

К.К. Айтлесов\* , К.М. Аубакирова , З.А. Аликулов 

Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, Казахстан, г. Астана

\*e-mail: enuter@yandex.kz

## СНИЖЕНИЕ ИНГИБИРОВАНИЯ ФЕРМЕНТОВ ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ *IN VITRO* С ПОМОЩЬЮ ПРОЛИНА

Изучена аккумуляция пролина в ответ на неблагоприятные воздействия тяжелых металлов на растения. Для выяснения роли пролина в ответной реакции растения на стресс, вызванный тяжелым металлом, изучали эффект этой аминокислоты на ингибирование нитратредуктазы *in vitro*. Была выявлена способность пролина защищать нитратредуктазу от действия цинка, меди, свинца и кадмия. Обсуждаются также и другие защитные механизмы аккумуляции пролина от стресса, вызванного тяжелыми металлами. В дополнение к антиоксидантам, соединения, называемые осмопротектантами, также играют особую роль в облегчении негативного влияния окислительного стресса, возникающего в растениях. К ним относятся глицинбетаин, пролин, маннитол. Среди них биологическая роль пролина широко распространена среди растений. Результаты настоящего исследования связаны с разработкой предпосевной обработки (прайминга) зерен различных сортов яровой пшеницы для повышения устойчивости к тяжелым металлам, урожайности и качества семян. Исследование направлено не только на повышение всхожести семян, рост и развитие их всходов в условиях воздействия тяжелыми металлами, но и на определение содержания пролина в семенах, проросших после прайминга. Прайминг в различных концентрациях раствора соли меди проводили в вышеупомянутых условиях и изучали, как изменяются уровни пролина в ростках пшеницы. Полученные результаты впервые показывают изменение соотношения антиоксидантов и осмопротектантов при окислительном стрессе, вызванном тяжелым металлом.

**Ключевые слова:** пролин, тяжелые металлы, нитратредуктаза, ингибирующая концентрация, пшеница, комплекс кадмий-пролин.

K.K. Aitlesov\*, K.M. Aubakirova, Z.A. Alikulov

L.N. Gumilyov Eurasian National University, Kazakhstan, Astana

\*e-mail: enuter@yandex.kz

### Proline-assisted reduction of enzyme inhibition of heavy metals

The accumulation of proline in response to the adverse effects of heavy metals on plants has been studied. To elucidate the role of proline in the plant response to stress induced by heavy metal, the effect of this amino acid on the inhibition of nitrate reductase *in vitro* was studied. The ability of proline to protect NR from the action of zinc, copper, lead and cadmium was found. Other protective mechanisms of heavy metal-induced proline accumulation are also discussed. In addition to antioxidants, compounds called osmoprotectants also play a special role in relieving the negative effects of oxidative stress that occurs in plants. These include glycinebetaine, proline, and mannitol. Among them, the biological role of proline is most common among plants. The results of this study are related to the development of pre-sowing processing (priming) of grains of various varieties of spring wheat to increase its resistance to heavy metals, yield and seed quality. The study is aimed not only at increasing seed germination, growth and development of their seedlings under heavy metal exposure, but also at determining the amount of proline in sprouted seeds after priming. It was carried out under the above-mentioned conditions of different concentrations of priming and copper salt solution and studied how Proline levels change in wheat sprouts. The obtained results show for the first time that the relationship between antioxidants and osmoprotectants changes during oxidative stress caused by heavy metal.

**Key words:** proline, heavy metals, nitrate reductase, inhibitory concentration, wheat, cadmium-proline complex.

К.К. Айтлесов\*, К.М. Аубакирова, З.А. Аликулов  
А.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Қазақстан, Астана  
\*e-mail: enuter@yandex.kz

