

DOI: 10.12731/2658-6649-2021-13-3-225-243

УДК 581.19:577.152.2

## СИСТЕМА ГЛУТАТИОНА КАК МЕХАНИЗМ ДЕТОКСИКАЦИИ ГЕРБИЦИДОВ У ВАКУОЛЕЙ И ПЛАСТИД КЛЕТОК КОРНЕПЛОДОВ СТОЛОВОЙ СВЕКЛЫ

*Е.В. Прадедова, Р.К. Саляев*

*Синтетические соединения, используемые в растениеводстве, представляют собой ксенобиотики, которые, попадая в растения, могут отрицательно влиять на функционирование клеток. Внутри клеток, они подвергаются (или в случае ослабления защитных механизмов не подвергаются) химической трансформации и транспортируются в вакуоли. Избыточное накопление ксенобиотиков в вакуолях, по всей видимости, является следствием нарушения их химической трансформации и деградации в других субклеточных структурах. В связи с этим системы детоксикации ксенобиотиков в вакуолях и других компартментах растительной клетки заслуживают пристального внимания.*

**Цель работы.** Следовало установить, может ли система глутатиона в таких органеллах, как вакуоли и пластиды, служить одним из механизмов детоксикации гербицидов.

**Материалы и методы.** Проводили сравнительное исследование системы глутатиона у вакуолей и лейкопластов, изолированных из клеток корнеплодов столовой свеклы (*Beta vulgaris L.*). Методы спектрофотометрического анализа и гель-электрофореза применяли, чтобы определить содержание глутатиона, активность глутатион-S-трансферазы (GST, КФ 2.5.1.18) и глутатионредуктазы (GR, КФ 1.8.1.7).

**Результаты.** Количество глутатиона было выше в вакуолях, по сравнению с лейкопластами. Активность GST у вакуолей также была выше. Ферменты из семейства GST, катализирующие реакции конъюгации глутатиона с различными соединениями, имеют непосредственное отношение к детоксикации метаболитов и ксенобиотиков. GSTs вакуолей и пластид взаимодействовали с гербицидами (глифосатом, фтородифеном и клопиралидом), что свидетельствовало об участии этих ферментов в детоксикации экзогенных токсичных соединений. Поддерживает пул глутатиона в восстановленном состоянии GR. Активность этого фермента в лейкопластах оказалась на-

много выше, по сравнению с вакуолями. GRs вакуолей и пластид отличались стабильностью, в условиях *in vitro* их активность не подавляли используемые в работе гербициды.

**Заключение.** На основании полученных данных можно предположить, что глутатион, аккумулируемый вакуолями, так же как глутатион пластид, вовлечен в процессы детоксикации, которые протекают в этих субклеточных компартментах. Дальнейшее всестороннее изучение субклеточных механизмов обезвреживания цитотоксичных соединений расширит представление о детоксикационных процессах у растительного организма.

**Ключевые слова:** *Beta vulgaris* L.; вакуоли; гербициды; глутатион; глутатионредуктаза; глутатион-S-трансферазы; детоксикация; пластыды

**Для цитирования.** Прадедова Е.В., Салыев Р.К. Система глутатиона как механизм детоксикации гербицидов у вакуолей и пластид клеток корнеплодов столовой свеклы // *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*. 2021. Т. 13, № 3. С. 225-243. DOI: 10.12731/2658-6649-2021-13-3-225-243

## GLUTATHIONE SYSTEM IS A DETOXIFICATION MECHANISM OF HERBICIDES IN VACUOLES AND PLASTIDS OF RED BEETROOT CELLS

*E.V. Pradedova, R.K. Salyaev*

*The synthetic compounds used in agriculture are xenobiotics, which entering the plants can negatively affect the functioning of plant cells. In cells, xenobiotics undergo (or, if the defense mechanisms are deficient, do not undergo) chemical changes, they are then transported to vacuoles.*

**Background.** *The excess accumulation of xenobiotics inside vacuoles appears to be the result of impaired conversion and degradation of these compounds in other subcellular structures. In this regard, the detoxification systems of vacuoles and other subcellular compartments deserve close attention when studying the mechanisms of disposal harmful substances in the plant cells.*

**Purpose.** *In the present paper, the glutathione system of organelles, of such as vacuoles and plastids, was considered as one of the mechanisms for detoxifying herbicides.*

**Materials and methods.** *The glutathione system in the vacuoles compared to those in leucoplasts have been studied. Organelles were isolated from cells of red beet (*Beta vulgaris* L.) taproots. Spectrophotometric analysis and gel electrophore-*

sis have been applied to assess the glutathione content and the activity of glutathione S-transferase (GST, EC 2.5.1.18) and glutathione reductase (GR, EC 1.8.1.7).

**Results.** The concentration of the glutathione in vacuoles was higher in comparison to that in the leucoplasts. The activity of GST in the vacuoles has been assessed to be quite high compared to that of leucoplasts. The enzymes of GST-family, which catalyze the conjugation of GSH to various compounds, were directly related to the detoxification of cytotoxic metabolites and xenobiotics. GSTs of vacuoles and plastids reacted with herbicides (glyphosate, clopyralid, fluorodifen), what gave evidence of the fact of participation of these enzymes in the process of detoxification of exogenous harmful compounds. One of the mechanisms for the reduction of glutathione inside the vacuoles and plastids can be associated with GR. The activity of GR in the leucoplasts has been assessed to be quite high compared to that of vacuoles. The GRs of vacuoles and plastids were found to be stable enzymes; the studies *in vitro* gave the evidence that their activities were not suppressed by the herbicides used in the experiments.

**Conclusion.** Collectively, our findings suggest the idea that the glutathione accumulated by vacuoles, like the glutathione accumulated by plastids, seems to contribute to the detoxification, which can take place in these compartments. A comprehensive study of the subcellular mechanisms of neutralization of damaging substances will expand the understanding of the detoxification in plants.

