

Б.С. Джолдыбаева, Н.А. Алтыбаева, А.К. Бисенбаев

ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ЭКЗОГЕННОЙ H_2O_2 НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК АЛЕЙРОНОВОГО СЛОЯ ЗЕРНА ПШЕНИЦЫ

(Казахский национальный университет им. аль-Фараби, НИИ Проблем биологии и биотехнологии)

В данной работе показано, что в присутствии гибберелловой кислоты интактные алейроновые ткани обладают значительной способностью к утилизации экзогенно добавленной H_2O_2 в течение первых 24 часов инкубации. Дальнейшее увеличение времени инкубации в присутствии ГК приводит к значительному снижению способности к утилизации экзогенно добавленной H_2O_2 . Напротив, обработанные абсцизовой кислотой интактные алейроновые ткани сохраняют способность к утилизации H_2O_2 в течение всего времени инкубации. Действие ГК сопровождается максимальным снижением активности СОД. АБК в клетках алейронового слоя, возможно, задерживает генерацию $O_2\cdot$ за счет усиления активности СОД. Наблюдается строгая корреляция между сроком наступления ПГК алейронового слоя, генерацией $O_2\cdot$ и изменением активности СОД

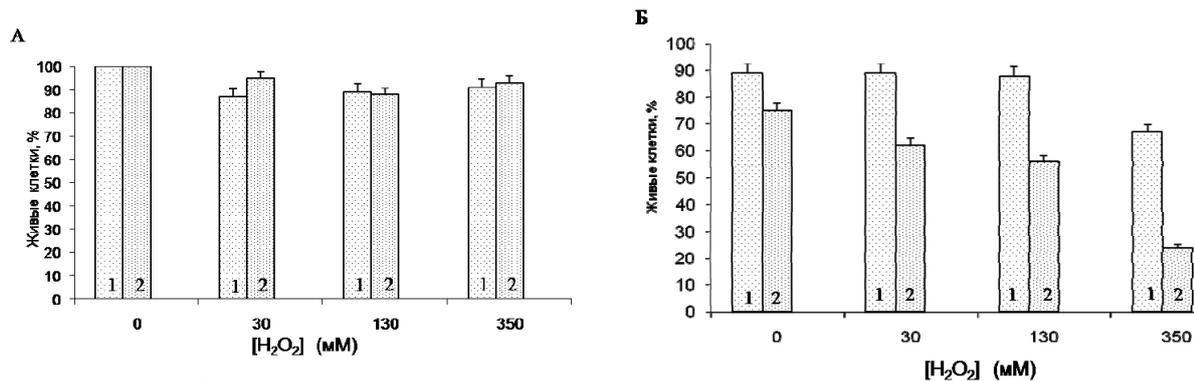
Радикалы кислорода являются продуктами клеточного метаболизма. Они в относительно большом количестве синтезируются в митохондриях, хлоропластах, пероксисомах и на плазматических мембранах. Супероксидные радикалы генерируются не только в процессе дыхания при выработке АТФ, но и при аутоокислении, когда молекулярный кислород присоединяется к разным окисляемым биомолекулам [1]. Высокой химической активностью отличается гидроксильный радикал – $\cdot OH$, образующийся в результате взаимодействия $O_2\cdot$ с H_2O_2 - наиболее стабильной формой восстановленного кислорода (цикл Хабера-Вейсса). Гидроксильный радикал почти мгновенно - в течение 7×10^{-10} секунд - вступает в реакции с белками, нуклеиновыми кислотами, липидами, разрушая клеточные структуры, способствуя образованию продуктов окисления - перекисей, альдегидов, кетонов [2].

В клетках растений имеются ферментативные системы, действие которых направлено как на продукцию АФК (НАДФН оксидаза, пероксидаза, оксалактоксидаза, ксантиноксидаза и др.), так и на интенсивный метаболизм АФК (супероксиддисмутаза, аспартатпероксидаза, каталаза и др.). Супероксиддисмутаза (СОД) катализирует реакцию дисмутации - взаимодействие двух супероксидных радикалов друг с другом, превращая токсичный $O_2\cdot$ в менее токсичную H_2O_2 . Аскорбат пероксидаза (АПО) и каталаза катализируют реакцию дисмутации H_2O_2 до H_2O [3-5].

