силното активиране на GR активност ни даде основание да считаме, че това е възможно да бъде резултат от експресията на нови, $^1\text{O}_2$ -индуцируеми изоформи на ензима. За проверка на това предположение беше проведена нативна полиакриламидна електрофореза. Електрофоретичният профил показва наличието на две основни изоформи в контролните и третираните с еозин на тъмно растения (линии 1, 3 на снимка 4). Този резултат съвпада с информацията за съществуването на два гена за GR в грах, кодиращи

хлоропластна/митохондриална (P27456) и цитозолна (Q43621) изоформи. В инфилтрираните на светло растения се наблюдава появата на две нови нискомолекулни ивици (линия 2). Най-вероятно те са $^1\text{O}_2$ - индуцируеми, но тази хипотеза, разбира се, се нуждае от допълнително потвърждение. Завишената GR – активност води и до натрупване на повече NADP^+ , който служи като акцептор на електрони от фотосинтезата. Това променя съотношението $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ и повлиява функцията на другите антиоксидантните ензими, основно от аскорбат - глутатионовия цикъл, както и продукцията на АКФ. Така например редокс статуса на NADH е важен фактор в митохондриалната продукция на АКФ (Møller, 2001). Общо взето, промяната в редокс статуса на NAD(P)H , глутатиона и аскорбата се смята, че има сигнални функции, в условията на стрес (Noctor, 2006).

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящата работа е направен анализ на оксидативните процеси в грах, индуцирани от синглетен кислород генериран от фотоактивното багрило еозин. Изследвани са измененията на ензимните и неензимните компоненти от антиоксидантната защитна система в растенията.

Многобройни са доказателствата за развитието на оксидативни събития в растенията, след генерирането на синглетен кислород. Получените от нас резултати потвърждават известните в литературата факти за деструктивната роля на синглетния кислород, но в същото време повдигат редица въпроси, относно точната функция на някои ендегенни антиоксиданти. Съдейки по получените резултати, първично следствие от въздействието на синглетния кислород са уврежданията в липидите и ДНК, последвани на по-късен етап от окислително модифициране на белтъчните молекули. Възможно е завишените нива на липидни хидропероксиди да инициират промяна в генната експресия на растенията, което е свързано с все по-дискутираната тема за наличието на конкретен $^1\text{O}_2$ - сигнал в клетката. Вероятно в растенията съществува защитен механизъм, предотвратяващ необратимите последствия от оксидативната модификация на белтъчните молекули. Възможно е това да е една от функциите на драстично повишените нива на тиолсъдържащи съединения (в това число и глутатиона), които установихме при всички опитни варианти, третирани с еозин при непрекъснато осветяване. Проведените от нас изследвания при блокиране на синтеза на глутатион показваха, че той не участва директно в *in vivo* детоксификацията на синглетния кислород. Вероятно неговата функция е свързана по-скоро с предаване на общите сигнали за активиране на клетъчната защита, но твърде е възможно да съществува и алтернативен, глутатион независим път за това.

Тетрирането с еозин предизвиква значително повишение в количествата на пролина. Смятаме, че тези изменения представляват

универсален протекторен механизъм към развитието на окислителен стрес, а не са $^1\text{O}_2$ -специфични. За това свидетелстват многобройните публикации, за значително повишени нива на този стресов маркер в условията на различни неблагоприятни въздействия. Като такъв може да бъде тълкувана и силно завишената концентрация на H_2O_2 . Третирането с еозин, при непрекъснато осветяване не води до акумулация на фенолни съединения. Вероятно други антиоксиданти (токоферол и аскорбат) успяват да неутрализират действието на $^1\text{O}_2$ или в клетките отсъства сигнал за активиране на тази част от вторичния метаболизъм.

Продукцията на синглетен кислород активира само част от ензимната антиоксидантна система в грах. Най-значително се повишава активността на POX и GR. Най-вероятно високата пероксидазна активност компенсира инхибирането в активността на CAT. Интересен факт е промяната в изоензимния профил на глутатион редуктазата, където установихме появата на две нови нискомолекулни изоформи при растенията, третирани с еозин и подложени на непрекъснато осветяване. Вероятно това е свързано и с факта, че увеличението в активността на ензима остава стабилно през целия изследван период. Останалите ензими - GST и SOD не показаха съществено изменение. Твърде е възможно свръхгенерирането на $^1\text{O}_2$ да модифицира ензимните молекули (CAT и SOD) и/или в клетката да се продуцира сигнал, повлияващ функцията и синтеза им посредством все още неидентифициран вторичен посредник.

Измененията в изследваните показатели са резултат от светлинно зависимата продукция на синглетен кислород при третиране с еозин. При голяма част от тях установихме ясно изразена зависимост между дозата на приложения фотосенсибилизатор и наблюдаваните ефекти. Третирането на граховите растения със същите концентрации еозин, но без осветление, потвърди липсата на съществени промени в стойностите за всички изследвани показатели, което показва, че наблюдаваните изменения са резултат от свръхпродукцията на синглетен кислород в растителните тъкани. Наблюдаваните изменения в антиоксидантната защитна система в грах се дължат на комбинацията между цитотоксичния ефект на $^1\text{O}_2$ и свързаното с това активиране на различни сигнални пътища в клетките, чиито точен механизъм остава все още неизяснен. Като цяло експериментите показват, че растенията реагират по специфичен начин към свръхпродукцията на синглетен кислород. Уникални черти на тези защитни механизми са поне четири:

- Силно активиране на глутатион редуктазата, съпроводено с промяна в изоензимния спектър;
- Нечувствителност на защитния отговор към намаляване на количествата на глутатиона;

- Отсъствие на промени в ендогенните нива на фенолите, което предполага изключване на вторичния метаболизъм от известните (*in vitro* е доказано обезвреждането на синглетен кислород от феноли) реакции за директна детоксификация на синглетния кислород;
- Някои специфични изменения в динамиката на активностите на CAT, POX, SOD и GST.
- Нашите изследвания водят до заключението, че растенията разполагат с диференциран механизъм за защита както спрямо вида на въздействащия външен стресор, така и в зависимост от типа на продуцираните АКФ. Това открива нови възможности за бъдещи изследвания, които могат да задълбочат разбиранията ни за физиологията на стреса и да доведат до подобряване на устойчивостта на растенията към неблагоприятните фактори на околната среда.

