

РОЛЬ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ И ЛЦО-ПОДОБНОЙ ГЛИКОЛАТОКСИДАЗЫ В АДАПТИВНОЙ РЕАКЦИИ КЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА В РАСТЕНИЯХ ПРИ ЗАТОПЛЕНИИ ИХ КОРНЕВОЙ СИСТЕМЫ

Н.Р. Комарова, Т.В. Сорокина, М.И. Фалалеева, А.Т. Епринцев

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, bc366@bio.vsu.ru

Аннотация. Изучена динамика изменения активности ферментов лактатдегидрогеназы и L-лактат-цитохром-с-подобной гликолатоксидазы в листьях устойчивого к дефициту кислорода сорго и неустойчивого к гипоксии гороха, культивируемых в условиях затопления. На основании анализа полученных результатов предлагается механизм адаптивной реакции клеточного метаболизма с участием ферментов ЛДГ и ЛЦО-подобной гликолатоксидазы, замедляющих закисление цитоплазмы, в корнях у сорго и гороха при их затоплении.

Ключевые слова: лактадегидрогеназа, L-лактат-цитохром-с-подобная гликолатоксидаза, гипоксия, адаптация

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-423-426

Гипоксия – патологическое состояние, наступающее при недостаточном снабжении тканей кислородом или нарушении его утилизации в процессе биологического окисления [Новиков, 2002]. При затоплении или заболачивании почвы воздух вытесняется из нее водой. Диффузия же его в воде происходит примерно в 104 раза медленнее, чем в газовой среде. Поэтому особенность местообитания затопляемых растений состоит в выраженной в той или иной степени гипоксии или даже аноксии. В то же время, у разных по устойчивости к гипо- и аноксии растений (или их органов) могут быть неодинаковые потребности в кислороде [Чиркова, 2002].

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) – внутриклеточный гликолитический фермент, который участвует в обратимом превращении лактата в пируват и одним из первых активируется в ответ на гипоксию. Фермент гликолатоксидаза относится к флавиновым оксидазам, который в качестве кофермента содержит флавиномононуклеотид и переносит электроны с субстрата непосредственно на молекулярный кислород с образованием пероксида водорода. При этом ГО окисляет гликолиевую кислоту с образованием глиоксалиевой кислоты и пероксида водорода, который в присутствии каталазы расщепляется на водород и кислород, окисляя ряд других веществ (этиловый спирт, лактат, нитриты, и д.р.) [Скурихин, 1991]. Известно, что у растений *Arabidopsis thaliana* [Engqvist, 2015] обнаружены три изоформы гликолатоксидазы, предпочтительным субстратом одной из которых является лактат. В работе Engqvist исследователи предполагают инициацию исследуемого фермента при выходе растений из гипоксии, когда большие порции кислорода являются опасными для перешедшего на бескислородный метаболизм лактата растения. На основании этих данных мы предполагаем взаимосвязь в работе исследуемых ферментов, у растений, находящихся в условиях гипоксии, когда лактат утилизируется лактатдегидрогеназой в бескислородных условиях и ЛЦО-подобной гликолатоксидазой – в кислородных.

Растительный материал. В качестве объекта исследований использовали листья 40-дневных растений гороха и сорго (*Pisum sativum* L., сорт Амброзия и *Sorghum sudanense* L., сорт Воронежское соответственно), инкубированных 4 суток в камере для роста растений LabTech в контролируемых условиях: 12/12 ч свет/темнота, при температуре 25°C погруженными в воду на 2-3 см выше корневой шейки, для имитации

словий дефицита кислорода (опыт). Контрольная часть растений оставалась при нормальном увлажнении [Комарова, 2017].

Приготовление гомогената и ферментативных экстрактов. Исследуемые листья гомогенизировали в охлажденном 50 мМ Tris-HCl-буфере, pH 7.4, содержащем 2М KCl и 1 мМ MgCl₂. Гомогенаты центрифугировали при 5000 g в течение 15 мин на центрифуге “Eppendorf 5804” (Германия).