**Keywords:** *Beta vulgaris* L.; glutathione; glutathione S-transferase; glutathione reductase; herbicide; plastids; vacuoles

**For citation.** Pradedova E.V., Salyaev R.K. Glutathione System is a Detoxification Mechanism of Herbicides in Vacuoles and Plastids of Red Beetroot Cells. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*, 2021, vol. 13, no. 3, pp. 225-243. DOI: 10.12731/2658-6649-2021-13-3-225-243

## Введение

Устойчивость растений к действию цитотоксичных соединений обусловлена эффективностью процессов детоксикации, которые объединяют биотрансформацию, деградацию и выведение преобразованных соединений из клеток [8]. Следует отметить, что соединения, обладающие цитотоксическими свойствами, выводятся из клеток растений в апопласт или секвестрируются внутри клеток в центральной вакуоли [23]. Есть все основания полагать, что именно центральная вакуоль вносит существенный вклад в защиту растительной клетки от пагубного действия повреждающих соединений. В связи с этим она должна обладать механизмами, предназначенными для их детоксикации и утилизации [17].

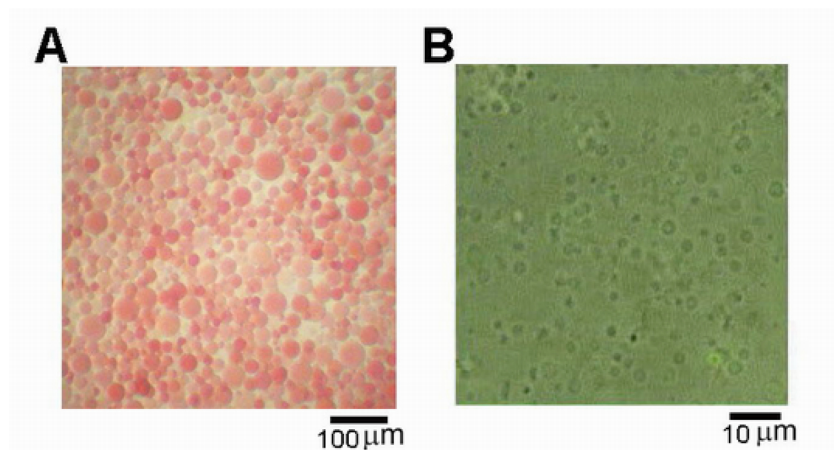
Среди разнообразных механизмов детоксикации особое внимание заслуживает глутатионилирование (конъюгация с молекулой глутатиона) электрофильных гидрофобных метаболитов и ксенобиотиков. Этот механизм имеет непосредственное отношение к окислительно-восстановительной системе глутатиона, которая включает восстановленную (GSH) и окисленную (GSSG) формы глутатиона, а также глутатион-зависимые ферменты (глутатион-S-трансферазы, глутатионпероксидазу, глутатионредуктазу и др.) [17, 18, 20]. Редокс-система глутатиона относительно хорошо охарактеризована у пластид [18, 20]. В то же время, только единичные факты указывали на возможное функционирование этой системы в вакуолях растительных клеток [6, 18, 20]. В связи с этим исследование системы глутатиона в вакуолях, особенно в качестве механизма детоксикации, представлялось актуальным и целесообразным. Чтобы понять насколько велика роль вакуолярной системы глутатиона в защите клеток от цитотоксичных соединений, следовало провести сравнительный анализ этой системы у вакуолей и пластид, так как у последних эта система достаточно хорошо изучена. Таким образом, основными объектами исследования в настоящей работе служили вакуоли и пластиды, которые изолировали из клеток корнеплодов столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.). В рамках решаемых задач внимание уделялось: 1) содержанию и редокс-состоянию глутатиона в вакуолях и пластидах; 2) активности глутатион-S-трансфераз (GSTs, КФ 2.5.1.18) и их субстратной специфичности по отношению к гербицидам (фтородифену, клопиралиду и глифосату); 3) активности глутатионредуктазы (GR, КФ 1.8.1.7) и влиянию указанных гербицидов на эту активность в условиях *in vitro*.

### **Материалы и методы исследования**

Объектом исследования служили корнеплоды столовой свеклы в период их физиологического покоя. Из корнеплодов выделяли вакуоли с помощью макрообъемного модифицированного метода [2]. Пластиды (лейкопласты) получали согласно общепринятому подходу с некоторой модификацией [4]. Фракции изолированных органелл наблюдали под микроскопом Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия) (Рис. 1).

Содержание глутатиона в изолированных органеллах и экстракте ткани определяли с помощью спектрофотометрического рециклирующего метода с 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислотой (реактив Элмана) с предварительной дегидратацией 2-винилпиридином [11]. Этот метод по-

зволюял определить содержание GSH и GSSG. Концентрацию глутатиона выражали в условных единицах нмоль GSH /мг белка. Белок определяли по методу Bradford.



**Рис. 1.** Фракции вакуолей (А) и лейкопластов (В), получаемые из клеток корнеплодов столовой свеклы.

Активность глутатион-S-трансферазы (GST) и глутатионредуктазы (GR) определяли с помощью общепринятых методов с использованием спектрофотометрии [3, 14, 19].

Электрофоретические методы применяли для выявления активности изоформ ферментов [12]. Активность изоформ GST в полиакриламидном геле (ПААГ) после электрофоретического разделения белков в неденатурирующих условиях (CN-PAGE) визуализировали с разными субстратами: 1) общепринятыми субстратами 1-хлор-2,4-динитробензолом (CDNB, 1 мМ) и этакриновой кислотой (1 мМ); 2) гербицидами фтородифеном (0,5 мМ), клопиралидом (0,5 мМ) и глифосатом (0,5 мМ) [13, 15].

Активность изоформ GR определяли в геле после CN-PAGE и изоэлектрофоретического фокусирования белков (IEF) [12, 13]. GR из пекарских дрожжей (Sigma) служила маркером. После IEF и визуализации активности в ПААГ, белки из гелиевых пластин переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Вестерн-блоттинг) и детектировали изоформы GR, применяя первичные поликлональные антитела мыши против GR пекарских дрожжей и вторичные антитела мыши против IgG, конъюгированные с пероксидазой (Sigma).

