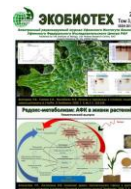




ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

http://ecobiotech-journal.ru



РЕДОКС-СОСТОЯНИЕ ГЛУТАТИОНА, АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ И NAD В ВАКУОЛЯХ КОРНЕПЛОДОВ СТОЛОВОЙ СВЕКЛЫ В ПЕРИОД ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО ПОКОЯ

Прадедова Е.В., Нимаева О.Д., Салаяев Р.К.

Сибирский институт физиологии и биохимии растений
Сибирского отделения Российской академии наук,
г. Иркутск, Россия
Email: praded65@mail.ru

Установлено содержание и редокс-состояние глутатиона, аскорбиновой кислоты и NAD в вакуолях изолированных из корнеплодов столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.) в период физиологического покоя. Величины соотношений восстановленных и окисленных форм, которые характеризовали редокс-состояние указанных соединений, были следующими: для глутатиона (GSH/GSSG) – 7,1; для аскорбиновой кислоты (АК_{вс}/АК_{ок}) – 1,7; для NAD (NADH/NAD⁺) – 0,6. Восстановительные потенциалы (Eh) для редокс-пар этих соединений соответствовали: –163 мВ для глутатиона; +136 мВ для аскорбиновой кислоты; –266 мВ для NAD. Относительно низкие величины соотношения NADH/NAD⁺ и Eh для редокс-пары NAD говорили о высокой активности окислительных реакций с участием динуклеотида, а также о преобладании катаболических процессов над биосинтетическими. Величины этих параметров для редокс-пар глутатиона и аскорбиновой кислоты свидетельствовали о менее восстановленном состоянии внутренней среды вакуолей в клетках корнеплодов столовой свеклы в период покоя.

Ключевые слова: *Beta vulgaris* L., вакуолярный компартмент, низкомолекулярные доноры и акцепторы электронов, редокс-состояние, окислительно-восстановительный потенциал

Сокращения: АК_{вс} – восстановленная аскорбиновая кислота, АК_{ок} – окисленная аскорбиновая кислота, GSH – восстановленный глутатион, GSSG – окисленный глутатион, NADH – восстановленный никотинамидадениндинуклеотид, NAD⁺ – окисленный никотинамидадениндинуклеотид.

REDOX STATE OF GLUTATHIONE, ASCORBIC ACID AND NAD IN VACUOLES OF DORMANT RED BEETROOTS

Pradedova E.V., Nimaeva O.D., Salyaev R.K.

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry,
Siberian Branch, Russian Academy of Sciences,
Irkutsk, Russia
Email: praded65@mail.ru

The content and redox state of glutathione, ascorbate and NAD in the vacuoles isolated from the cells of dormant red beetroots (*Beta vulgaris* L.) was estimated. The ratios of reduced to oxidized forms of these compounds, which characterized their redox state, were as follows: 7.1 – for glutathione (GSH/GSSG ratio); 1.7 – for ascorbate (AA_{red}/AA_{ox} ratio); 0.6 – for NAD (NADH/NAD⁺ ratio). The values of reduction potentials (Eh) for the redox couples of these compounds differed markedly and corresponded to: –163 mV for the glutathione couple; +136 mV for the ascorbate couple; –266 mV for NAD couple. In vacuoles, the relatively low values of NADH/NAD⁺ ratio and Eh for NAD couple confirmed the high activity of oxidation reactions, which involved this dinucleotide as an electron acceptor, as well as these parameters indicated to the predominance of catabolic processes over biosynthetic processes. At the same time, the values of these parameters for redox couples of glutathione and ascorbic acid indicated to the less reducing environment of vacuoles from the storage parenchyma cells of dormant red beetroots.

Keywords: *Beta vulgaris* L., vacuolar compartment, low-molecular-weight electron donors and acceptors, redox state, redox potential

Abbreviations: AA_{red} – reduced form of ascorbic acid, AA_{ox} – oxidized form of ascorbic acid, GSH – reduced form of glutathione, GSSG – oxidized form of glutathione, NADH – reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺ – oxidized form of nicotinamide adenine dinucleotide.