VII. ИЗВОДИ

Обобщавайки резултатите от нашите изследвания могат да бъдат направени следните по-важни изводи:

1. Инкубирането с фотоактивното багрило еозин, при непрекъснато осветяване, инхибира растежа на граховите растения с ясно изразена концентрационна зависимост и последващо развитие на хлорози и некрози в края на експерименталния период от 48 часа. Ефектите, предизвикани от третирането с еозин, не се проявяват при растенията, развиващи се на тъмно. Това е доказателство, че негативното въздействие се дължи на провокираната при осветяване свръхпродукция на синглетен кислород от фотоактивното багрило.

2. Еозинът, приложен при непрекъснато осветяване, предизвиква понижение в максималния квантов добив на първичната фотохимична реакция на ФС2 и не го повлиява на тъмно.

3. Третирането с еозин при непрекъснато осветяване предизвиква значително увеличение в съдържанието на липидни хидропероксиди, малондиалдехид, количеството на отделените електролити, карбонилното съдържание на белтъците, скъсванията в ДНК, което е индикация за развитието на оксидативни увреждания. Първоначална мишена на генерирания от еозина синглетен кислород са ненаситените мастни киселини, което се изразява в изключително бързо, изпреварващо промените в другите стресови маркери, повишение в нивата на липидните хидропероксиди.

4. Еозин-свързаната продукция на синглетен кислород води до акумулация на водороден пероксид, пролин, свободни нискомолекулни тиолови групи и глутатион и не оказва съществено влияние върху количеството на общите феноли. При повечето от анализите се наблюдава

ясно изразена зависимост доза-ефект между фотосенсибилизатора и ендегенните концентрации на изследваните показатели.

5. Приложен в ниски и средни концентрации, еозинът понижава количеството окислен глутатион. Обратно, високата доза еозин (50 μM) увеличава силно изследвания показател и ефектът корелира със силните увреждания на растенията.

6. Блокирането на глутатионовия биосинтез посредством инхибитора BSO, води до многократно намаляване на съдържанието му. Количествената редукция на глутатиона не променя устойчивостта на растенията към третирането с еозин, което показва, че той не е решаващият фактор в защитата клетките от синглетен кислород.

7. Въздействието с еозин увеличава активността на ензимите гваякол пероксидаза и глутатион редуктаза и не повлиява съществено супероксиддисмутаза и глутатион-S-трансферазата. Промените при каталазата зависят от приложената концентрация на багрилото и продължителността на въздействието.

8. *In vivo* продукцията на $^1\text{O}_2$ индуцира появата на две нови изоформи на GR и не повлиява изоензимния профил на SOD.

Справка за научните приноси на дисертационния труд

- Създадена е оригинална моделна система за изследване на ефектите от фотоактивно генериран синглетен кислород в интактни грахови растения.
- Посредством инхибиторен анализ с блокатора на γ -глутамилцистеин синтетазата - BSO е отхвърлена директната защитна функция на глутатиона в условията на *in vivo* продукция на синглетен кислород в грах.
- Адаптирана е методиката за изследване на ДНК уврежданията (COMET assay) към растения.
- Показана е ясно изразена зависимост доза-ефект и времева последователност при оксидативните увреждания, предизвикани от синглетен кислород. Експериментално потвърдено е, че негова първична мишена в клетките са ненаситените мастни киселини и ДНК.
- Отхвърлена е хипотезата за защитно действие на фенолните съединения срещу синглетен кислород в *in vivo* условия.
- Доказано е, че свръхпродукцията на синглетен кислород в грах индуцира две нови изоформи на глутатион редуктазата.

Списък на публикациите по темата на дисертацията

ИВАНОВА Е., С. ИВАНОВ, 2006. СИНГЛЕТЕН КИСЛОРОД В РАСТЕНИЯТА-ОБРАЗУВАНЕ, ДЕТОКСИФИКАЦИЯ И ФИЗИОЛОГИЧНИ ФУНКЦИИ. (ОБЗОР), РАСТЕНИЕВЪДНИ НАУКИ, 43: 99-108.

ШОПОВА Е., V. ALEXIEVA, S. IVANOV, 2010. GLUTATHIONE INVOLVED IN STRESS RESPONSE DOES NOT DETERMINE THE RESISTANCE AGAINST SINGLET OXYGEN IN PEA (*PISUM SATIVUM* L.) PLANTS. OXID. COMMUN. 4: 948-956.

PEYCHEVA E., **E. IVANOVA**, S. IVANOV, G. MILOSHEV, 2011. IMPROVED PROCEDURE FOR COMET ASSAY ON ACTIVE PHOTOSYNTHETIC CELLS FROM PEA PLANTS. OXID. COMMUN. (IN PRESS).

Участия в научни конференции по темата на дисертацията

IVANOVA E., S. IVANOV, G. MILOSHEV, E. PEYCHEVA AND V. ALEXIEVA, CHARACTERIZATION OF SINGLET OXYGEN INDUCIBLE OXIDATIVE DAMAGE AND RESPONSE OF ANTIOXIDANT DEFENSE IN INTACT PEA PLANTS, XV CONGRESS FESPB, 17-21 JULE 2006, LYON, FRANCE.