Ранее нами выявлена гормональный характер регуляции внутриклеточного уровня радикалов кислорода в клетках алейронового слоя зерна пшеницы [6;7]. Показано, что гибберелловая кислота (ГК) усиливает, а природный антагонист этого фитогормона – абсцизовая кислота (АБК) наоборот снижает генерацию $O_2\cdot$ и H_2O_2 в клетках алейронового слоя зерна пшеницы. Зависит ли интенсивность метаболизма радикалов кислорода в клетках алейронового слоя зерна пшеницы от присутствия ГК и АБК в инкубационной среде? Насколько генерируемые радикалы кислорода влияют на жизнеспособность клеток алейронового слоя зерна пшеницы?

Для выяснения этих вопросов нами были проведены специальные опыты по изучению действия экзогенно добавленного H_2O_2 на жизнеспособность обработанных ГК и АБК клеток алейронового слоя зерна пшеницы. Для этого алейроновые слои инкубировали в течение 24, 48 и 72 часов, затем в инкубационную среду вносили различные дозы H_2O_2 (0-350мМ) и через 60 минут анализировали жизнеспособность клеток алейронового слоя с помощью исключения метиленового синего. Как видно из данных приведенных на рисунке 1 и 2, независимо от продолжительности времени инкубации (24, 48 и 72 часа), обработанные АБК (5мкМ), алейроновые клетки проявили устойчивость к 60 минутному действию различных доз экзогенно добавленной H_2O_2 . Значительное снижение жизнеспособности клеток алейронового слоя обработанных АБК наблюдалась при дозе H_2O_2 350 мМ.

Ответ ГК - обработанных клеток алейронового слоя зерна пшеницы к различным дозам H_2O_2 зависел от продолжительности присутствия ГК в инкубационной среде. Клетки алейронового слоя, инкубированные в присутствии ГК в течение 24 часов, оказались более устойчивыми почти ко всем исследуемым дозам H_2O_2 . Последующее увеличение времени инкубации алейроновой ткани с ГК (48 и 72 часа) сопровождалось значительным увеличением чувствительности клеток ко всем использованным дозам H_2O_2 (рисунки 1 и 2). При этом необходимо отметить, что снижение жизнеспособности обработанных ГК клеток алейронового слоя в течение 72 часов наблюдалось и в отсутствие H_2O_2 (рисунок 2).



А – инкубация алейроновой ткани в течение 24 часов; Б – инкубация алейроновой ткани в течение 48 часов; 1 - АБК (5 мкМ); 2 - ГК (1 мкМ).

Рисунок 1 – Эффект различных доз экзогенной H₂O₂ на жизнеспособность клеток алейронового слоя зерна пшеницы в зависимости от продолжительности присутствия ГК и АБК в инкубационной среде

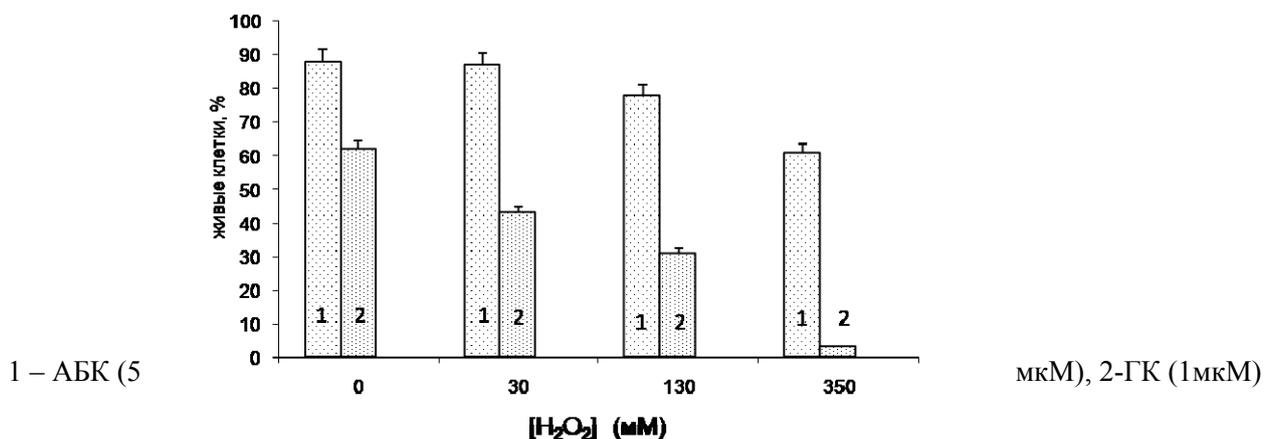


Рисунок 2 - Эффект различных доз экзогенной H₂O₂ на жизнеспособность клеток алейронового слоя зерна пшеницы инкубированных в присутствии ГК и АБК в течение 72 часов