Поступила в редакцию: 23.04.2020

DOI: [10.31163/2618-964X-2020-3-2-135-142](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2020-3-2-135-142)

ВВЕДЕНИЕ

Эффективность окислительно-восстановительных процессов, протекающих в растительных клетках, обусловлена компартиментализацией участвующих в них редокс-активных элементов [Go, Jones, 2008]. В компартаментах в окислительно-восстановительных

реакциях поток электронов (e^-) оптимизирован за счет изолирования от других редокс-процессов клетки. Внутренняя среда компартментов, которую формируют разнообразные низкомолекулярные доноры/акцепторы e^- , создает определенные условия для перемещения e^- и поддерживает электрохимический градиент на уровне, необходимом для нормального функционирования компартментов [Foyer, Noctor, 2011]. Главными окислительно-восстановительными элементами внутренней среды служат глутатион, аскорбиновая кислота и NAD(P). Однако в роли основного клеточного редокс-буфера зачастую рассматривается пара глутатиона, представленная восстановленной (GSH) и окисленной (GSSG) формами [Go, Jones, 2008; Foyer, Noctor, 2011]. Повсеместное присутствие и высокая концентрация глутатиона позволили использовать его в качестве маркера редокс-состояния клетки и некоторых ее структур [Foyer, Noctor, 2011]. Например, интенсивность окислительных процессов в митохондриях, пластидах и цитозоле обычно оценивается с помощью окислительно-восстановительного соотношения GSH/GSSG [Go, Jones, 2008; Noctor et al., 2011]. Окислительно-восстановительный потенциал (E_h) этих клеточных компартментов также характеризуется E_h для пары глутатиона ($E_{GSH/GSSG}$) [Go, Jones, 2008].

Согласно сложившимся представлениям, в клеточных структурах со слабокислой внутренней средой, например, лизосомах и литических вакуолях животных клеток, а также клеточных стенках растительных клеток, GSH и особенно GSH-зависимые системы могут быть малоэффективными [Go, Jones, 2008]. В качестве основного редокс-буфера в связи с этим можно рассматривать аскорбиновую кислоту (АК) [Foyer, Noctor, 2011]. АК вовлечена в разнообразные метаболические процессы, в которых служит источником e^- , поэтому в компартментах клетки постоянно образуются ее окисленные формы: монодегидроаскорбиновая кислота (МДА) и дегидроаскорбиновая кислота (ДГА). Резкие изменения общего содержания аскорбиновой кислоты ($АК + ДГА = АК_{сум}$), а также величин соотношения АК/ДГА, обычно происходят при действии неблагоприятных факторов [Foyer, Noctor, 2011]. В свою очередь, изменения концентрации АК и соотношения АК/ДГА служат регуляторными факторами многих физиологических процессов. По этой причине редокс-состояние пула аскорбиновой кислоты также служит объективной характеристикой редокс-состояния целых клеток и их компартментов.

В то же время, по окислительно-восстановительному состоянию пулов динуклеотида NAD и его фосфорилированного производного, NADP, можно установить активность того или иного энергетического пути. NADP выполняет функцию донора e^- главным образом в анаболических путях, поэтому его пул находится в восстановленном состоянии, т.е. соотношение NADPH/NADP⁺ поддерживается на высоком уровне. Тогда как NAD играет роль главного акцептора e^- в катаболических путях, что требует поддержания его пула в окисленном состоянии, т.е. соотношение NADH/NAD⁺ должно оставаться низким [Blacker, Duchon, 2016].

Для системы глутатиона, которая объединяет пару глутатиона и глутатион-зависимые ферменты, а также системы аскорбиновой кислоты, объединяющей пару аскорбиновой кислоты и аскорбат-зависимые ферменты, NADPH и NADH служат основными донорами окислительно-восстановительных эквивалентов. С другой стороны, эти динуклеотиды могут быть донорами e^- для O₂, что способствует образованию АФК [Blacker, Duchon, 2016]. Таким образом, маркерами окислительно-восстановительного состояния клеток могут быть не только редокс-состояния глутатиона и аскорбиновой кислоты, но и редокс-состояние NAD(P).