Спектрофотометрическое измерение активности ферментов. Активность ферментов измеряли спектрофотометрически, при 340 нм на спектрофотометре ЛОМО СФ-56 (Россия) по скорости окисления NADH для ЛДГ (КФ 1.1.1.27). Реакционная среда состояла из 2 мл 50 мМ Tris-HCl-буфера (pH 8.0), 0.06 мМ NADH, 1 мМ пирувата натрия. Реакцию запускали добавлением пирувата натрия [Sweetlove, 2000]. Для измерения активности ЛЦО-подобной ГО реакционная среда содержала 2 мл 50 мМ Tris-HCl-буфера, (pH 7.5), 4 мМ лактат натрия/гликолат натрия, 0.5 мМ ЭДТА, 0.01 мМ флавинмоноклеотид, 5 мМ MgCl₂ и 4 мМ фенилгидразин. Реакцию инициировали внесением ферментного препарата. Об активности ЛЦО-подобной ГО судили по увеличению поглощения при 324 нм, обусловленному образованием комплекса глиоксилата (продукта реакции) с фенилгидразином [Engqvist, 2015].

В листьях гороха и сорго активность фермента ЛДГ и ЛЦО-подобной гликолатоксидазы в контрольных вариантах оставалась практически неизменной относительно исходной точки на протяжении всего эксперимента. В условиях гипоксии, в течение всего времени эксперимента, наблюдалась активация ферментов ЛДГ и ЛЦО-подобной гликолатоксидазы. В листьях обоих растений активность ЛДГ превышала контрольные показатели на протяжении всего эксперимента и достигла максимума уже спустя одни сутки: до 8 раз для растений гороха и до 4 раз – для сорго относительно контрольных образцов (рис. 1). Также, для растений гороха активность ЛДГ, по-сравнению с растениями, сорго оставалась более высокой на протяжении всего эксперимента.

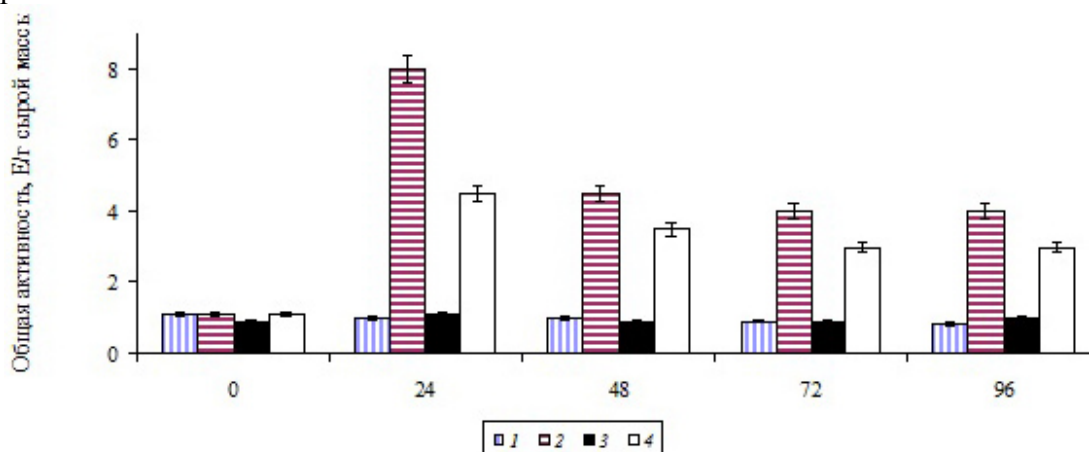


Рис. 1. Динамика активности ЛДГ в листьях гороха и сорго: 1 – контрольные образцы листьев гороха, 2 – опытные образцы листьев гороха, 3 – контрольные образцы листьев сорго, 4 – опытные образцы листьев сорго.

Несколько иная картина наблюдалась в работе фермента ЛЦО-подобной гликолатоксидазы. Активность его в листьях гороха в целом имела те же тенденции, что и для ЛДГ, хотя максимум его работы проявлялся только на вторые сутки и превышал контрольные показатели в 3 раза (рис. 2), а в листьях сорго уже спустя 24 часа произошла активация фермента и показатели его работы превысили контрольные значения в 16 раз, сохраняя свои высокие значения до окончания эксперимента.

