

УДК: 577.24

А. К. БИСЕНБАЕВ

ОКСИД АЗОТА И АНТИОКСИДАНТНЫЕ ФЕРМЕНТЫ АЛЕЙРОНОВОГО СЛОЯ ЗЕРНА ПШЕНИЦЫ

(Казахский национальный университет им. аль-Фараби,
Научно-исследовательский институт проблем биологии и биотехнологии)

Выявлена ключевая роль оксида азота в регуляции гормонозависимых процессов генерации радикалов кислорода и активности антиоксидантных ферментов. Показано, что NO существенно ингибирует ГК – индуцированную генерацию радикалов кислорода независимо от продолжительности времени инкубации алейроновой ткани. Установлено, что донор оксида азота задерживает ингибирующий эффект ГК на активность аскорбатпероксидазы за счет предотвращения окислительного повреждения клеток. Высказано предположение об антиоксидантной роли оксида азота в фитогормон-регулируемой программированной гибели клеток алейронового слоя зерна пшеницы.

Во время прорастания алейроновые слои зерна пшеницы синтезируют и секретируют ряд гидролитических ферментов (включая α -амилазу). Индукция синтеза этих гидролаз зависит от присутствия в ткани гибберелловой кислоты (ГК). Гиббереллин – зависимый синтез гидролаз – тормозится природным антагонистом этого фитогормона – абсцизовой кислотой (АБК) [1]. На последующих стадиях онтогенеза клетки алейронового слоя зерна элиминируются. Предполагается, что гибель алейроновых клеток запрограммирована, т.е. генетически детерминирована (апоптоз) [2,3].

Ранее нами выявлены и описаны морфо-биохимические признаки ПГК эндосперма и алейронового слоя зерна пшеницы [4, 5]. Установлена важная роль активных форм кислорода (АФК), таких, как супероксид (O), пероксид водорода (H_2O_2), и антиоксидантных ферментных систем (супероксиддисмутаза, аскорбатпероксидаза, каталаза и др.) в механизме реализации ПГК алейронового слоя зерна пшеницы [6].

Известно, что оксид азота (NO) играет существенную роль в регуляции программированной гибели клеток (ПГК) [6]. NO – газообразный свободный радикал, легко диффундирующий сквозь межклеточное вещество и плазматические мембраны. Являясь частью внутриклеточных мессенджерных систем, NO обладает широким спектром действия на физиологические процессы в животных системах [7].

В настоящее время накопленные в литературе данные свидетельствуют о том, что NO также участвует в многочисленных физиологических

процессах, происходящих в растениях: ответная реакция на патоген, прорастание, содержание фитогормонов, в том числе запрограммированная гибель клеток (апоптоз) [8]. В культуре клеток сои показано, что взаимодействие между NO и АФК определяет развитие ПГК. Установлено, что NO сама по себе не индуцирует гибель клеток и развитие ПГК детерминирует отношение содержания NO: супероксид. В клетках ВУ-2 табака ни H_2O_2 , ни NO по отдельности при низких концентрациях не имели эффекта ПГК и не влияли на активность фенилаланин аммоний-лиаза. При одновременном воздействии наблюдалось значительное повышение уровня клеточной гибели с характеристиками ПГК и активности фенилаланин аммоний-лиаза [9]. Более того, в этом случае повышалась активность ферментов, восстанавливающих аскорбат и глутатион. Это означает, что и H_2O_2 , и NO регулируют клеточный уровень антиоксидантов для проявления ПГК.

Приведенные данные указывают на важную роль NO и систем регуляции уровня АФК в реализации ПГК клеток растений.