Изменение окислительно-восстановительного состояния указанных соединений вызывает большой интерес и активно исследуется во многих компартментах растительной клетки в связи с изменением метаболических процессов в онтогенезе, а также при действии стрессирующих факторов. В то же время центральной вакуоли уделяется мало внимания. По-прежнему нет единого мнения относительно содержания глутатиона, аскорбиновой кислоты и NAD в вакуолярном компартменте, так как протекающие в нем окислительно-восстановительные процессы с участием этих доноров e^- не изучены. В связи с этим в настоящей работе основные усилия были направлены на выявление глутатиона, аскорбиновой кислоты и NAD в вакуолях, изолированных из корнеплодов столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.), которые находились в состоянии физиологического покоя. Одна из задач заключалась в определении концентраций окисленных и восстановленных форм этих соединений. Другая задача состояла в определении таких параметров, как соотношение восстановленной и окисленной форм и E_h для редокс-пар указанных соединений, которые позволяли оценить окислительно-восстановительное состояние вакуолярного компартмента.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили корнеплоды столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.). Растения свеклы выращивали на опытном участке. Корнеплоды хранили при 4°C.

Из корнеплодов изолировали вакуоли с помощью модифицированного макрообъемного метода [Кузеванов и др., 1985].

Глутатион, аскорбиновую кислоту и NAD определяли не только в вакуолях, но и тканях корнеплода. Для определения глутатиона и аскорбиновой кислоты использовали ранее описанные методы, которые предусматривали применение ВЭЖХ с УФ-детекцией [Rellan-Alvarez et al., 2006; Alos et al., 2013]. NAD определяли с помощью комплекса реагентов «NAD⁺/NADH Quantification Kit» производства фирмы Sigma, согласно прилагаемому протоколу. Величины концентраций выражали в мкМ на л вакуолярного сока или сока ткани, проводя необходимые измерения и расчеты.

Восстановительный потенциал E_h рассчитывали, используя формулы:

$$E_h = E_{pH} - (59,1/n) \log_{10}([C_{bc}]/[C_{ок}]) \quad (1);$$

$$E_{pH} = E^{\circ} - [(pH - 7,0) * 59,1] \quad (2);$$

где: $[C_{bc}]$ и $[C_{ок}]$ – концентрации восстановленного и окисленного соединения; E° – стандартный потенциал (рН 7,0; 25°C); E_{pH} – стандартный потенциал E° , скорректированный относительно значений рН; n – количество переносимых электронов; $-59,1$ мВ ($\Delta E/\Delta pH$) – разница в E_h если рН изменяется на 1 (для GSH и АК) [Schafer, Buettner, 2001]. Учитывая величины E° для редокс-пары (-240 мВ для глутатиона; $+54$ мВ для аскорбата; -316 мВ для NAD) и рН вакуолярного сока, использовали следующие формулы. Для пары GSSG/GSH:

$$E_h = \{-240 \text{ мВ} + (-59,1 \text{ мВ}) * (5,5 - 7,0)\} - \{(59,1 \text{ мВ} / 2 e^-) * \log_{10} ([GSH]^2/[GSSG])\} \quad (3).$$

Для пары ДГА/АК:

$$E_h = \{54 \text{ мВ} + (-59,1 \text{ мВ}) * (5,5 - 7,0)\} - \{(59,1 \text{ мВ} / 2 e^-) * \log_{10} ([AK]/[AK_{ок}])\} \quad (4).$$

Для пары NAD⁺/NADH:

$$E_h = \{-316 \text{ мВ} + (-30 \text{ мВ}) * (5,5 - 7,0)\} - \{(59,1 \text{ мВ} / 2 e^-) * \log_{10} ([NADH]/[NAD])\} \quad (5).$$

Величину рН вакуолярного сока и экстрактов ткани определяли ранее с помощью описанного метода [Pradedova et al., 2019]. Установленный рН для вакуолей был равен 5,5 и мало отличался от рН экстрактов ткани (рН = 5,7), так как экстракты ткани были представлены главным образом вакуолярным соком. В то же время, значения рН для

вакуолей столовой свеклы соответствовали значениям рН для вакуолей других растений [Otegui et al., 2005].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Окислительно-восстановительные свойства компартментов формировались в соответствии с их функциями, поэтому у каждого из них собственные окислительно-восстановительные характеристики. Всестороннее изучение этих характеристик позволяет больше узнать о функциях клеточных структур [Go, Jones, 2008].

В центральной вакуоле также локализованы окислительно-восстановительные системы, посредством которых реализуются ее основные функции. Однако представления о вакуолярных окислительно-восстановительных процессах до сих пор ограничены. Приступая к изучению редокс-систем вакуолей клеток корнеплодов столовой свеклы, прежде всего, следовало обратить внимание на низкомолекулярные доноры e^- , такие как глутатион, аскорбиновая кислота и NAD, окислительно-восстановительные состояния которых характеризуют редокс-состояние компартментов.