Таким образом, существует строгая корреляция между изменением внутриклеточной концентрации АФК и радикал - метаболизирующей активностью (H₂O₂) клеток алейронового слоя зерна пшеницы на фоне характерных для апоптоза фрагментации геномной ДНК [8; 9]. В присутствии ГК интактные алейроновые ткани обладают значительной способностью к утилизации экзогенно добавленной H₂O₂ в течение первых 24 часов инкубации. Дальнейшее увеличения времени инкубации в присутствии ГК приводит к значительному снижению способности к утилизации экзогенно добавленной H₂O₂.

Напротив, обработанные АБК интактные алейроновые ткани сохраняют способность к утилизации H₂O₂ в течение всего времени инкубации. Возможно, регуляция активности ферментов антирадикальной защиты являются ключевым звеном в определении внутриклеточного уровня АФК в клетках алейронового слоя зерна пшеницы.

Можно предположить, различия в генерации O₂• и H₂O₂ времени действия ГК обеспечивается переходом O₂• в H₂O₂ за счет активации реакции катализируемой СОД. При этом следует отметить, что увеличение в клетке концентрации H₂O₂, образовавшейся в результате супероксиддисмутазной реакций, представляет для клетки не меньшую опасность, чем увеличение O₂• из-за возможности образования •ОН. Поэтому необходима ее постоянная инактивация в реакции, катализируемой каталазой.

Как отмечалось выше, одним из главных компонентов ферментативного звена системы утилизации АФК клеток является СОД. Более 80% активности СОД определяется в цитозоле, а остальные 20% - в органоидах, главным образом, в митохондриях.

Характерной особенностью клеток растений, отличающих их от клеток других организмов, является наличие всех трех изоформ. В клетках животных, фермент присутствуют только в виде CuZnСОД и MnСОД, а в клетках прокариот - FeСОД и MnСОД. В растениях существуют все три изоформы - CuZnСОД, FeСОД и MnСОД [10; 11]. Изоформы СОД отличаются разной чувствительностью к ингибиторам CN⁻ и H₂O₂. Так, CuZnСОД ингибируется CN⁻ и H₂O₂, FeСОД - только H₂O₂, а MnСОД невосприимчива к обоим ингибиторам [10].

В связи с этим в последующих экспериментах с использованием KCN и H₂O₂ выявляли различные формы СОД алейронового слоя зерна пшеницы.

Для этого белковые образцы до нанесения на дорожку, инкубировали в свежеприготовленном растворе 4мМ KCN или 5мМ H₂O₂ в течение 30 минут при температуре 4⁰С. Затем белковые экстракты фракционировали с помощью нативного ПААГ электрофореза (рисунок 3).

Ингибиторный анализ выявил одну белковую зону на ПААГ устойчивую как к KCN, так и H₂O₂ (MnСОД) и одну полосу с активностью FeСОД (устойчивый к KCN, но чувствительный к H₂O₂). Присутствие в инкубационной среде H₂O₂ и KCN позволило выявить около 5 форм CuZnСОД (чувствительное к обоим ингибиторам).

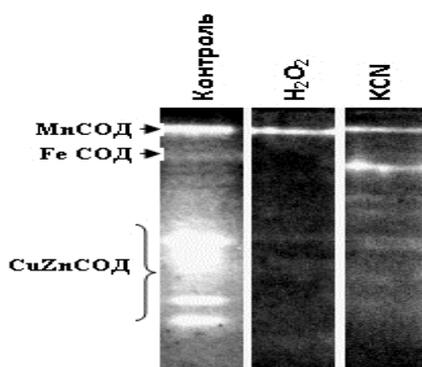
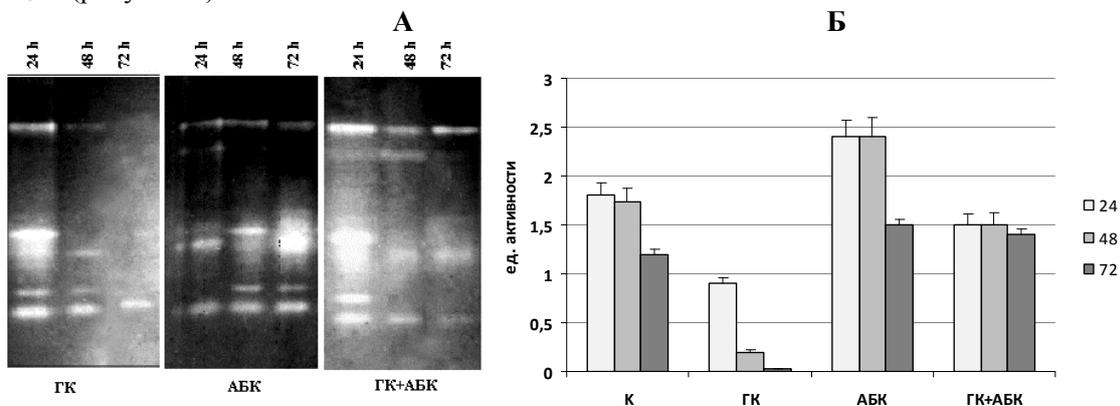