Все эксперименты проводили в трех-пяти независимых сериях экспериментов (данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартное отклонение). Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) и апостериорный тест Тьюки использовали для оценки статистически значимых различий между величинами концентраций глутатиона, которые приведены ниже в таблице.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

Преодолевая мембранные барьеры, гидрофобные ксенобиотики, быстро проникают в клетку и ее структуры, нарушая их функции [23]. Существуют разнообразные молекулярные механизмы, переводящие эти соединения в гидрофильное состояние и предотвращающие, таким образом, их беспрепятственное движение сквозь эндомембраны клетки [7]. Субклеточные структуры содержат локальные системы защиты. Некоторые внутриклеточные компартменты могут быть более «приспособленными» к детоксикации, обладая разнообразными механизмами защиты. В растительных клетках такие компартменты не описаны, в отличие от животных клеток, в которых эндоплазматический ретикулум вносит существенный вклад в обезвреживание цитотоксичных соединений посредством многочисленных монооксигеназ с широкой субстратной специфичностью [7, 8]. Однако в растительных клетках защитная роль отводится центральному вакуолям [7]. Одна из основных функций этих структур – аккумуляция и утилизация веществ, выведенных из клеточного метаболизма. Участие вакуолей в детоксикационной защите растительных клеток так или иначе обсуждается в литературных источниках, однако информации о механизмах, осуществляющих эту защиту, по-прежнему крайне мало [24].

Некоторые факты указывали на возможность функционирования редокс-системы глутатиона в вакуолях растительных клеток [7, 18]. Эта система широко известна как система детоксикационной защиты [17, 18, 20]. Однако о вакуолярной системе глутатиона мало сведений [20, 24]. В то же время, эта система относительно хорошо исследована в пластидах многих растений [18]. В связи с этим представлялось целесообразным провести сравнительное исследование этой системы у вакуолей и пластид.

Содержание глутатиона определяли в изолированных органеллах. В вакуолях общего глутатиона ( $GSH_{\text{сум}}$ ), который представлен суммой  $GSH$  и  $GSSG$ , оказалось больше, чем в пластидах (Табл. 1).

Таблица 1.

## Содержание глутатиона в исследуемых органеллах и тканевом экстракте

Редокс-форма и редокс-соотношение глутатиона	Концентрация глутатиона, нмоль GSH / мг белка		
	вакуоли	пластиды	экстракт ткани
GSH	117,7 ± 23,1	69,7 ± 8,3	222,1 ± 28,1
GSSG	17,1 ± 2,5	4,9 ± 1,1	16,1 ± 2,9
GSSG, %	11	6	6
GSH <sub>сум</sub>	151,9 ± 28,1	79,5 ± 10,4	254,3 ± 33,9
GSH/GSSG	6,9	14,1	13,8

Примечание: различия между образцами (вакуоли, пластиды и экстракт ткани) достоверны при  $p < 0,05$ .

Ранее глутатион был обнаружен во всех органах растений, но его количество в значительной степени зависело от вида растения, типа исследуемой ткани, стадии развития и условий произрастания [18]. В тканях корнеплодов столовой свеклы, т.е. в их водных экстрактах, относительная концентрация глутатиона оказалась довольно высокой, по сравнению с тканями других органов у других растений [18]. Это можно объяснить высокой мобилизованностью защитных систем у корнеплодов в период физиологического покоя, который проходит в условиях низких температур и пониженной влажности.

Одним из важных показателей, позволяющим оценить интенсивность окислительных процессов, служит концентрация окисленного глутатиона [18]. Содержание GSSG в вакуолях было заметно выше, его процентное соотношение практически в 2 раза превосходило процентное соотношение GSSG в пластидах (Табл. 1). Из-за относительно низкой концентрации GSSG у пластид величины соотношения GSH/GSSG оказались довольно высокими, что говорило о восстановленном состоянии пула глутатиона. Тогда как вакуоли характеризовались более окисленным состоянием глутатиона.

Глутатиона в образцах становилось меньше, если к ним добавляли гербициды (глифосат, клопиралид и фтородифен). Это было установлено в ходе следующего эксперимента: сначала водные экстракты органелл инкубировали в течение 10 мин с одним из исследуемых гербицидов (10 мкМ); затем определяли свободный глутатион в соответствие с протоколом метода [11]. С гербицидами заметно снижалось содержание GSH<sub>сум</sub>, вследствие снижения GSH, при этом количество GSSG практически не изменялось (данные не приводятся). Однако это приводило к снижению величин GSH/GSSG (Табл. 2).

Таблица 2.

## Влияние гербицидов на редокс-соотношение глутатиона

Гербициды 10 мкМ	Окислительно-восстановительное соотношение GSH/GSSG					
	вакуоли		пластиды		ткань	
	водный экстракт	экстракт без белка	водный экстракт	экстракт без белка	водный экстракт	экстракт без белка
Контроль	6,9	6,7	13,6	13,4	12,5	12,1
Глифосат	5,9	6,2	12,9	13,1	9,9	11,8
Клопиралид	5,2	5,9	12,2	12,8	8,7	11,2
Фтородифен	4,3	5,8	11,1	12,3	7,5	10,8

В тех случаях, когда из водных экстрактов перед инкубацией с гербицидом был удален белок, величины GSH/GSSG у вакуолей и тканевого экстракта снижались заметно меньше, что косвенно указывало на участие каталитических белков в реакции конъюгации GSH и гербицидов.

Реакцию конъюгации GSH с метаболитами и чужеродными соединениями катализирует GST. Активность этого фермента выявлена в вакуолях и пластидах клеток корнеплодов столовой свеклы [1]. Активность GST у вакуолей (при pH 7,0) была выше, чем у пластид (Рис. 2А). Её специфичность была подтверждена с помощью ингибирования этакриновой кислотой, которая выступает в роли субстрата для некоторых изоформ GST [14].