Глутатион вовлечен во многие биологические процессы. Однако его основная функция заключается в поддержании внутриклеточного окислительно-восстановительного гомеостаза. Он считается основным тиол-дисульфидным редокс-буфером клетки [Schafer, Buettner, 2001; Foyer, Noctor, 2011]. В среднем концентрация глутатиона в клетке составляет 0,5–11,0 мМ. При этом преобладает восстановленная форма GSH. Отношение GSH/GSSG служит показателем для выражения окислительно-восстановительного состояния клетки [Go, Jones, 2008; Foyer, Noctor, 2011]. Это довольно «удобный» показатель, так как нет необходимости определять абсолютную концентрацию. Измерение в условных единицах можно ввести в соотношение и получить полезную оценку. Однако для определения величины E_h для пары глутатиона необходимо установить абсолютные концентрации компонентов редокс-пары GSSG/2GSH [Schafer, Buettner, 2001]. В связи с этим, нам следовало определить молярные концентрации GSH и GSSG. Полученные результаты продемонстрировали довольно высокие концентрации GSH и $GSH_{\text{сум}}$ в вакуолях, хотя они были заметно ниже соответствующих концентраций форм глутатиона, установленных для ткани корнеплода (табл. 1). Обращала внимание относительно высокая концентрация GSSG в вакуолях, по сравнению с концентрацией GSSG в экстрактах ткани. В связи с этим величина отношения GSH/GSSG для вакуолей была заметно ниже соответствующей величины, установленной для экстрактов ткани.

Таблица 1. Содержание разных форм глутатиона и его восстановительный потенциал

Образец	Глутатион, мкМ			GSSG %	GSH/ GSSG	E_h мВ
	GSH	GSSG	$GSH_{\text{сум}}$			
Вакуоли	341,4 ± 39,2	48,4 ± 9,4	438,2 ± 57,9	22,1	7,1	-163
Экстракт ткани	879,7 ± 38,9	68,3 ± 17,7	1016,3 ± 74,2	13,4	14,9	-171

Примечание: $GSH_{\text{сум}} = GSH + GSSG$.

Таким образом, содержание глутатиона в вакуолях в период физиологического покоя корнеплодов столовой свеклы оказалось относительно высоким. Эти результаты несколько отличались от ранее полученных результатов для других растений. Например, клетки

Arabidopsis thaliana дикого типа имели самую высокую концентрацию GSH в цитозоле, митохондриях и хлоропластах, а самую низкую в вакуолях. Упомянутые компартменты клетки также различались в отношении окислительно-восстановительного состояния глутатиона, выраженного как GSH/GSSG. Величина GSH/GSSG для вакуолей была ниже величин GSH/GSSG для хлоропластов и митохондрий [Noctor et al., 2012]. В нашем исследовании величина GSH/GSSG для вакуолей также оказалась довольно низкой.

Соотношение GSH/GSSG принято использовать в качестве маркера окислительного стресса [Schafer, Buettner, 2001]. При нормальных условиях изменения в этом соотношении, как правило, невелики. В связи с этим, E_h для пары глутатиона может быть более полезным показателем при оценке интенсивности окислительно-восстановительных процессов. Так, полученные ранее данные показали, что изменения E_h для пары глутатиона, коррелируют с определёнными биологическими состояниями клетки. Например, пролиферация клеток характеризовалась более отрицательными величинами E_h (–240 мВ), а дифференцировка клеток – менее отрицательными величинами (–200 мВ) [Go, Jones, 2008].

Установленные величины E_h для пары глутатиона у корнеплодов столовой свеклы были относительно высокими. Для вакуолярного глутатиона эта величина оказалась выше, чем для глутатиона из экстрактов ткани (табл. 1). Ранее было показано, что у растений *A. thaliana* величины E_h для глутатиона были довольно низкими в хлоропластах (–230 мВ) и митохондриях (–360 мВ) [Foyer, Noctor, 2011]. Однако величина E_h пары глутатиона, установленная для вакуолей клеток корнеплодов столовой свеклы, оказалась близкой соответствующей величине, установленной для эндоплазматического ретикулума (–150 мВ) животных клеток, который также характеризовался более окислительным состоянием глутатиона [Go, Jones, 2008].