### Ауыр металдардың ферменттерді ингибирлеуін пролин көмегімен *in vitro* төмендету

Мақалада ауыр металдардың өсімдіктерге қолайсыздық тудыратын әсеріне жауап ретінде пролиннің жинақталуы зерттелді. Өсімдіктердің ауыр металдар тудыратын стресске жауап реакциясындағы пролиннің рөлін анықтау үшін осы амин қышқылының нитратредуктаза ферментінің тежелуіне тигізетін әсері *in vitro* жағдайында зерттелді. Пролиннің нитратредуктазаны мырыш, мыс, қорғасын және кадмийдің әсерінен қорғай алатын қабілеті анықталды. Ауыр металдардың әсерінен пайда болатын пролиннің жинақталуының қорғаныстық механизмдері талқыланды. Антиоксиданттардан басқа осмопротектанттар деп аталатын қосылыстар да өсімдіктерде пайда болатын тотығу стресінің кері әсерін жеңілдетуде ерекше рөл атқарады. Оларға глицинбетаин, пролин, маннитол жатады. Олардың ішінде пролиннің биологиялық рөлі өсімдіктердің арасында кең тараған. Осы зерттеудің нәтижелері жаздық бидайдың әртүрлі сұрыптарының дәндерінің ауыр металдарға төзімділігін, тұқымның өнімділігі мен сапасын арттыру үшін себу алдында өңдеумен (прайминг) байланысты. Зерттеу тек тұқым өнгіштігін арттыруға, ауыр металмен әсер ету жағдайында олардың көшеттерінің өсуі мен дамуына ғана емес, сонымен қатар праймингтен кейін өсіп шыққан тұқымдарда пролин мөлшерін анықтауға бағытталған. Мыс тұзы ерітіндісінің әртүрлі концентрацияларының жоғарыда айтылған жағдайларында Прайминг жүргізіліп, бидай өскіндеріндегі пролин деңгейлерінің қалай өзгеретіні зерттелді. Алынған нәтижелер алғаш рет ауыр металл тудыратын тотығу стресі кезіндегі антиоксиданттар мен осмопротектанттардың арақатынастарының өзгеретінін көрсетіп отыр.

**Түйін сөздер:** пролин, ауыр металдар, нитратредуктаза, ингибиторлық концентрация, бидай, кадмий-пролин кешені.

#### Сокращения и обозначения

НР – нитратредуктаза; ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота; НАДН – никотинамидадениндинуклеотид

#### Введение

Неблагоприятные условия окружающей среды вызывают стресс в растениях, а это в свою очередь – аккумуляцию метаболитов. Аминокислота-пролин больше всего распространен среди таких метаболитов. Было показано, что пролин аккумулируется в условиях недостатка воды, засоления, похолодания, высокой температуры [1] и воздействия тяжелых металлов [2]. Известно, что пролин играет главную роль в осморегуляции и осмоустойчивости растительной клетки [3].

Важное значение для жизнедеятельности растений в условиях засоления имеет изменение водно-осмотического режима, особенно степень осморегуляции растений. Увеличения осмотического потенциала клеточного сока сопровождается повышением концентрации в клетке осмолитов, таких как пролин, полиамин, органические кислоты и другие низкомолекулярные соединения. Первостепенную роль в росте устойчивости растений, последо-

вательно воздействию факторов стресса отводится повышенному содержанию пролина. Было установлено, что в устойчивости к неблагоприятным условиям окружающей среды важную роль играет не только сам пролин, но и его производные. Их экзогенное добавление в объект эффективно действует на устойчивость растения. Например, некоторые растения рода *Melaleuca*, эндемики Австралии, отличаются способностью выдерживать стрессы окружающей среды. Их устойчивость к стрессам связано с аккумуляцией большого количества аналогов пролина. К ним относятся N-метилпролин, транс-4-гидрокси-N-метилпролин и транс-4-гидрокси-N-диметилпролин. Эти осмопротектанты можно легко экстрагировать из растений, и обрабатывать ими семена и опрыскивать листья для повышения устойчивости растения к биотическим стрессам. По данным урожайности растений использование этих веществ принесло 18000 долларов США с каждого гектара [4,5,6].

Хотя известно то, что высокая концентрация тяжелых металлов вызывает аккумуляцию пролина, однако, до сих пор остается не выясненным механизм действия пролина, обеспечивающий защиту ферментов от токсичных металлов. Тем не менее предполагается, что пролин может иметь различные механизмы защиты растительных ферментов от тяжелых металлов. Ранее

нами было показано, что тяжелые металлы такие, как кадмий, медь и цинк ингибируют *in vivo* активность нитратредуктазы (НР) [4].