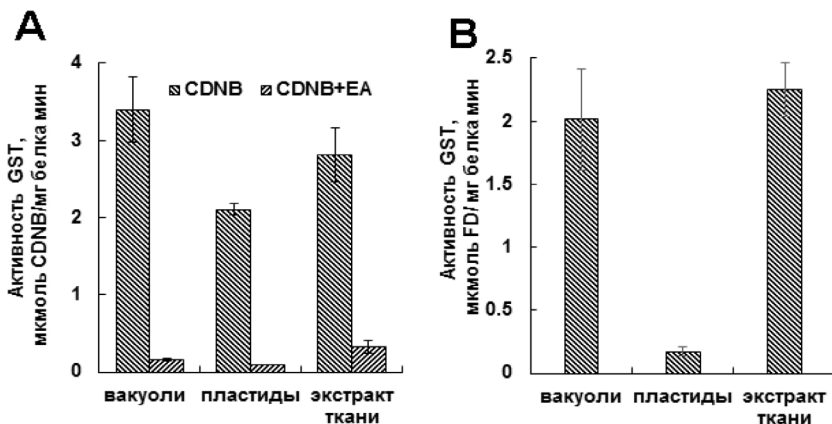
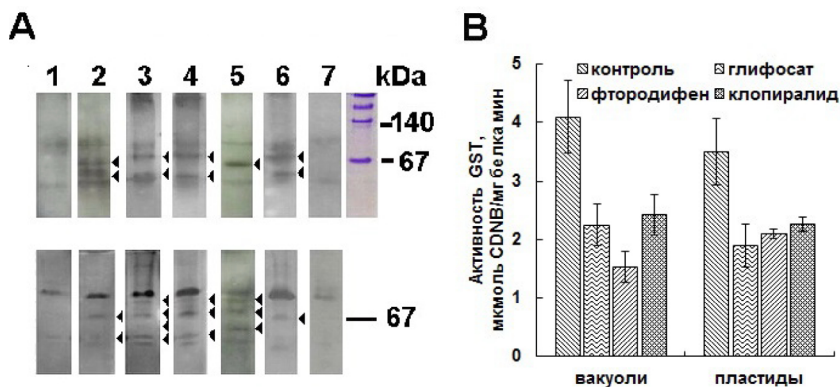


Рис. 2. Глутатион-S-трансферазная (GST) активность вакуолей, пластид и тканевого экстракта с разными субстратами. А – с традиционным субстратом 1-хлоро-2,4-динитробензолом (CDNB) и ингибирование GST-активности конкурентным субстратом этакриновой кислотой (EA). В – с гербицидом фтородифеном (FD)



Метод спектрофотометрии не позволяет выявлять ферментативную активность с большинством гербицидов. Однако с помощью этого метода можно определить активность GST с гербицидом фтородифеном. Вакуолярные GSTs показали более высокую активность с этим гербицидом (Рис. 2В). Фтородифен обычно используется как маркер способности некоторых изоформ GST к взаимодействию с гербицидами [19].

Метод электрофоретического разделения белков в неденатурирующих условиях (CN-PAGE) с последующим определением ферментативной активности в пластинах геля, как визуальный метод для исследования взаимодействия GST с различными субстратами, напротив, позволяет определить взаимодействие изоформ фермента с разными субстратами, в том числе с гербицидами. Активность GST в гелиевых пластинах визуализировали с глифосатом, клопиралидом и фтородифеном, а также с классическими субстратами CDNB и этакриновой кислотой. Вторым субстратом служил GSH. Для обнаружения неспецифической активности анализировали дополнительный контрольный образец, содержащий только GSH (Рис. 3А и В, трек 1).



**Рис. 3.** Активность изоформ глутатион-S-трансферазы (GST) у вакуолей (А) и пластид (В). Ферментативная активность в исследуемых образцах с такими субстратами, как: 1 – глутатион (GSH) (неспецифичная реакция); 2 – GSH + 1-хлор-2,4-динитробензол (CDNB); 3 – GSH + глифосат; 4 – GSH + клопиралид; 5 – GSH + фтородифен; 6 – GSH + этакриновая кислота; 7 – GSH + CDNB + этакриновая кислота; м – маркерные белки. Негативное изображение (1-7).

Стрелками обозначены изоформы GST. (С) Подавление активности GST вакуолей и пластид гербицидами (глифосатом, фтородифеном, клопиралидом)

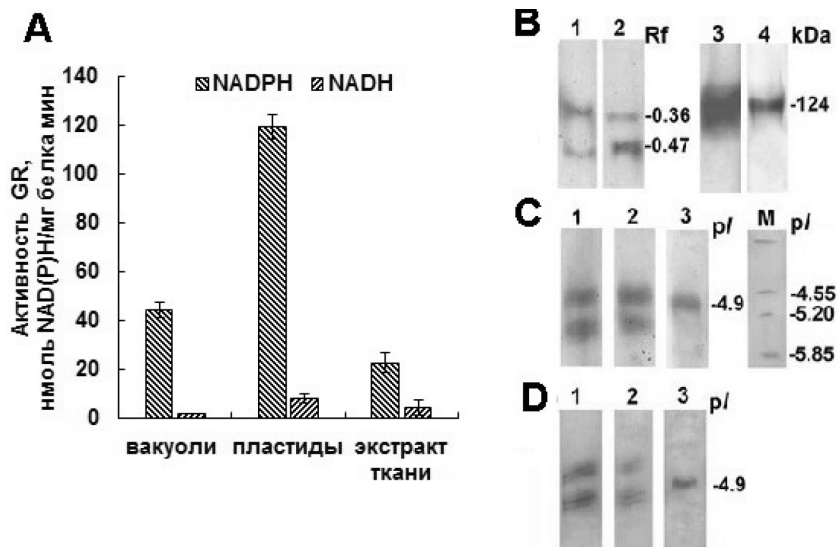
Вместе с GSH и другим упомянутым субстратом количество зон ферментативной активности увеличивалось. GSTs вакуолей взаимодейство-

вали как с традиционными субстратами, так и гербицидами (одна или две изоформы). Все зоны с ферментативной активностью исчезали, если в качестве ингибитора применяли этакриновую кислоту (Рис. 3А, треки 7). В образцах лейкопластов также можно было видеть GST-активность с CDNB (две зоны) и этакриновой кислотой (одна зона) (Рис. 3В, треки 2 и 6). Если в качестве субстратов использовали глифосат, клопиралид и фтородифен, то в геле появлялись три-четыре зоны с ферментативной активностью (Рис. 3В, треки 3-5). Результаты не только электрофоретического, но и спектрофотометрического исследования ферментативной активности показали, что GSTs вакуолей и пластид могут взаимодействовать с используемыми гербицидами (Рис. 3С). Когда среды кроме традиционного субстрата CDNB содержали один из указанных гербицидов, ферментативная активность заметно снижалась так же, как это происходило в случае с этакриновой кислотой, которая, служила субстратом для некоторых изоформ GST.