Аскорбиновая кислота, хорошо известная своей способностью поглощать радикалы, является наиболее эффективным водорастворимым антиоксидантом не только плазмы крови человека, но и апопласта и симпласта растений. Помимо своей роли антиоксиданта, АК выполняет функцию одноэлектронного донора для большого числа ферментов, благодаря умеренно положительному E° для пары АК/МДА (280 мВ при pH 7,0), который, тем не менее, является более отрицательным, чем у большинства распространенных редокс-пар, образующих свободные радикалы [Foyer, Noctor, 2011]. Как донор e^- , АК способна восстанавливать переходные металлы, поэтому сама служит источником свободных радикалов и АФК [Иванов, 2014]. При этом окисленные формы аскорбиновой кислоты, МДА и ДГА, считаются надежными маркерами окислительного стресса и характеризуют редокс-состояние клетки и организма в целом [Foyer, Noctor, 2011].

В связи с этим представлялось целесообразным оценить редокс-состояние аскорбиновой кислоты у вакуолей и экстрактов ткани корнеплодов столовой свеклы. Самое высокое ее содержание установлено для экстрактов ткани (табл. 2). При этом она оказалась окисленной приблизительно на 50%. В результате величина соотношения $AK_{bc}/AK_{ок}$ была довольно низкой. В то же время, у вакуолей содержание AK_{bc} превосходило содержание $AK_{ок}$, поэтому величина отношения $AK_{bc}/AK_{ок}$ была выше. Таким образом, вакуоли аккумулировали аскорбиновую кислоту, но, по всей видимости, основной ее пул был сосредоточен в других компартментах клетки. Согласно ранее полученным данным самое высокое содержание аскорбиновой кислоты характерно для цитозоля [Foyer, Noctor, 2011]. Однако некоторые данные указывали на ее накопление в вакуолях. Например, на долю АК в вакуолях клеток корней *Armoracia rusticana* приходилось 70–90% от всей АК клетки [Grob, Matile, 1980]. В то же время, в протопластах *Hordeum vulgare*, а также в клетках листьев

A. thaliana и *Nicotina tabacum* самое высокое содержание АК установлено для цитозоля, а самое низкое содержание оказалась в вакуолях [Rautenkranz et al., 1994; Zechmann, 2011]

Таблица 2. Содержание аскорбиновой кислоты и ее восстановительный потенциал

Образец	Аскорбиновая кислота, мкМ			АК _{ок} %	АК _{вс} / АК _{ок}	E _h мВ
	АК _{вс}	АК _{ок}	АК _{сум}			
Вакуоли	599,3 ± 37,5	355,8 ± 74,9	955,1 ± 112,4	35	1,7	+136
Экстракт ткани	1255,4 ± 69,7	1557,6 ± 371,9	2812,9 ± 441,7	55	0,8	+157

Примечание: АК_{сум} = (АК_{вс} + АК_{ок}).

В нормальных условиях содержание АК_{вс} в клетках обычно значительно превосходит содержание МДА и ДГА. Однако концентрация всех форм аскорбиновой кислоты может существенно изменяться в зависимости от фазы физиологического развития [Foyer, Noctor, 2011]. Например, высокое соотношение АК_{вс}/АК_{сум} характерно для фазы деления клеток. Если это соотношение снижается за счет окисления АК, то пролиферация прекращается [Pignocchi et al., 2003]. В связи с этим можно предположить, что поддержание низкого редокс-соотношения АК_{вс}/АК_{ок} у клеток корнеплодов столовой свеклы в период физиологического покоя может служить механизмом ингибирования ростовых процессов. Однако следует отметить, что величина соотношения АК_{вс}/АК_{ок} для вакуолей была несколько выше, чем для экстрактов ткани. Таким образом, в вакуолях аскорбиновая кислота находилась в более восстановленном состоянии. Дополнительной характеристикой редокс-состояния пула аскорбиновой кислоты служил E_h. Для его определения мы использовали E^{o'} равное +54 мВ (формула 4), так как в водных растворах E^{o'} для аскорбиновой кислоты, молекула которой отдает при окислении два e⁻, складывается из E^{o'} двух одноэлектронных пар: E^{o'} для пары Аск⁻(H⁺)/АскН⁻ соответствовал +282 мВ и E^{o'} для пары ДГА/Аск⁻ соответствовал -174 мВ [Иванов, 2014]. Установленный E_h для аскорбиновой кислоты был менее положительным у вакуолей, по сравнению с экстрактами ткани. Таким образом, восстанавливающая способность АК в вакуолях могла быть выше.

