

Н. И. ПРОСКУРЯКОВ и И. М. МОСОЛОВА

ДИНАМИКА ГЛЮТАТИОНА ПРИ ПРОРАСТАНИИ ГОРОХА

(Представлено академиком А. И. Опариным 30 IX 1952)

В клеточном обмене веществ сульфгидрильные соединения оказывают непосредственное влияние на самые разнообразные ферментативные реакции. Среди этих соединений особенно много внимания уделяется глутатиону, являющемуся важнейшим регулятором окислительно-восстановительного режима клетки. Восстановленный глутатион активирует целый ряд ферментов, участвующих в обмене углеводов, белков и жиров в организмах. Важна также роль глутатиона в качестве кофермента глиоксалазы, широко распространенной в объектах растительного и животного происхождения. Весьма существенно значение глутатиона в недавно открытых реакциях транспептидирования, в которых под влиянием ферментов происходит взаимодействие между свободными аминокислотами и глутатионом (1).

Однако, несмотря на многочисленные указания на большую значимость глутатиона в процессах жизнедеятельности клетки, в литературе почти отсутствуют данные о количественном содержании, распределении и динамике собственно глутатиона в растительных тканях, хотя имеются работы по сульфгидрильным соединениям вообще (2). В то же время известны хорошо разработанные методы препаративного получения глутатиона из дрожжей (3), зародышей злаков, гороховой муки и т. д.

В настоящей работе приводятся данные по исследованию динамики глутатиона, наряду с учетом и суммарного количества сульфгидрильных соединений, в процессе вегетации у гороха.

Собственно глутатион определялся количественным глиоксалазным методом, являющимся исключительно специфичным (4). Метод основан на превращении метилглиоксала в молочную кислоту при действии глиоксалазы в присутствии глутатиона как кофермента данной реакции. Метилглиоксаль определялся объемным путем при помощи бисульфитного способа. Источником апоэнзима глиоксалазы служили ацетоновые дрожжи, из которых предварительно удалялся глутатион. Глиоксалазная реакция велась в трубках Тунберга с азотом, согласно модификации Г. А. Шамшиковой и А. Л. Иоффе (5). В связи с тем, что глиоксалазный способ применим только в присутствии восстановленного глутатиона и для определения общего количества тиосоединений иодометрическим путем также необходимо восстановить окисленные (S—S)-группы, было использовано электролитическое восстановление по Дохан и Вудворду (6).

Объектом исследования служили семена гороха Штамбового оливкового, урожая 1948 г. с всхожестью 97%, полученные от Грибовской овощной опытной станции. Семядоли и семенные ростки исследовались отдельно в сухом и пророщенном состоянии.

Навески материала растирались с 2% сульфосалициловой кислотой, и суспензии центрифугировались. В одной части центрифугатов опреде-

лялись непосредственно иодредуцирующие вещества титрованием с 0,001 N KJO₃, а другая часть подвергалась электровосстановлению, после которого в растворе определялись тем же путем суммарные количества SH-соединений и в отдельной пробе собственно глутатион. В пророщенном материале полученные описанным образом растворы предварительно обрабатывались краской Тильманса для освобождения от аскорбиновой кислоты.

С целью сравнения результатов определения общего количества иодредуцирующих веществ по иодометрическому методу с содержанием собственно глутатиона, число миллиграмм последнего умножалось на коэффициент 3,26, что позволило выразить глутатион в миллилитрах 0,001 N KJO₃.

Все расчеты велись на 1 г сухого вещества; цифры — средние из 2—3 определений. В табл. 1 представлены изменения суммарного количества иодредуцирующих веществ и собственно глутатиона в семядолях и зародышах гороха в процессе его прорастания.