Целью нашей работы является изучение эффекта пролина на ингибирование ферментов тяжелыми металлами. В качестве объекта исследования мы выбрали молибденосодержащий фермент-нитратредуктазу (НР, ЕС 1.6.6.2) из корней пшеницы. На данный момент нет сведений, что субстрат (нитрат) или продукт (нитрит) этого фермента может взаимодействовать с тяжелыми металлами, снижая их ингибирующее действие.

### Материалы и методы

Для того, чтобы исключить нежелательное комплексобразование тяжелых металлов другими белками безклеточного экстракта растений, мы очищали НР корней пшеницы хорошо разработанными методами. Для получения препарата НР, проростки пшеницы проращивались в течение 8 дней в среде, содержащей 0,5 мМ нитрата. Корни после тщательной промывки дистиллированной водой гомогенизировали в 0,1 М натрий-фосфатном буфере, содержащем 3 мМ дитиотрейтола, 10 мМ люпептина, 10 мМ фенолметилсульфонилфлуорида и 1 мМ ЭДТА. Для получения высокоочищенного препарата НР: 1) экстракт корней высаливали 35% сульфатом аммония, 2) обессоленный гельфильтрацией препарат НР абсорбировали на голубую сефарозу («Bio-Rad», USA), 3) из сефарозы фермент элюировали 10 мМ НАДН. Определение активности НР проводили согласно методу Savidov и другие [5].

Эксперимент проводился в лабораторных условиях при средней дневной / ночной температуре 20/18°C, относительной влажности воздуха от 50 до 55% и освещенности окружающей среды. Образцы были собраны через 7 дней. Для измерения критериев роста было отобрано 70 растений, а для определения свободного пролина и супероксиддисмутазы были взяты 30 другие пробы. Были описаны морфологические признаки измеряли длину корня и стеблей каждого растения и получены снимки. Статистическую обработку групп данных проводили в приложении Excel. Значимость различий оценивали по *p*-value ( $p \leq 0.05$ ).

### Результаты и обсуждение

В каждой комбинации кадмия и пролина концентрация свободного кадмия измерялась с

использованием электрода, специфического для иона кадмия «Orion, model 94-48» и с двойным перекрестным электродом «Orion, model 92-02» [6]. Поскольку при концентрации кадмия ниже 1,0 мМ теряется корреляция между показаниями электрода и концентрациями этого металла, мы не определяли количество свободного кадмия, когда его концентрация была ниже чем 2,0 мМ. Измерения проводились в 25 мл буфера, используемого для очистки и определения активности НР.

НР ингибируются цинком, медью, свинцом и кадмием в разной степени в зависимости от их концентрации (рис.1). Самыми сильными ингибиторами оказались кадмий и свинец, хотя для ингибирования фермента требовалась более высокая концентрация свинца. Цинк и медь показали очень слабый ингибирующий эффект на НР. Например, для одинакового ингибирования активности фермента требовалась такая концентрация цинка, которая более чем в 2000 раз превосходила концентрацию кадмия (рис. 1).

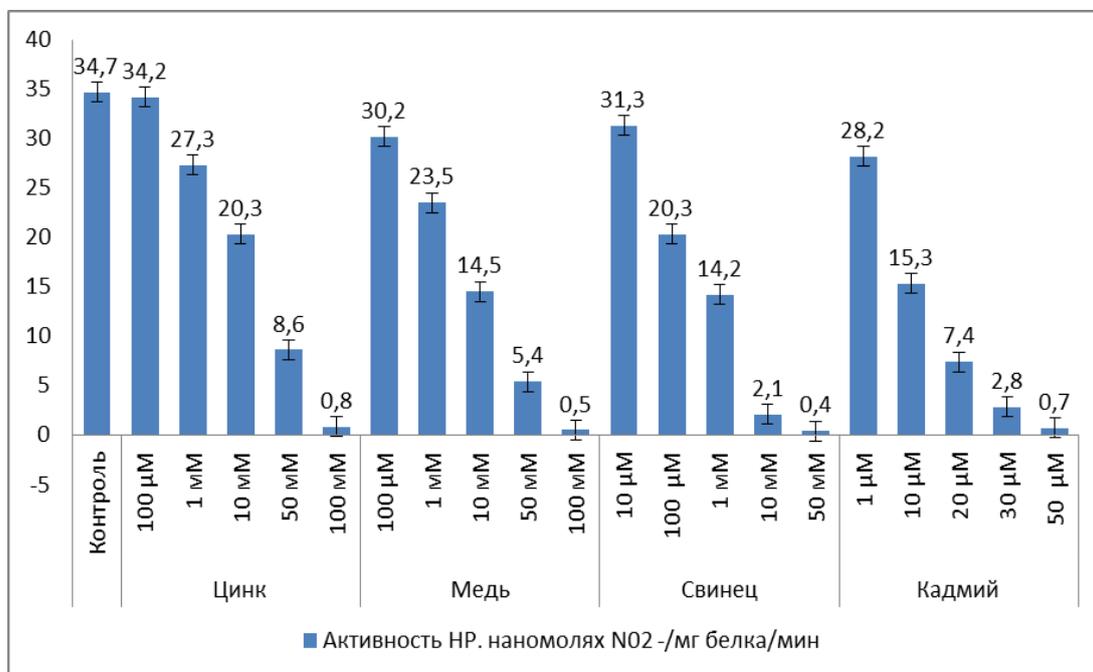
В дальнейших экспериментах, для изучения эффекта пролина был использован самый сильный ингибитор среди тяжелых металлов – кадмий. Были изучены различные концентрации пролина на возможную защиту активности НР от действия этого тяжелого металла (рис. 2). Для этой цели нами была испытана сильно ингибирующая концентрация кадмия (40  $\mu$ М).