В данной работе мы исследовали возможную роль оксида азота в регуляции внутриклеточного уровня радикалов кислорода и активности внутриклеточных форм антиоксидантных ферментов алейронового слоя зерна пшеницы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследованиях использовали семена пшеницы (*Triticum aestivum*) сорта Казахстанская 3. Семена с удаленными зародышами стерилизо-

вали в 1% гипохлориде натрия в течение 10 мин и несколько раз промывали дистиллированной водой. Предынкубацию половинок семян проводили в течение трех дней при 25 °С в темноте. Алейроновые слои отделяли от эндосперма шпателем, несколько раз промывали деионизированной водой и инкубировали (10–15 алейроновых слоев на 2 мл) в 0,02М натрий фосфатном буфере (рН 7,0), содержащем 1 мкМ ГК и/или 300 мкМ S-нитрозо-N-ацетилпеницилламин (SNAP). В контрольных вариантах ГК и SNAP исключали из среды инкубации. Содержание H_2O_2 определяли спектрофотометрически, по образованию комплекса титан – пероксид водорода, при 415 нм [6]. Внутриклеточную концентрацию супероксида определяли по методике, описанной в работе [10]. Электрофоретическое фракционирование изоферментов супероксиддисмутазы (СОД) и аскорбатпероксидазы (АРХ) проводили при 4 °С (напряжении 100V) в 7% ПААГ. Выявление активности СОД проводили следующим образом. После электрофореза гель инкубировали в растворе нитротетразолевого синего (2,5 мМ) в течение 20 мин. Затем гель в течение 15 мин промывали в калий-фосфатном буфере (рН 7,8), содержащем 20 мМ тетраметилэтилендиамид (ТЕМЕД), 28 мкМ рибофлавина. Зоны активности СОД проявляли после освещения геля лампой (25Вт).

Для выявления активности изоферментов АРХ гель промывали (2 раза по 15 мин) в 50 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 7,0), содержащем 2 мМ аскорбиновой кислоты. Затем гель перенесли в 50 мМ натрий фосфатный буфер (рН 7,0), содержащий 4 мМ аскорбиновой кислоты и 2 мМ пероксида водорода. Через 20 мин гель инкуби-

ровали в 50 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 7,8), содержащем 28 мМ тетраметилэтилендиамид (ТЕМЕД) и 2,45 мМ нитротетразолевого синего до появления отчетливой зоны активности АРХ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные нами эксперименты показали, что инкубация изолированного алейронового слоя в присутствии ГК в дозе 1 мкМ в течение 48 ч приводит к усилению генерации супероксида по сравнению с контролем (табл. 1). При этом дальнейшее увеличение времени инкубации в присутствии ГК (72 ч) приводило к снижению концентрации супероксида в клетках алейронового слоя по сравнению с предыдущими условиями эксперимента (48 ч инкубации), однако в этих условиях концентрация супероксида была на 39,5 % больше по сравнению с контролем. Эти эффекты ГК значительно блокировались при внесении в инкубационную среду донора оксида азота SNAP в дозе 300 мкМ.

В последующих экспериментах мы изучали влияние ГК и донора азота (SNAP) на динамику накопления пероксида водорода в алейроновом слое зерна пшеницы в зависимости от времени инкубации (рис. 1).

Как видно из рис. 1, в контрольных экспериментах (в отсутствие ГК и SNAP) внутриклеточная концентрация H_2O_2 повышалась по мере увеличения времени инкубации. При этом достоверно концентрация H_2O_2 возрастала после 48 ч инкубации. Инкубация ткани алейронового слоя с ГК в дозе 1 мкМ в течение 24 и 48 ч приводила к увеличению внутриклеточного содержания H_2O_2 приблизительно на 33 и 82 мкМ соответ-

Таблица 1. Действие донора оксида азота SNAP на гормонозависимое изменение содержания супероксида в алейроновом слое зерна пшеницы

| Образцы | Содержание супероксид-радикала (мкМ/500 мг сырой массы ткани) | | | |
|-----------------------|---|-------|------------|-------|
| | 48 ч | | 72 ч | |
| | мкМ | % | мкМ | % |
| К | 85 ± 3,4 | 100,0 | 43 ± 2,2 | 100 |
| ГК(1мкМ) | 120 ± 3,2* | 141,0 | 60 ± 4,7* | 139,5 |
| SNAP(300 мкМ) | 60 ± 5,0** | 70,5 | 34 ± 3,0 | 79,0 |
| ГК(1мкМ)+SNAP(300мкМ) | 43 ± 1,2 ** | 50,6 | 25 ± 1,7** | 58,2 |

* P < 0,05 по сравнению с контролем.