NAD и NADP – универсальные доноры восстановительных эквивалентов, выполняющие обратимые двухэлектронные переносы в различных метаболических реакциях. Если NADPH служит кофактором, как правило, в восстановительных (биосинтетических) реакциях, выступая в роли донора e⁻, то NAD⁺-зависимые реакции зачастую являются окислительными (катаболическими) реакциями, а NAD⁺ выполняет функцию акцептора e⁻. Поскольку в вакуолях происходит деградация и утилизация выведенных из метаболизма соединений, то следовало ожидать накопления в них главным образом NAD. Ранее NAD был обнаружен в литических вакуолях *Saccharomyces cerevisiae* [Sarry et al., 2007]. Однако содержание этого динуклеотида в вакуолях растительных клеток не исследовалось, несмотря на выявление в них ряда NAD-зависимых ферментов [Carter et al., 2004].

Полученные результаты указывали на аккумуляцию NAD вакуолями корнеплодов столовой свеклы (табл. 3). Содержание восстановленной формы NADH оказалось довольно высоким, при этом оно мало отличалось от содержания NADH в экстрактах ткани.

Таблица 3. Содержание NAD и его восстановительный потенциал

Образец	NAD, мкМ			NAD ⁺ %	NADH/ NAD ⁺	E _h мВ
	NADH	NAD ⁺	NAD(H)			
Вакуоли	224,7 ± 37,5	355,8 ± 37,6	580,5 ± 74,9	61	0,6	-266
Экстракт ткани	230,1 ± 46,5	418,5 ± 69,7	648,6 ± 116,2	64	0,6	-258

Примечание: NAD(H) = (NADH + NAD⁺).

В клетках растений самые высокие концентрации NAD обычно сосредоточены в митохондриях (0,3–3,0 мМ, в зависимости от типа клеток) и хлоропластах (0,2–0,9 мМ, в зависимости от освещенности) [Heineke et al., 1991]. При этом окисленная форма NAD⁺, как правило, значительно превосходила восстановленную форму NADH. Например, в митохондриях клубней *Solanum tuberosum* в нормальных условиях концентрация NADH составляла 160 мкМ, а NAD⁺ – 730 мкМ [Kasimova et al., 2006]. Однако соотношение NADH/NAD⁺ в матрице митохондрий могло сильно варьировать (от 0,06 до 0,6) [Kasimova et al., 2006]. В вакуолях так же, как и тканях корнеплодов, это соотношение было относительно высоким. На относительно низкую восстановительную способность NAD указывала величина E_h для пары NAD(H) как у вакуолей, так и у тканей корнеплода. Таким образом, пул NAD оказался довольно восстановленным. По всей видимости, в фазу физиологического покоя в тканях корнеплодов преобладали катаболические процессы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании проводилось определение глутатиона, аскорбиновой кислоты и NAD в вакуолях корнеплодов столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.) в фазу физиологического покоя. Одна из задач заключалась в определении концентраций окисленных и восстановленных форм этих соединений. Другая задача состояла в определении таких параметров, характеризующих редокс-состояние этих соединений, как окислительно-восстановительное соотношение и E_h для редокс-пар.

Полученные результаты показали, что вакуоли аккумулировали глутатион, аскорбиновую кислоту и NAD. Однако редокс-состояния этих соединений различались. Если глутатион и аскорбиновая кислота находились в более окисленном состоянии, то NAD, напротив, был в более восстановленном состоянии. На это указывали величины отношений GSH/GSSG, АК_{вс}/АК_{ок} и NADH/NAD⁺, а также величины E_h соответствующих редокс-пар. Более окисленное состояние глутатиона и аскорбиновой кислоты, на фоне более восстановленного состояния NAD, свидетельствовало о преобладании окислительных (или катаболических) процессов в вакуолях клеток запасавшей паренхимы корнеплодов столовой свеклы в фазу физиологического покоя.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иванов Б.Н. Роль аскорбиновой кислоты в фотосинтезе // Биохимия. 2014. Т. 79 (3). С. 364–372. <https://doi.org/10.1134/S0006297914030146>
2. Кузеванов В.Я., Катков Б.Б., Салаяев Р.К. Общие принципы выделения вакуолей и вакуолярных мембран // Структура и функции биологических мембран растений / Под ред. Р.К. Салаяева, В.К. Войникова. Новосибирск: Наука, 1985. С. 93–107.