Таблица 1

Содержание иодредуцирующих веществ и глутатиона в семядолях и семенных ростках гороха различных стадий прорастания

	0,001 N KJO ₃			Глутатион в мг/г
	без восстановления	с восстановлением	в пересчете на глутатион в мг/г	

Семядоли

Исходные	2,73	7,89	7,60	2,33
После 24 час. замачивания . . .	5,87	8,74	7,70	2,36
После 48 час. замачивания . . .	5,74	8,61	7,70	2,36
После 72 час. замачивания . . .	5,80	8,61	7,53	2,31
После 8-дневного прорастания . . .	4,50	8,02	6,23	2,22
После 21-дневного прорастания . . .	4,24	6,98	4,59	1,41

Семенные ростки

После 24 час. замачивания . . .	11,18	18,61	14,24	4,37
После 48 час. замачивания . . .	14,15	21,54	17,05	5,23
После 72 час. замачивания . . .	16,39	25,49	20,66	6,34
После 8-дневного прорастания . . .	18,23	32,46	28,13	8,63
После 10-дневного прорастания . . .	17,68	31,84	27,38	8,40

Из табл. 1 видно, что количество глутатиона в семядолях оставалось почти неизменным на протяжении 8 дней прорастания, но заметно падало к 21-му дню. В исходных семядолях иодредуцирующие вещества представлены исключительно глутатионом. Следует отметить, что в семядолях после замачивания глутатион оставался на одинаковом уровне, а количество иодредуцирующих веществ, определенных иодометрически без предварительного восстановления, увеличилось почти вдвое. Это увеличение может быть объяснено действием протеолитических ферментов, начинающимся при замачивании семян.

В семенных ростках гороха (табл. 1) при прорастании наблюдалось значительное увеличение содержания глутатиона, примерно в 2 раза, с максимумом к 8-му дню. Как и в опытах с семядолями, количество глутатиона, определенное глиоксалазным методом, не соответствовало всему количеству иодредуцирующих веществ, присутствовавших в семенных ростках. Видно также, что иодометрическое титрование без электровосстановления дало значительно более низкие величины, что, повидимому, можно объяснить присутствием цистеина, способствовавшего окислению восстановленного глутатиона в ходе опытов, согласно указаниям Шамшиковой и Иоффе. Наличие цистеина в ростках гороха в действительности было обнаружено Лауренсом (7).

Динамика глутатиона была прослежена и на более поздних стадиях

развития, но уже целиком в надземной части гороха — листьях вместе со стеблями. При этом было обнаружено постепенное падение содержания глутатиона: с 5,62 мг на 1 г сухого вещества на 13-й день до 3,82 мг на 21-й день. Однако, если учесть, что за этот период наблюдалось резкое увеличение всей массы гороха (в 2—3 раза), то едва ли можно говорить об уменьшении общего количества глутатиона в надземной части гороха за указанный срок. В отношении же иодометрического титрования в данных опытах, как и в предыдущих, тоже наблюдалось несоответствие с количеством собственно глутатиона.

Поскольку в литературе совершенно отсутствуют данные по распределению глутатиона в вегетативных органах растений, нами были проведены соответствующие определения в листьях, корнях, стеблях и оставшихся семядолях гороха 21-дневного возраста.

Данные табл. 2 показывают, что наибольшее и примерно одинаковое содержание глутатиона было найдено в листьях и стеблях гороха. Корням свойственно минимальное количество глутатиона. В семядолях, несмотря на значительное израсходование ими запасных веществ, глутатион все же обнаруживался. В результатах, полученных при помощи иодометрии, даже без восстановления, содержание собственно глутатиона заметно превышено (за исключением семядолей), что лишний раз подчеркивает необходимость применения специфичного глиоксалазного метода для определения действительного содержания глутатиона в растительном материале.

Что касается весьма интересного и еще полностью не разрешенного вопроса о возможных путях биосинтеза глутатиона, то в настоящее время существует, как известно, два взгляда: по мнению одних авторов, глутатион образуется путем отщепления его от белковой молекулы или сложных пептидов⁽⁸⁾, другие же считают, что он синтезируется заново из составляющих его

Таблица 2
Содержание глутатиона в различных органах 21-дневного гороха (в мг/г сух. веш.)