** P < 0,05 по сравнению с ГК.

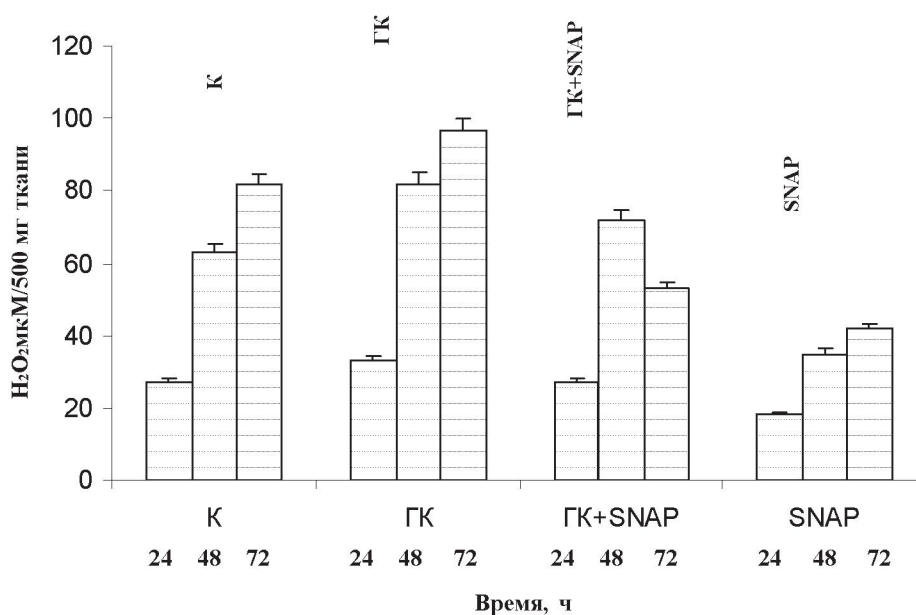


Рис. 1. Действие ГК и АБК на генерацию пероксида водорода в алейроновом слое зерна пшеницы в зависимости от времени инкубации

ственно в расчете на 0,5 г сырой ткани. Присутствие ГК в инкубационной среде в течение 72 ч приводило к существенному содержанию H_2O_2 в клетках алейронового слоя зерна пшеницы, до 120 мкМ в расчете на 0,5 г сырой ткани. Внесение к инкубируемым изолированным алейроновым тканям SNAP (300 мкМ), как и в случае с супероксид-анионом, значительно снижало этот эффект ГК в течение всего времени инкубации.

Эти результаты могут указывать на ключевую роль оксида азота в регуляции гормонозависимой генерации радикалов кислорода. При этом значительный ингибирующий эффект NO на генерацию как пероксида водорода, так и супероксида может указывать на ее антиоксидантную функцию в данной модельной системе.

Известно, что разные абиотические стрессы (засуха, экстремальные температуры, УФ и др.) индуцируют образование АФК. АФК инициируют окислительные процессы, ведущие к разрушению, и также являются триггерами для разнообразных сигнальных путей. Поэтому поддержание соответствующего внутриклеточного уровня АФК может представлять собой некий аспект выживания. NO по-разному взаимодействует с АФК и может выполнять антиоксидантную функцию при стрессах [11]. Показано, что

несмотря на то, что ранение как таковое не индуцирует образование NO, обработка донорами оксида азота ингибирует генерацию H_2O_2 , следующую за повреждением, так же как и экспрессию специфических генов, активируемых ранением [12]. Это свидетельствует о том, что NO во время патогенеза ингибирует синтез H_2O_2 и активацию сигнальных путей, индуцируемых повреждением.