Как видно из 2 рисунка, с возрастанием концентрации пролина, его защитный эффект для активности НР от ингибирующего действия тяжелого металла возрастает. Но эти эксперименты не объясняли механизма защитного действия пролина. Поэтому, в следующих экспериментах нами была сделана попытка выяснить возможные механизмы защитного действия пролина.

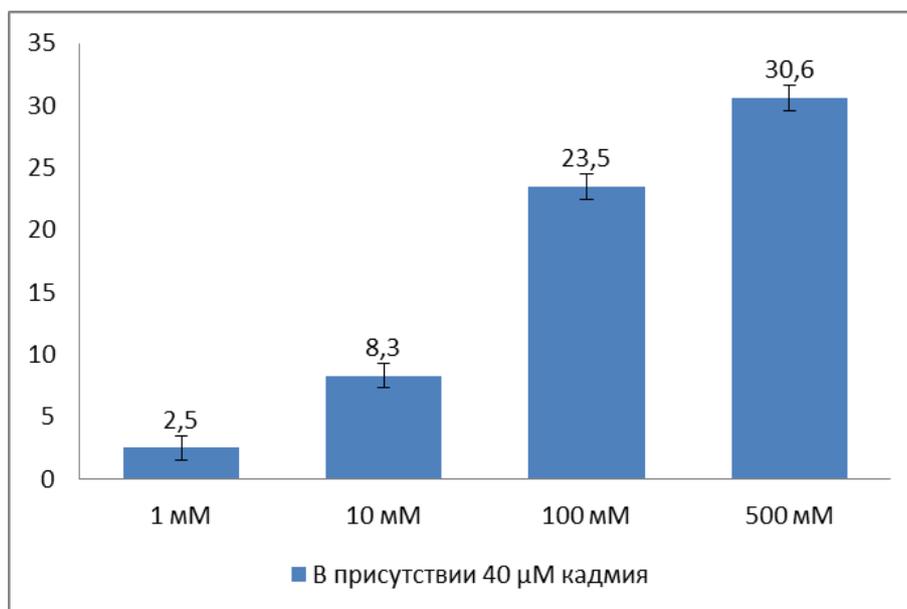
Предварительно инкубированную смесь 50 мМ кадмий + 0,5 М пролин хроматографировали через ионообменник Dowex-1 («Sigma»). При этом комплекс пролин-кадмий хорошо отделялся от свободного кадмия и пролина. Использование электрода, специфического для кадмия показало, что при прединкубации пролин эффективно восстанавливает свободный кадмий, содержащийся в смеси. Расчеты ингибирования активности НР показывают, что степень ингибирования зависит только от концентрации свободного кадмия в реакционной смеси, а концентрация свободного пролина не давала видимого эффекта на активность фермента. С другой стороны, уровень ингибирования активности НР комплексом пролин-кадмий от связанного с пролином метал-

ла была выражена в меньшей степени (рис. 3). Наблюдаемая токсичность комплекса кадмий-пролин в НР-тест системе, по-видимому, происходит из-за его постепенной диссоциации на