Ферменты из группы глутатионтрансфераз характеризуются довольно широким субклеточным распространением [9]. GSTs классов тау, фи и лямбда обнаружены в хлоропластах, митохондриях, цитозоле, апопласте и ядре [8, 9]. Изоформы GST, предположительно класса phi, и одна микросомальная изоформа были обнаружены в вакуолях с использованием протеомного анализа [6]. С помощью иммуоферментного анализа в вакуолях были обнаружены изоформы GST предположительно тау-класса [22]. В нашей работе оценивалась активность GST с помощью традиционных методов, с применением модельных субстратов и гербицидов. Собственные факты и имеющиеся в литературе данные позволяют предположить, что GSTs вакуолей и пластид клеток корнеплодов столовой свеклы выполняют функции, характерные для ферментов GST-семейства [18]. Так как изоформы GST реагируют с этакриновой кислотой (структурным аналогом эндогенных альдегидов) и гербицидами, можно ожидать их существенный вклад в процессы детоксикации цитотоксичных соединений.

Низкие концентрации GSH лимитируют реакции конъюгации, катализируемые GST. Поддержание пула глутатиона в восстановленном состоянии – основная функция глутатионредуктаз (GRs), которые являются неотъемлемыми элементами окислительно-восстановительных систем глутатиона и глутаредоксина, поскольку обеспечивают их непрерывное функционирование [8]. В нашем случае от активности GR в некоторой степени зависела интенсивность конъюгации гербицидов с глутатионом, т.е. эффективность детоксикации. Следует отметить, что GR хлоропластов

и цитозоля относительно хорошо изучены у ряда растений [5, 10]. Вместе с тем, информации о вакуолярной GR практически нет. Известно, что у проростков *Hordeum vulgare* GR-активность вакуолей была в несколько раз ниже, по сравнению с GR-активностью хлоропластов [21]. У клеток корнеплодов столовой свеклы была обнаружена та же картина (Рис. 4А).



**Рис. 4.** Активность глутатионредуктазы (GR). А – Спектрофотометрический анализ активности GR с NADPH и NADH. В – Изоферментный состав GR в пластинах геля после электрофореза при неденатурирующих условиях (CN-PAGE). С – Изоферментный состав GR в пластинах геля после изоэлектрофоретического фокусирования (IEF) белков. Д – иммуноферментный анализ (Вестерн-блоттинг). 1 – вакуоли; 2 – пластиды; 3 – GR пекарских дрожжей (Sigma) служила контрольным вариантом; 4 – GR пекарских дрожжей, окрашенная Кумасси; М – белковые маркеры для IEF.

Таким образом, полученные результаты не противоречили сложившемуся представлению, согласно которому большая часть всех клеточных GR сосредоточена в пластидах [18]. Известно, что NADPH и NADH служат восстановителями GSSG в реакциях, катализируемых GR. Однако в качестве основного субстрата принято считать NADPH, так как GR не у всех организмов способны взаимодействовать с NADH [5, 10]. Действительно, ферментативная активность GR у вакуолей и пластид с NADPH была в несколько раз выше, чем с NADH (Рис. 4А).

В пластинах геля после CN-PAGE можно было видеть две зоны с GR-активностью, которые, по всей видимости, соответствовали двум изоформам фермента (Рис. 4В). Значение Rf одной из изоформ GR, обладающей меньшей электроподвижностью (Rf 0.36), совпадало со значением Rf для GR пекарских дрожжей (Rf 0.33-0.36), которая в этом эксперименте служила контрольным вариантом (Рис. 4В, треки 3 и 4).

Разделение белков в ходе IEF происходит по величинам их поверхностных зарядов (Рис. 4С). При таком разделении, в пластинах геля также формировались две основные зоны с GR-активностью, которые соответствовали двум изоформам фермента. Все выявленные зоны ферментативной активности располагались в области  $pI \sim 4,0-5,0$ . Для визуализации активности GR был применен Вестерн-блотт анализ и антитела, полученными для GR пекарских дрожжей (Рис. 4D). Результаты этого анализа подтвердили принадлежность наблюдаемой ферментативной активности изоформам GR.

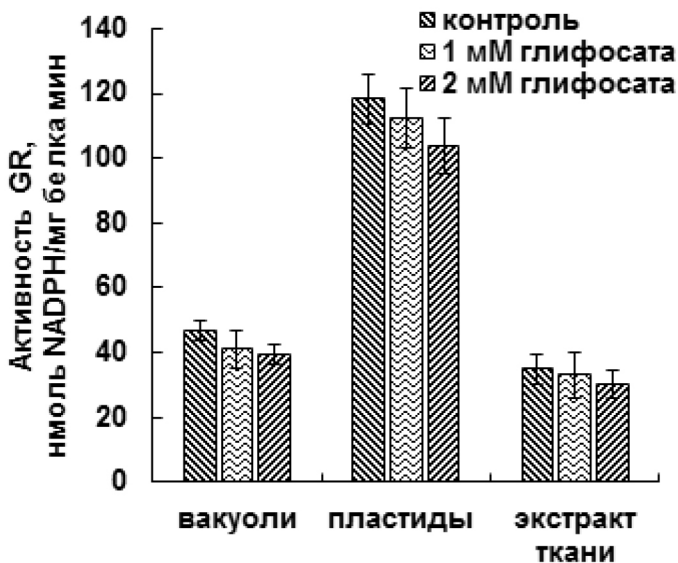


Рис. 5. Влияние гербицида глифосата в 1-мМ и 2-мМ концентрации на активность глутатионредуктазы (GR).