Известно, что клетки алейронового слоя в связи с выполняемыми функциями (синтез и секреция гидролитических ферментов) содержат все присущие данной категории клеток структуры – развитые митохондрии, аппарат Гольджи и др. [2].

В животных системах митохондрии являются одним из основных источников АФК. Митохондрии постоянно генерируют супероксид и пероксид водорода (1–2% от общего потребления кислорода дыхательной цепи митохондрий) [10]. Показано, что генерируемые митохондриями АФК могут принимать участие в апоптозе. Вместе с тем в митохондриях имеются мощные антиокислительные системы, позволяющие клетке регулировать образование АФК и вследствие этого контролировать интенсивность процессов окислительного повреждения липидов, белков, нуклеиновых кислот и др.

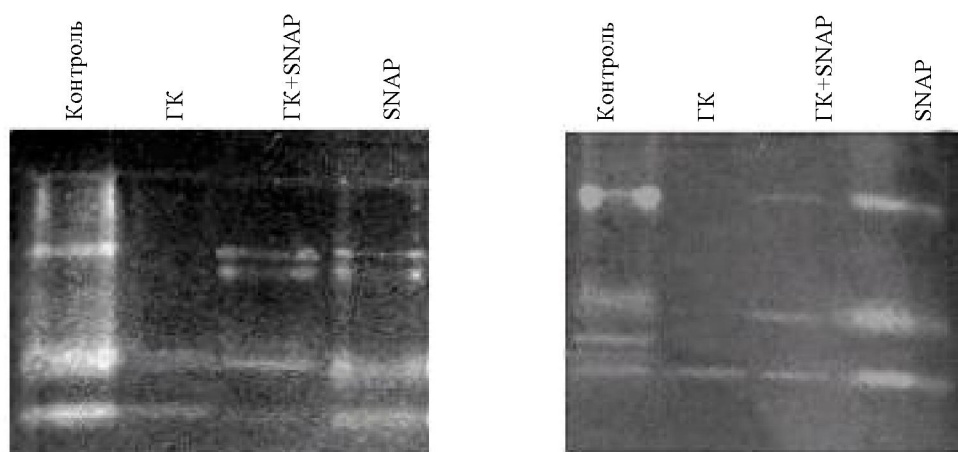


Рис. 2. Действие донора оксида азота (SNAP) на гормонозависимое изменение активности изоферментов супероксиддисмутазы алейронового слоя зерна пшеницы

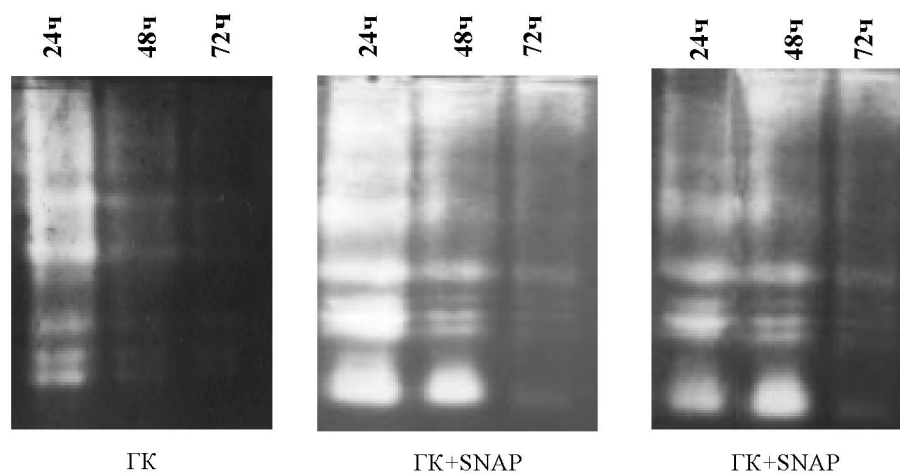


Рис. 3. Действие ГК и SNAP на активность изоферментов аскорбат пероксидазы алейронового слоя зерна пшеницы

Алейроновые клетки зерна пшеницы содержат ферменты метаболизма АФК, такие, как супероксиддисмутазы, каталаза, аскорбатпероксидаза. Новообразования этих ферментов строго контролируются фитогормонами [6]. Показано, что абсцизовая кислота усиливает активность всех внутриклеточных форм антиоксидантных ферментов, тогда как действие ГК в этой модельной системе направлено на подавление активности этих ферментов.