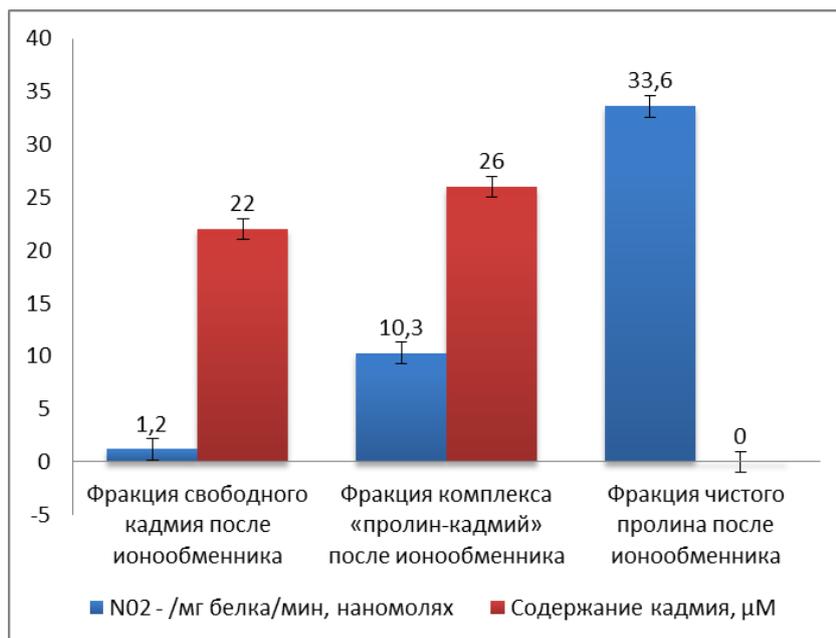
свободные кадмий и пролин. Это видно из того, что при хранении при комнатной температуре, ингибирующая способность комплекса пролин-кадмий постепенно повышается.



**Рисунок 1** – Ингибирование НР активности различными концентрациями цинка, меди, свинца и кадмия. Активность НР в нанолях NO<sub>2</sub> /мг белка/мин



**Рисунок 2** – Влияние различных концентраций пролина в защите активности НР от ингибирования кадмием. Активность НР в нанолях NO<sub>2</sub> /мг белка/мин



**Рисунок 3** – Влияние свободного кадмия, комплекса «кадмий-пролин» и чистого пролина на активность НР

А при очень высокой концентрации пролина в смеси (50 мМ кадмий + 0,5 М пролин), комплекс пролин-кадмий не проявляет ингибирующую активность. По-видимому, не происходит какого-либо взаимодействия пролина белком фермента, которое, как предполагалось ранее, защищает фермент при засолении и экстремальных температурах [7,8,9,10].

Несмотря на полученные результаты, возникает вопрос о том, что является главной функцией аккумуляции пролина *in vivo*: индуцируемый металл, либо хелатирование токсичного металла. Это кажется маловероятным, прежде всего, из-за довольно низкой стабильности чистого комплекса «металл-пролин». Если даже пролин может быть аккумулятирован до очень высокой концентрации, металлы такие как кадмий и медь, имеющие высокое сродство к сере, в первую очередь связываются с тиолами при цитоплазматическом значении рН. Более того, эти металлы сильные индукторы синтезов фитохелатинов [7,11,12]. Например, более чем на 95% водорастворимого кадмия связывается с фитохелатинами за такое время экспозиции, когда синтезируется максимальное количество пролина [13,14,15]. Таким образом, маловероятно, что аккумуляция пролина, вызванного тяжелыми металлами, играет роль в детоксификации клетки от тяжелых металлов.