В клетках растений нуклеотид-зависимые GRs являются димерными белками и часто представлены несколькими изоформами. Две изоформы

GR идентифицированы в клетках *Pinus strobus* и *Arabidopsis thaliana* [3, 16]. Согласно полученным результатам, у корнеплодов свеклы две разные изоформы GR локализуются в вакуолях и пластидах. Значения  $pI$  этих изоформ близки к значениям  $pI$  для GR других растений, которые имели две или более изоформы с  $pI$  от 4,1 до 4,9 [3, 10, 16]. Для GR разного происхождения характерна высокая степень гомологии аминокислотной последовательности апофермента [10]. По этой причине антитела к GR пекарских дрожжей оказались специфичными для GR растительного объекта.

Представлялось целесообразным исследовать эффект гербицидов на активность GR, подавление которой при обработке пестицидами может приводить к истощению пула GSH. Однако выраженного ингибирования GR гербицидами в условиях *in vitro* не обнаружено. На рисунке 5 приведен результат характерного опыта с глифосатом. Аналогичные результаты получены и для других гербицидов (данные не приводятся).

Снижение активности GR примерно на 10% происходило при довольно высокой концентрации гербицида – 2 мМ. Гербициды в концентрации 1 мМ оказались неэффективными, что свидетельствовало об относительно высокой стабильности фермента. Ранее после экзогенной обработки (*in viva*) глифосатом корней и листьев некоторых растений отмечали увеличение GR-активности. Это было обусловлено экспрессией защитных систем клетки, в частности, системы глутатиона [17].

### Заключение

Не вызывает сомнения тот факт, что накопление цитотоксичных веществ в тканях культурных растений является прямым следствием нарушения детоксикационных процессов в субклеточных структурах. Очевидно, что для понимания причин нарушения этих процессов необходимо системное изучение механизмов детоксикации в компартаментах растительной клетки.

Поскольку центральная вакуоль аккумулирует и удерживает цитотоксичные соединения, целесообразно изучать механизмы детоксикации в этом компарimente. В настоящей работе проводилось сравнительное исследование глутатион-зависимых механизмов детоксикации у вакуолей и пластид корнеплодов столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.). В вакуолях и лейкопластах корнеплодов столовой свеклы впервые показано присутствие ферментов системы глутатиона. Выявлена активность глутатионредуктазы (GR) – фермента, поддерживающего пул глутатиона в восстановленном состоянии. Активность GR характеризовалась высокой стабильностью. Она практически не снижалась при наличии исследуемых гербицидов в инкубационной среде.

Основное назначение GR заключается в восстановлении аккумулируемого вакуолями и пластидами глутатиона, который вовлекается в процессы детоксикации цитотоксичных соединений. Сравнительный анализ показал, что GSTs вакуолей и пластид обладали довольно широкой субстратной специфичностью и могли взаимодействовать с исследуемыми гербицидами. Кроме того, с некоторыми субстратами активность GSTs вакуолей была заметно выше, чем активность GSTs пластид.

Факты, подтверждающие наличие GR и ферментов GST-семейства в вакуолях, в некоторой степени расширяют представление о вакуолярной функции. Вопреки сложившемуся мнению, основная функция вакуолей, содержащих указанные ферменты, не ограничивается депонированием конъюгатов глутатиона, транспортируемых из цитозоля. Конъюгаты соединений, в том числе ксенобиотических, при участии глутатионзависимых ферментов могут образовываться внутри самой вакуоли. Очевидно, что детальное исследование системы глутатиона и других систем, причастных к обезвреживанию цитотоксичных метаболитов и ксенобиотиков в вакуолях и других субклеточных структурах, позволит выявить индивидуальные особенности их механизмов детоксикации.

**Информация о конфликте интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Информация о спонсорстве.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

### *Список литературы*

1. Прадедова Е.В., Нимаева О.Д., Трухан И.С., Саяев Р.К. Глутатионтрансферазная активность вакуолей, пластид и экстрактов ткани корнеплодов столовой свеклы // Биологические мембраны. 2016. Т. 33, № 2. С. 140-149. <https://doi.org/10.7868/S0233475516020092>
2. Саяев Р.К., Кузеванов В.Я., Хаптагаев С.А., Копытчук В.Н. Выделение и очистка вакуолей и вакуолярных мембран из клеток растений // Физиология растений. 1981. Т. 28. С.1295-1305.
3. Anderson J.V., Hess J.L., Chevone B. Purification, characterization, and immunological properties for two isoforms of glutathione reductase from eastern white pine needles // Plant Physiology, 1990, vol. 94, no. 3, pp. 1402-1409. <https://doi.org/10.1104/pp.94.3.1402>
4. Boyle S.A., Hemmingsen S.M., Dennis D.T. Uptake and processing of the precursor to the small subunit of ribulose 1.5-bisphosphate carboxylase by leuco-