Для установления эффекта оксида азота на гормонозависимое изменение активности различных внутриклеточных форм антиоксидантных ферментов (СОД и АРХ) проводили фракционирование белков с помощью нативного ПААГ электрофореза с последующим выявлением зон активности фермента (рис. 2).

Как видно из рис. 2, в присутствии ГК активность СОД алейронового слоя снижалась по мере увеличения времени инкубации. Значительный ингибирующий эффект ГК на активность СОД наблюдался уже на 48 ч после инкубации. Через 72 ч инкубации активность СОД на электрофореграмме была представлена только одной более электроотрицательной белковой зоной с активностью Cu/Zn-СОД. Напротив, инкубация алейроновых слоев в присутствии ГК (1 мкМ) и SNAP (300 мкМ) в течение 48 ч имела достаточно высокий уровень активности СОД по сравнению с клетками, инкубированными только в присутствии ГК (1 мкМ). При этом через 72 ч инкубации донор оксида азота SNAP не оказывал существенного эффекта на угнетающее действие ГК на активность изоферментов СОД. Вне-

сение только SNAP в дозе 300 мкМ к инкубируемому алейроновому слою способствовало сохранению активности СОД до 72 ч.

В последующих экспериментах мы изучали влияние ГК и донора азота (SNAP) на динамику новообразования аскорбатпероксидазы в алейроновом слое зерна пшеницы (рис. 3).

Инкубация изолированного алейронового слоя с ГК (1 мкМ) в течение 48 ч существенно ингибировала активность изоферментов АРХ. Через 72 ч инкубации в присутствии ГК активность изоферментов АРХ почти не обнаруживалась на электрофореграмме. Анализ времязависимого эффекта оксида азота на эффект ГК показал, что NO задерживает ингибирующий эффект данного фитогормона. При этом через 72 ч инкубации донор оксида азота SNAP, как и в случае с супероксиддисмутазой (рис. 2), существенно не влиял на угнетающее действие ГК на активность аскорбатпероксидазы.

Приведенные данные указывают на важную роль оксида азота в регуляции активности антиоксидантных ферментов алейронового слоя зерна пшеницы. При этом оксид азота не полностью ингибирует эффект ГК на активность АРХ, а лишь задерживает действие этого фитогормона во временном отношении.

Таким образом, эти результаты могут указывать на ключевую роль оксида азота в регуляции гормонозависимых процессов генерации радикалов кислорода и активности антиоксидантных ферментов. Вероятно, NO в данной модельной системе выполняет антиоксидантную функцию. На это указывает существенное ингибирование ГК – индуцированной генерации радикалов кислорода в присутствии NO независимо от продолжительности времени инкубации алейроновой ткани. При этом ингибирующий эффект NO на генерацию радикалов кислорода не связан с активацией антиоксидантных ферментов. Вероятно, что в алейроновых клетках зерна пшеницы NO непосредственно не активирует АРХ, а лишь увеличивает продолжительность функционирования этих ферментов, предотвращая окислительное повреждение клеток. Возможно, NO действует как специфический эндогенный модулятор содержания радикалов кислорода.

Биохимический механизм регуляторного действия оксида азота на генерацию АФК в клетках

алеyroнового слоя остается невыясненным. Предложенная нами гипотетическая схема молекулярных механизмов действия оксида азота носит предположительный характер и, безусловно, требует дальнейшего изучения. Выяснение возникающих при этом вопросов и уточнений будет предметом наших дальнейших исследований.