3. Alos E., Rodrigo M.J., Zacarias L. Transcriptomic analysis of genes involved in the biosynthesis, recycling and degradation of L-ascorbic acid in pepper fruits (*Capsicum annuum* L.) // Plant Science. 2013. V. 207. P. 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.02.007>
4. Blacker T.S., Duchon M.R. Investigating mitochondrial redox state using NADH and NADPH autofluorescence // Free Radical Biology and Medicine. 2016. V. 100. P. 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.010>
5. Carter C., Pan S., Zouhar J., et al. The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins // Plant Cell. 2004. V. 16. P. 3285–3303. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.027078>
6. Foyer C.H., Noctor G. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub // Plant Physiology. 2011. V. 155 (1). P. 2–18. <https://doi.org/10.1104/pp.110.167569>
7. Go Y.M., Jones D.P. Redox compartmentalization in eukaryotic cells // Biochimica et Biophysica Acta. 2008. V. 1780 (11). P. 1273–1290. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.01.011>
8. Grob K.J., Matile P. Capillary GC of glucosinolate-derived horseradish constituents // Phytochemistry. 1980. V. 19 (8). P. 1789–1793. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)83814-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83814-5)
9. Heineke D., Riens B., Grosse H., et al. Redox transfer across the inner chloroplast envelope membrane // Plant Physiology. 1991. V. 95 (4). P. 1131–1137. <https://doi.org/10.1104/pp.95.4.1131>
10. Kasimova M.R., Grigiene J., Krab K., et al. The free NADH concentration is kept constant in plant mitochondria under different metabolic conditions // The Plant Cell. 2006. V. 18 (3). P. 688–698. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.039354>
11. Noctor G., Mhamdi A., Chaouch S., et al. Glutathione in plants: an integrated overview // Plant Cell Environ. 2012. V. 35 (2). P. 454–484. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02400.x>
12. Otegui M.S., Noh Y.S., Martínez D.E., Petroff M.G., et al. Senescence-associated vacuoles with intense proteolytic activity develop in leaves of *Arabidopsis* and soybean // Plant Journal. 2005. V. 41 (6). P. 831–844. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02346.x>
13. Pignocchi C., Fletcher J.M., Wilkinson J.E., et al. The function of ascorbate oxidase in tobacco // Plant Physiology. 2003. V. 132 (3). P. 1631–1641. <https://doi.org/10.1104/pp.103.022798>
14. Pradedova E.V., Nimaeva O.D., Rakevich A.L., Salyaev R.K. Comparative analyses of glutathione system of vacuoles and leucoplasts isolated from the storage parenchyma cells of dormant red beetroots (*Beta vulgaris* L.) // Plant Physiol. Biochem. 2019. V. 145. P. 52–63. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.10.026>
15. Rautenkranz A.F., Li L., Machler F., et al. Transport of ascorbic and dehydroascorbic acid across protoplasts and vacuole membranes isolated from barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Gerbel) leaves // Plant Physiology. 1994. V. 106 (1). P. 187–193. <https://doi.org/10.1104/pp.106.1.187>
16. Rellan-Alvarez R., Hernandez L.E., Abadia J., Alvarez-Fernandez A. Direct and simultaneous determination of reduced and oxidized glutathione and homogluthione by liquid chromatography-electrospray/mass spectrometry in plant tissue extracts // Anal Biochemistry. 2006. V. 356 (2). P. 254–264. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.05.032>
17. Sarry J.E., Chen S., Collum R.P., et al. Analysis of the vacuolar luminal proteome of *Saccharomyces cerevisiae* // FEBS Journal. 2007. V. 274 (16). P. 4287–4305. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05959.x>
18. Schafer F.Q., Buettner G.R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple // Free Radical Biology Medicine. 2001. V. 30 (11). P. 1191–1212. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00480-4](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00480-4)
19. Zechmann B. Subcellular distribution of ascorbate in plants // Plant Signaling & Behavior. 2011. V. 6 (3). P. 360–363. <https://doi.org/10.4161/psb.6.3.14342>