- plasts from the endosperm of developing castor oil seeds // *Plant Physiology*, 1986, vol. 81, no. 3, pp. 817-822. <https://doi.org/10.1104/pp.81.3.817>
5. Carlberg I., Mannervik B. Glutathione reductase // *Methods Enzymology*, 1985, vol. 113, pp. 484-490. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(85\)13062-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(85)13062-4)
  6. Carter C., Pan S., Zouhar J., Avila E.L., Girke T., Raikhel N.V. The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins // *The Plant Cell*, 2004, vol. 16, no. 12, pp. 3285-3303. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.027078>
  7. Coleman J.O.D., Blake-Kalff M.M.A., Davies T.G.E. Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation // *Trends in Plant Science*, 1997, vol. 2, no. 4, pp. 144-151. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1997.d01-93.x>
  8. Dixon D.P., Cummins I., Cole D.J., Edwards R. Glutathione-mediated detoxification system in plants // *Current Opinion in Plant Biology*, 1998, vol. 1, no. 3, pp. 258-266. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(98\)80114-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(98)80114-3)
  9. Dixon D.P., Hawkins T., Hussey J., Edwards R. Enzyme activities and subcellular localization of members of the Arabidopsis glutathione transferase superfamily // *Journal of Experimental Botany*, 2009, vol. 60, no. 4, pp. 1207-1218. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern365>
  10. Edwards E.A., Rawsthorne S., Mullineaux P.M. Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.) // *Planta*, 1990, vol. 180, no. 2, pp. 278-284. <https://doi.org/10.1007/BF00194008>
  11. Forman H.J., Zhang H., Rinna A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis // *Molecular Aspects of Medicine*, 2009, vol. 30, no. 1-2, pp. 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.006>
  12. Gaal O., Medgyesi G.A., Vereczke L. *Electrophoresis in the separation of biological macromolecules*. New York: Wiley, 1980, 422 p. <https://doi.org/10.3109/08923978009026414>
  13. Gupta S., Rathaur S. Filarial glutathione S-transferase: its induction by xenobiotics and potential as drug target // *Acta Biochimica Polonica*, 2005, vol. 52, no. 2, pp. 493-500.
  14. Kili K.G., Atanassova N., Vardanyan A., Clatot N., Al-Sabarna K., Kanellopoulos P.N., Makris A.M., Kampranis S.C. Differential roles of tau class glutathione S-transferases in oxidative stress // *Journal of Biology and Chemistry*, 2004, vol. 279, no. 23, pp. 24540-24551. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309882200>
  15. Manchenko G.P. *Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels*. Second Edition. Boca Raton: CRC Press LLC, 2002, 568 p. <https://doi.org/10.1201/9781420040531>
  16. Marty L., Siala W., Schwarzlander M., Fricker M.D., Wirtz M., Sweetlove L.J., Meyer Y., Meyer A.J., Reichheld J.P., Hell R. The NADPH-dependent thioredoxin system

- constitutes a functional backup for cytosolic glutathione reductase in Arabidopsis // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, vol. 106, no. 22, pp. 9109-9114. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900206106>
17. Miteva L.P.E., Ivanov S.V., Alexieva V.S. Alterations in glutathione pool and some related enzymes in leaves and roots of pea plants treated with the herbicide glyphosate // *Russian Journal of Plant Physiology*, 2010, vol. 57, pp. 131-136. <https://doi.org/10.1134/S1021443710010188>
  18. Noctor G., Mhamdi A., Chaouch S., Han Y., Neukermans J., MarquezGarcia B., Queval G., Foyer C.H. Glutathione in plants: an integrated overview // *Plant Cell & Environment*, 2012, vol. 35, no. 2, pp. 454-484. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02400.x>
  19. Pascal S., Scalla R. Purification and characterization of a safener-induced glutathione S-transferase from wheat (*Triticum aestivum*) // *Physiologia Plantarum*, 1999, vol. 106, no. 1, pp. 17-27. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1999.106103.x>
  20. Queval G., Jaillard D., Zechmann B., Noctor G. Increased intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> availability preferentially drives glutathione accumulation in vacuoles and chloroplasts // *Plant & Cell Environment*, 2011, vol. 34, no. 1, pp. 21-32. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02222.x>
  21. Rautenkranz A.F., Li L., Machler F., Martinoia E., Oertli J.J. Transport of ascorbic and dehydroascorbic acids across protoplast and vacuole membranes isolated from barley (*Hordeum vulgare* L. cv Gerbel) leaves // *Plant Physiology*, 1994, vol. 106, no. 1, pp. 187-193. <https://doi.org/10.1104/pp.106.1.187>
  22. Riechers D.E., Zhang Q., Xu F., Vaughn, K.C. Tissue-specific expression and localization of safener-induced glutathione S-transferase proteins in *Triticum tauschii*. *Planta*. 2003, vol. 217, no. 5, pp. 831-840. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1063-y>
  23. Van Eerd L.L., Hoagland R.E., Zablotowicz R.M., Hall J.C. Pesticide metabolism in plants and microorganisms // *Weed Science*. 2003, vol. 51, no. 4, pp. 472-495. [https://doi.org/10.1614/0043-1745\(2003\)051\[0472:PMIPAM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1614/0043-1745(2003)051[0472:PMIPAM]2.0.CO;2)
  24. Zechmann B. Compartment-specific importance of ascorbate during environmental stress in plants // *Antioxidants & Redox Signaling*, 2018, vol. 29, no. 15, pp. 1488-1501. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7232>

### References

1. Pradedova E.V., Nimaeva O.D., Truchan I.S., Salyaev R.K. *Glutathiontransferaznaya aktivnost' vakuoley, plastid i ekstraktov tkani korneplodov stolovoy svekly* [Glutathione transferase activity of vacuoles, plastids, and tissue extracts of red beetroot]. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A Membrane and Cell Biology*, 2016, vol. 10, no. 3, pp. 223-232. <https://doi.org/10.1134/S1990747816020082>



2. Salyaev R.K., Kuzevanov V.Ya., Khaptagaev S.A., Kopytchuk V.N. Vydeleniye i ochistka vakuoley i vakuolyarnykh membran iz kletok rasteniy [Isolation and purification of vacuoles and vacuolar membranes from plant cells]. *Fiziologiya rasteniy* [Plant Physiology], 1981, vol. 28, pp. 1295-1305.
3. Anderson J.V., Hess J.L., Chevone B. Purification, characterization, and immunological properties for two isoforms of glutathione reductase from eastern white pine needles. *Plant Physiology*, 1990, vol. 94, no. 3, pp. 1402-1409. <https://doi.org/10.1104/pp.94.3.1402>
4. Boyle S.A., Hemmingsen S.M., Dennis D.T. Uptake and processing of the precursor to the small subunit of ribulose 1.5-bisphosphate carboxylase by leucoplasts from the endosperm of developing castor oil seeds. *Plant Physiology*, 1986, vol. 81, no. 3, pp. 817-822. <https://doi.org/10.1104/pp.81.3.817>
5. Carlberg I., Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods Enzymology*, 1985, vol. 113, pp. 484-490. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(85\)13062-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(85)13062-4)
6. Carter C., Pan S., Zouhar J., Avila E.L., Girke T., Raikhel N.V. The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins. *The Plant Cell*, 2004, vol. 16, no. 12, pp. 3285-3303. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.027078>
7. Coleman J.O.D., Blake-Kalff M.M.A., Davies T.G.E. Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends in Plant Science*, 1997, vol. 2, no. 4, pp. 144-151. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1997.d01-93.x>
8. Dixon D.P., Cummins I., Cole D.J., Edwards R. Glutathione-mediated detoxification system in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 1998, vol. 1, no. 3, pp. 258-266. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(98\)80114-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(98)80114-3)
9. Dixon D.P., Hawkins T., Hussey J., Edwards R., Enzyme activities and subcellular localization of members of the *Arabidopsis* glutathione transferase superfamily. *Journal of Experimental Botany*, 2009, vol. 60, no. 4, pp. 1207-1218. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern365>
10. Edwards E.A., Rawsthorne S., Mullineaux P.M. Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta*, 1990, vol. 180, no. 2, pp. 278-284. <https://doi.org/10.1007/BF00194008>
11. Forman H. J., Zhang H., Rinna A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, 2009, vol. 30, no. 1-2, pp. 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.006>
12. Gaal O., Medgyesi G.A., Vereczke L. *Electrophoresis in the separation of biological macromolecules*. New York: Wiley, 1980, 422 p. <https://doi.org/10.3109/08923978009026414>
13. Gupta S., Rathaur S. Filial glutathione S-transferase: its induction by xenobiotics and potential as drug target. *Acta Biochimica Polonica*, 2005, vol. 52, no. 2, pp. 493-500.