Настоящая работа поддержана Центром биологических исследований МОН РК, грант № 4.1.2./230).

ЛИТЕРАТУРА

1. Бисенбаев А.К., Тауров М.М., Берсимбаев Р.И. Участие синтеза белка и стимулирующего действия гибберелловой кислоты на секрецию амилазы из изолированного алейронового слоя зерна пшеницы // Биохимия. 1992. Т.57, вып.12. С.1834-1840.
2. Bethke P. C., Schuurink R and Jones R. L. Hormonal signaling in cereal aleurone // J. Exp. Bot. 1997. V. 48. P. 13337-13356.
3. Fath A., Bethke P., Lonsdale J., Meza-Romero R., Jones R. Programmed cell death in cereal aleurone // Plant Molecular Biology. 2000. V. 44. P. 255-256.
4. Бисенбаев А.К., Кениев А.М., Берсимбаев Р.И. Действие гибберелловой и абсцизовой кислот на апоптоз клеток алейронового слоя зерна пшеницы // Вестник КазГУ. Сер. биол. 2001. № 1(13). С. 52-57.
5. Бисенбаев А.К., Кениев А.М., Тазабекова Ж.Ж., Берсимбаев Р.И. Онтогенетически программированная гибель клеток эндосперма созревающего зерна пшеницы // Вестник КазНУ им. аль-Фараби. Серия биологическая. 2003. №3(21). С. 40-45.
6. Бисенбаев А.К. Роль активных форм кислорода и антиоксидантных ферментов в гормонально регулируемой гибели клеток алейронового слоя зерна пшеницы // Биотехнология. Теория и практика. 2005. №4. С. 142-149.
7. Chung H.T., Pae H.O., Choi B.M., Billar T.R., Kim Y.M. Nitric oxide as bioregulator of apoptosis // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002. V.282. P.1075-10.
8. Durner J., Gow A.J., Stamler J.S., Glazebrook J. Ancient origins of nitric oxide signaling in biological systems // Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. 1999. V.96. P.14206-14207.
9. Neill S.J., Radhika D. and Hancock J.T. Nitric oxide signalling in plants // New Phytologist. 2003. V. 159. P. 11-35.
10. Jiang M., Zhang J. Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defense system and oxidative damage in leaves of maize seedlings // Plant Cell Physiol. 2001. V. 42(11). P. 1265-1273.
11. Delledonne M., Xia Y., Dixon R.A., Lamb C. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance // Nature. 1998. V. 394. P. 585-588.
12. Delledonne M., Zeier J., Marocco A., Lamb C. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response // Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 2001. V. 98.P.13454-13459.

Резюме

Бидай алейрон клеткаларында оттегінің радикалдарының жинақталуы және антиоксидантты ферменттердің әртүрлі ішкіклеткалық формаларының белсенділігінің гормондық реттелуіндегі азот тотығының рөлі анықталды. Бидай алейрон клеткаларында гиббереллинге тәуелді оттегінің радикалдарының ішкі-клеткалық мөлшерінің артуын едәуір тежейтіндігі анықталды. Азот тотығы антиоксидантты ферменттерінің функциональды белсенділігін клетканың тотығу арқылы зақымдануын тежеу арқылы ұзартатындығы көрсетілді. Алынған деректер негізінде гормональды реттелетін алейрон клеткаларының программаланған өлімінің жүзеге асу механизміндегі азот тотығының антиок-

сидантты рөлі туралы болжам жасалынды.

Summary

Important role of nitric oxide in regulation of reactive oxygen species generation and antioxidative isoenzymes activity of wheat aleurone layer was revealed. Strong inhibited effect of nitric oxide on generation reactive oxygen species generation in wheat aleurone layer was revealed. It has been shown that nitric oxide delayed activity of different intracellular forms of wheat aleurone antioxidative isoenzymes activity by inhibit of cellular oxidative damage. On the basis of obtained results antioxidative role of nitric oxide in hormonally regulated programmed cell death of wheat aleurone layer has been proposed.