Орган	Глутатион
Лист	3,85
Стебель	3,82
Корень	0,47
Семядоли	1,41

Таблица 3

Изменения сульфгидрильных соединений при автолизе гороха

Сроки настаивания в час.	0,001 N KJO ₄			Глутатион в мг/г
	без восстановления	с восстановлением	в пересчете на глутатион в мг/г	
	в мл на 1 г возд.-сух. веш.			
0	2,52	7,12	6,87	2,11
1,5	6,75	8,62	7,56	2,32
3	6,75	8,62	7,56	2,32
6	7,12	8,62	7,56	2,32

показали, что количество глутатиона при автолизе гороховой муки не возрастало, что свидетельствует не в пользу признания указанной точки зрения на образование глутатиона при протеолизе. В то же время следует отметить, что в приведенных опытах имело место значительное накопление аминного азота, поскольку выбранные условия благоприятствовали усиленному протеолизу. В целом полученные данные довольно близко напоминали собой изменения в содержании иодоредущих веществ и собственно глутатиона в семядолях гороха на ранних стадиях его прорастания.

аминокислот⁽⁹⁾. Выделены также и ферментные системы, участвующие в синтезе и гидролизе глутатиона⁽¹⁰⁾.

Для проверки первой точки зрения, хотя и менее вероятной, чем вторая, нами были поставлены опыты с автолизом гороховой муки в анаэробных условиях.

Результаты опытов, приведенные в табл. 3,

Вторая точка зрения уже имеет к настоящему времени экспериментальное подтверждение в области биохимии животных, свидетельствующее об энзиматическом образовании глутатиона из составляющих его аминокислот в определенных условиях⁽⁹⁾. Что касается растительных объектов, то здесь до сих пор не имеется соответствующих данных.

Поставленные нами опыты с животными тканями по методике, предложенной Браунштейном, Шамшиковой и Иоффе, обнаружили быстрый синтез глутатиона из составляющих его аминокислот в переживающих срезах печени крысы в аэробных условиях. После подробной проверки данная методика была использована нами на растительном материале, но при помощи вакуум-инfiltrации. Опыты по инфiltrации в листья гороха цистеина, глутаминовой кислоты и гликоколла, несмотря на применение различных условий (изменение концентрации аминокислот, длительности экспозиции и др.), не привели пока к положительным результатам. Однако, несмотря на это, означенный путь кажется нам наиболее перспективным для осуществления синтеза пептидных связей при новообразовании глутатиона из его компонентов для растительных объектов.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
26 IX 1952

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ C. Hanes, F. Hird, F. Isherwood, *Nature*, **166**, 288 (1950). ² Н. И. Проскуряков, *Биохимия хлебопечения*, сборн. 1, 61 (1938); В. Л. Кретович, А. А. Бундель, Т. В. Дроздова, *Биохимия*, **13**, 332 (1948). ³ А. Н. Белозерский, Н. И. Проскуряков, *Практическое руководство по биохимии растений*, 1951. ⁴ E. Schroeder, G. Woodward, *J. Biol. Chem.*, **129**, 283 (1939). ⁵ Г. А. Шамшикова, А. Л. Иоффе, *Биохимия*, **12**, 437 (1947). ⁶ J. Dohan, G. Woodward, *J. Biol. Chem.*, **129**, 393 (1939). ⁷ J. Lawrence, *Arch. Biochem.*, **27**, 1 (1950). ⁸ L. Binet, G. Weller, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **16**, 1284 (1934); **18**, 358 (1936). ⁹ А. Е. Браунштейн, Г. А. Шамшикова, А. Л. Иоффе, *Биохимия*, **13**, 95 (1948). ¹⁰ R. Johnston, *J. Biol. Chem.*, **188**, 221 (1951).