14. Kilili K.G., Atanassova N., Vardanyan A., Clatot N., Al-Sabarna K., Kanellopoulos P.N., Makris A.M., Kampranis S.C. Differential roles of tau class glutathione S-transferases in oxidative stress. *Journal of Biology and Chemistry*, 2004, vol. 279, no. 23, pp. 24540-24551. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309882200>
15. Manchenko G.P. *Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels*. Second Edition. Boca Raton: CRC Press LLC, 2002, 568 p. <https://doi.org/10.1201/9781420040531>
16. Marty L., Siala W., Schwarzlander M., Fricker M.D., Wirtz M., Sweetlove L.J., Meyer Y., Meyer A.J., Reichheld J.P., Hell R. The NADPH-dependent thioredoxin system constitutes a functional backup for cytosolic glutathione reductase in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, vol. 106, no. 22, pp. 9109-9114. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900206106>
17. Miteva L.P.E., Ivanov S.V., Alexieva V.S. Alterations in glutathione pool and some related enzymes in leaves and roots of pea plants treated with the herbicide glyphosate. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2010, vol. 57, pp. 131-136. <https://doi.org/10.1134/S1021443710010188>
18. Noctor G., Mhamdi A., Chaouch S., Han Y., Neukermans J., MarquezGarcia B., Queval G., Foyer C.H. Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant Cell & Environment*, 2012, vol. 35, no. 2, pp. 454-484. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02400.x>
19. Pascal S., Scalla R. Purification and characterization of a safener-induced glutathione S-transferase from wheat (*Triticum aestivum*). *Physiologia Plantarum*, 1999, vol. 106, no. 1, pp. 17-27. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1999.106103.x>
20. Queval G., Jaillard D., Zechmann B., Noctor G. Increased intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> availability preferentially drives glutathione accumulation in vacuoles and chloroplasts. *Plant & Cell Environment*, 2011, vol. 34, no. 1, pp. 21-32. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02222.x>
21. Rautenkranz A.F., Li L., Machler F., Martinoia E., Oertli J.J. Transport of ascorbic and dehydroascorbic acids across protoplast and vacuole membranes isolated from barley (*Hordeum vulgare* l. cv Gerbel) leaves. *Plant Physiology*, 1994, vol. 106, no. 1, pp. 187-193. <https://doi.org/10.1104/pp.106.1.187>
22. Riechers D.E., Zhang Q., Xu F., Vaughn K.C. Tissue-specific expression and localization of safener-induced glutathione S-transferase proteins in *Triticum tauschii*. *Planta*, 2003, vol. 217, no.5, pp. 831-840. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1063-y>
23. Van Eerd L.L., Hoagland R.E., Zablotowicz R.M., Hall J.C. Pesticide metabolism in plants and microorganisms. *Weed Science*, 2003, vol. 51, no. 4, pp. 472-495. [https://doi.org/10.1614/0043-1745\(2003\)051\[0472:PMIPAM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1614/0043-1745(2003)051[0472:PMIPAM]2.0.CO;2)
24. Zechmann B. Compartment-specific importance of ascorbate during environmental stress in plants. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2018, vol. 29, no. 15, pp. 1488-1501. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7232>

**ДАННЫЕ ОБ АВТОРАХ**

**Праделова Елена Владимировна**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории физиологии растительной клетки

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН  
ул. Лермонтова, 132, г. Иркутск, 664033, Российская Фе-  
дерация*

*praded@sifibr.irk.ru*

**Салаяев Рюрик Константинович**, д.б.н., проф., чл.-корр., советник РАН, главный научный сотрудник лаборатории физиологии растительной клетки

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Си-  
бирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН  
ул. Лермонтова, 132, г. Иркутск, 664033, Российская Федерация*

*salyaev@sifir.irk.ru*

**DATA ABOUT THE AUTHORS**

**Elena V. Pradedova**, Cand. Sc. (Biology), Senior Researcher of the Laboratory of Plant Cell Physiology

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch  
of Russian Academy of Sciences (SIPPB SB RAS)*

*132, Lermontov Str., Irkutsk, 664033, Russian Federation*

*praded@sifibr.irk.ru*

*ORCID: 0000-0002-3374-9398*

*ResearcherID: J-6747-2018*

*Scopus Author ID: 6603218820*

**Rurick K. Salyaev**, Dr. Sc. (Biology), Chief Researcher of the Laboratory of Plant Cell Physiology

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch  
of Russian Academy of Sciences (SIPPB SB RAS)*

*132, Lermontov Str., Irkutsk, 664033, Russian Federation*

*salyaev@sifir.irk.ru*

*SPIN-code: 3113-2661*

*ORCID: 0000-0002-7602-7301*

*ResearcherID: K-1572-2018*

*Scopus Author ID: 7003642805*