## Заключение

По-видимому, возможная роль аккумуляции пролина в присутствии тяжелых металлов необязательно связана с хелатированием металла. Во-первых, тяжелые металлы обычно нарушают водный баланс в клетке. Хорошо известно, что дефицит воды всегда вызывает аккумуляцию пролина в растительной клетке [16,17]. Функция аккумуляции пролина, вызванного тяжелыми металлами, скорее всего ассоциирована с осморегуляцией и защитой ферментов от обезвоживания, чем прямое хелатирование металла. В настоящее время хорошо известно, что неблагоприятные факторы окружающей среды такие как, засоление, засуха и холод, вызывают обезвоживание клеток растений. При обезвоживании происходит сморщивание плазматической мембраны клеток и внутриклеточных органоидов, в первую очередь митохондрий и хлоропластов, а такое конформационное изменение структуры мембраны вызывает дезинтеграцию мембранных белков. А дезинтеграция мембранных белков в дыхательной цепи обязательно приведет к образованию кислородных радикалов. Токсичные металлы могут повысить образование свободных кислородных радикалов, включая гидроксильный. Во-вторых, как ранее было

показано, в этом случае пролин действует в качестве «уборщика» гидроксильного радикала *in vitro* [8]. Таким образом, защитная функция пролина для ферментов, возможно, главным образом связана с его антиоксидантным свойством.

### Литература

1. Mattioni C., Lacerenza N.G., Troccoli A., DE Leonardis A.M., Di Fonzo N. Water and salt stress – induced alterations in proline metabolism of *Triticum durum* seedlings. *Physiol. Plant.* – 1997. – Vol. 101. – P. 787-792.
2. Saradhi F., Sarahdi P.P. Proline accumulation under heavy metal stress // *J. Plant Physiol.* – 1991. – Vol. 138. – P. 554-558.
3. Skriver K., Mundy J. Gene expression response to abscisic acid and osmotic stress // *Plant Cell.* – 2017. – Vol. 2. – P. 503-512.
4. Alikulov Z., Savidov N.K., Lips H. Molybdenum protects wheat seed germination against heavy metals. – 2th Fohs Biostress Symposium. – Moscow, 1996. – P. 57.
5. Savidov N, Alikulov Z, Lips H Identification of an endogenous NADPH-regenerating system coupled to nitrate reduction *in vitro* in plant and fungal crude extracts // *Plant Science.* – 1998. – Vol. 135. – P. 161.
6. Schat.H., Sharma.S.S. and Vooijs.R. Heavy metals and osmolyte accumulation in plant roots// *Physiologia Plantarum.* – 1997. – Vol. 101. – P. 477-481.
7. Mendum M.L., Gupta S.C., Goldsbrough P.B. Effect of glutathione on phytochelatin synthesis in tomato cells // *Plant Physiol.* – 1990. – Vol. 93. – P. 484-488.
8. Smirnov N and Cumbes Q.J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes // *Pytochemistry.* -1989. – Vol. 28. – P. 1057.
9. Guo G., Lei M., Wang Y., Song B., Yang J. Accumulation of As, Cd, and Pb in sixteen wheat cultivars grown in contaminated soils and associated health risk assessment // *Int. J. Environ. Res. Publ. Health.* – 2018. – Vol. 15. – P. 231-235.
10. Rai P.K., Lee S.S., Zhang M., Tsang Y.F., Kim K.H. Heavy metals in food crops: health risks, fate, mechanisms and management // *Environ. Int.* – 2019. Vol. 125. – P. 365-385.
11. Singh S., Parihar P., Singh R., Singh V.P., Prasad S.M. Heavy metal tolerance in plants: role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics // *Front. Plant Sci.* – 2015. – Vol. 6. – P. 1143.
12. Pintilie O., Zaharia M., Cosma A., Butnaru A., Murariu M., Drochioiu G., Sandu I., Assay I. Effect of heavy metals on the germination of wheat seeds: Enzymatic The Annals of “Dunarea De Jos” // *University of Galati Fascicle IX, Metallurgy Mater Sci.* – 2016. – Vol. 1. – P. 245-248.
13. Rizvi A., Ahmed B., Zaidi A., Khan M.S. Heavy metal mediated phytotoxic impact on winter wheat: oxidative stress and microbial management of toxicity by *Bacillus subtilis* // *BM2, RSC Adv.* – 2019. – Vol. 9. – P. 6125-6142.
14. Mohammad J.K., Muhammad T., Khalid K. Effect of organic and inorganic amendments on the heavy metal content of soil and wheat crop irrigated with wastewater // *Sarhad J. Agric.* – 2013. Vol. – 29. – P. 145-152.
15. Pizzeghello D., Francioso O., Ertani A., Muscolo A., Nardi S. Isopentenyl adenosine and cytokinin-like activity of different humic substances // *J. Geochem. Explor.* – 2013. – Vol. 129. – P. 70-75.
16. Osuna D., Prieto P., Aguilar M. Control of Seed Germination and Plant Development by Carbon and Nitrogen Availability // *Front. Plant Sci.* – 2015. – <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01023>
17. Babenko O., Alikulov Z. The seed germination, growth and development of wheat (*Triticum aestivum* L.) under the influence of seed priming with molybdate and tungstate // *Science and World.* – 2014. – Vol. 2, No 6. – P. 102-105.