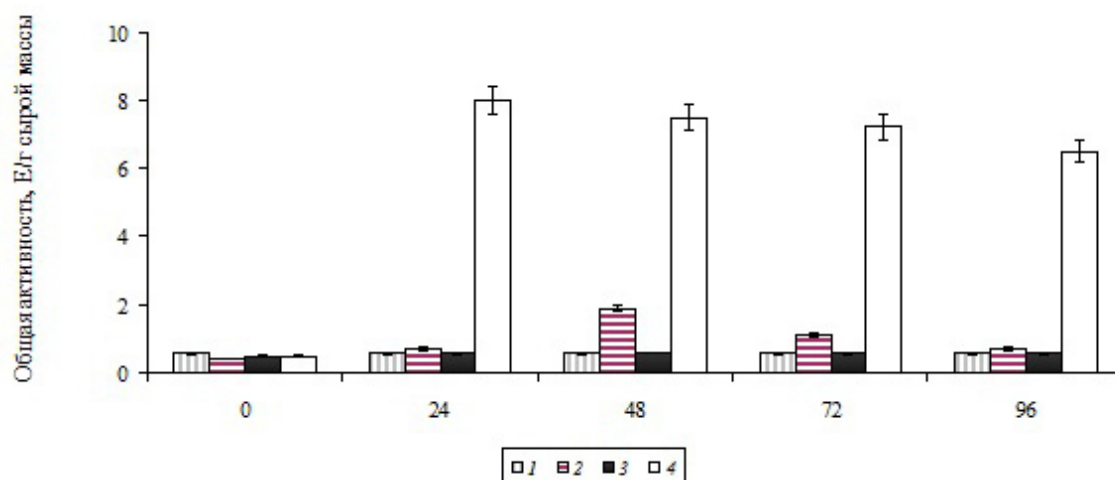


Рис. 2. Динамика активности ЛЦО-подобной гликолатоксидазы в листьях гороха и сорго: 1 - контрольные образцы листьев гороха, 2 – опытные образцы листьев гороха, 3 – контрольные образцы листьев сорго, 4 – опытные образцы листьев сорго.

Таким образом, в результате проведенных исследований можно предположить, что при гипоксии, накапливающийся в клетках лактат, стимулирует работу ЛДГ, утилизирующей молочную кислоту губительную для клеток. Активность ЛЦО-подобной гликолатоксидазы индуцируется в момент перехода растений от гипоксии к условиям достаточного кислородного насыщения, обеспечивая защиту клетки. Высокие показатели работы данного фермента, как мы полагаем, могут объяснить устойчивость растений сорго, ввиду более эффективной работы обоих адаптационных механизмов, обуславливающих выживание растений в стрессовых условиях.

Литература

- Комарова Н.Р., Морозова Ю.А., Сорокина Т.В., Фалалеева М.И., Епринцев А.Т. Динамика изменения активности ключевых ферментов метаболизма пирувата в листьях гороха и сорго // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: ВГУ. Межрег. сб. науч. работ. - 2017г. - Выпуск 19. - С.120–125.
- Новиков В.Е., Катунина Н.П. Фармакология и биохимия гипоксии (Обзор) // Гос. Мед. академия, Смоленск; Гос. Ун-т, Брянск. - 2002. - Т. 1. № 2. - С. 73–87.
- Скурихин И.М., Нечаев А.П. Все о пище с точки зрения химика. - М.: Высшая шк., 1991. - С. 130–132.
- Чиркова Т.В. Физиологические основы устойчивости растений. - СПб.: Изд-во СПб. ун-та, 2002. - С. 34-35.
- Engqvist M., Schmitz J., Gertzmann A., Florian A., Jaspert N., Arif M., Balazadeh S., Mueller-Roeber B., Fernie A.R., Maurino V.G. Glycolate oxidase3, a glycolate oxidase homolog of yeast L-lactate cytochrome c oxidoreductase, supports L-lactate oxidation in roots of Arabidopsis // Plant Physiol. - 2015. - V. 169. - P. 1042–1061.
- Sweetlove L.J., Dunford R., Ratcliffe R.G., Kruger N.J. Lactate metabolism in potato tubers deficient in lactate dehydrogenase activity // Plant Cell Environ. - 2000. - V. 23. - P. 873–881.

**THE ROLE OF LACTAT DEHYDROGENASE AND LCO-LIKE GLYCOLATE OXIDASE
IN THE ADAPTIVE REACTION OF CELLULAR METABOLISM IN PLANTS
DURING FLOODING OF THEIR ROOT SYSTEM**

N.R. Komarova, T.V. Sorokina, M.I. Falaleeva, A.T. Eprintsev

Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, *bc366@bio.vsu.ru*

Abstract. The dynamics of changes in the activity of lactate dehydrogenase enzymes and L-lactate-cytochrome c-like glycolate oxidase in leaves resistant to oxygen deficiency sorghum and unstable to hypoxia pea cultivated under flood conditions was studied. Based on the results of the analysis, a mechanism is proposed for the adaptive response of the cellular metabolism involving the enzymes LDH and LCO-like glycolate oxidase, which slow down the acidification of the cytoplasm, in the roots of sorghum and pea during flooding.

Keywords: *lactate dehydrogenase, L-lactate-cytochrome-c-like glycolate oxidase, hypoxia, adaptation*