### References

1. Mattioni C., Lacerenza N.G., Troccoli A., DE Leonardis A.M., Di Fonzo N. (1997) Water and salt stress – induced alterations in proline metabolism of *Triticum durum* seedlings. *Physiol. Plant.*, vol. 101, pp. 787-792.
2. Saradhi F., Sarahdi P.P. (1991) Proline accumulation under heavy metal stress. *J. Plant Physiol.*, vol. 138, pp. 554-558.
3. Skriver K., Mundy J. (2017) Gene expression response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell.* , vol. 2, pp. 503-512.
4. Alikulov Z., Savidov N.K., Lips H. (1996). Molybdenum protects wheat seed germination against heavy metals. 2th Fohs Biostress Symposium, Moscow. pp. 57.
5. Savidov N, Alikulov Z, Lips H. (1998) Identification of an endogenous NADPH-regenerating system coupled to nitrate reduction *in vitro* in plant and fungal crude extracts. *Plant Science.*,vol. 135, pp. 161.
6. Schat.H., Sharma.S.S. and Vooijs.R. (1997) Heavy metals and osmolyte accumulation in plant roots. *Physiologia Plantarum.*, vol. 101, pp. 477-481.
7. Mendum M.L., Gupta S.C., Goldsbrough P.B. (1990) Effect of glutathione on phytochelatin synthesis in tomato cells. *Plant Physiol.*, vol. 93, pp. 484-488.
8. Smirnov N and Cumbes Q.J. (1989) Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Pytochemistry.*, vol. 28, pp. 1057.
9. Guo G., Lei M., Wang Y., Song B., Yang J. (2018) Accumulation of As, Cd, and Pb in sixteen wheat cultivars grown in contaminated soils and associated health risk assessment. *Int. J. Environ. Res. Publ. Health*, vol. 15, pp.231-235.

10. Rai P.K., Lee S.S., Zhang M., Tsang Y.F., Kim K.H. (2019) Heavy metals in food crops: health risks, fate, mechanisms and management. *Environ. Int.*, vol. 125, pp. 365-385.
11. Singh S., Parihar P., Singh R., Singh V.P., Prasad S.M. (2015) Heavy metal tolerance in plants: role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics. *Front. Plant Sci.*, vol. 6, pp. 1143.
12. Pintilie O., Zaharia M., Cosma A., Butnaru A., Murariu M., Drochioiu G., Sandu I., Assay I. (2016) Effect of heavy metals on the germination of wheat seeds: Enzymatic The Annals of "Dunarea De Jos". University of Galati Fascicle IX, Metallurgy Mater Sci., vol. 1, pp. 245-248.
13. Rizvi A., Ahmed B., Zaidi A., Khan M. S. (2019) Heavy metal mediated phytotoxic impact on winter wheat: oxidative stress and microbial management of toxicity by *Bacillus subtilis*. BM2, RSC Adv., vol. 9. pp. 6125-6142.
14. Mohammad J.K., Muhammad T., Khalid K. (2013) Effect of organic and inorganic amendments on the heavy metal content of soil and wheat crop irrigated with wastewater. *Sarhad J. Agric.*, vol. 29. pp. 145-152.
15. Pizzeghello D., Francioso O., Ertani A., Muscolo A., Nardi S. (2013) Isopentenyl adenosine and cytokinin-like activity of different humic substances. *J. Geochem. Explor.*, vol. 129, pp. 70-75.
16. Osuna D., Prieto P., Aguilar M. (2015). Control of Seed Germination and Plant Development by Carbon and Nitrogen Availability. *Front. Plant Sci.* | <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01023>
17. Babenko O., Alikulov Z. (2014) The seed germination, growth and development of wheat (*Triticum aestivum* L.) under the influence of seed priming with molybdate and tungstate // *Science and World.*, vol. 2, no 6, pp. 102-105.