Рисунок 3 - Чувствительность изоферментов СОД алейронового слоя зерна пшеницы к ингибиторам KCN и H₂O₂

Таким образом, результаты этих экспериментов позволили выявить наличие в клетках алейронового слоя зерна пшеницы всех трех изоформ СОД (CuZnСОД, MnСОД и FeСОД).

Сопоставление динамики изменения активности и степени генерации радикалов кислорода в ходе ПГК позволяет более или менее определенно судить о времени индукции и/или активации индивидуальных СОД, ответственных за утилизацию O₂[•]. В связи с вышеизложенными данными, интересно было исследовать динамику изменения активации СОД в зависимости от времени инкубации (рисунок 4).



Примечание: А - изменение активности зоферментов СОД ; Б - изменение общей ферментатив-ной активности СОД.

Рисунок 4 - Динамика изменения активности СОД алейронового слоя зерна пшеницы

Как видно из данных представленных на рисунке 4 А, в присутствии ГК активность изоферментов СОД алейронового слоя снижалось по мере увеличения времени инкубации. Значительный ингибирующий эффект ГК на активность СОД наблюдалось на 48 час после инкубации. После 72 часа инкубации видна только одна электроотрицательная белковая зона с активностью Cu/Zn-СОД. Анализ время зависимого эффекта АБК показал, что АБК усиливает активность всех внутриклеточных форм СОД независимо от продолжительности времени инкубации. Внесение АБК в дозе 5мкМ к инкубируемым в присутствии ГК алейроновым слоям полностью блокировало ингибирующий эффект ГК на активность внутриклеточных форм СОД.

Эксперименты по количественному анализу активности СОД показали, что инкубация ткани алейронового слоя с ГК в дозе 1мкМ в течение 24 и 48 часов приводит к снижению активности СОД приблизительно на 73%, по сравнению с контролем (рисунок 4 Б). Присутствие ГК в инкубационной среде в течение 72 часов приводило к существенному снижению общей ферментативной активности СОД (рисунок 4 Б). Внесение к инкубируемым изолированным алейроновым тканям в течении 24, 48 и 72 часов АБК (5 мкМ) полностью снимало этот эффект ГК. При этом наблюдалось значительное увеличение активности СОД как по сравнению с контролем, так и действием только ГК. Внесение в инкубационную среду только АБК в дозе 5 мкМ приводило к существенному повышению общей ферментативной активности СОД в гомогенате в течение всего времени инкубации (рисунок 4 Б).

Результаты указывают на фитогормональный характер регуляции генерации $O_2\bullet$ и активности СОД алейронового слоя зерна пшеницы. Под действием ГК в клетках алейронового слоя зерна пшеницы происходит существенное увеличение содержания активных форм кислорода. Действие ГК сопровождается максимальным снижением активности СОД. АБК в клетках алейронового слоя, возможно, задерживает генерацию $O_2\bullet$ за счет усиления активности СОД. Наблюдается строгая корреляция между сроком наступления ПГК алейронового слоя, генерацией $O_2\bullet$ и изменением активности СОД [7].

1. Harris C.M., Massey V. The oxidative half-reaction of xanthine dehydrogenase with NAD; reaction kinetics and steady state mechanism // J. Biol. Chem. - 1997. - Vol. 272. - P. 28335-28341.
2. Gechev T.S. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death // Journal of Experimental Botany. - 2010. - Vol. 61 (2). - P. 473-482.
3. Kuk Y.I., Shin J.S., Burgos N., Hwang T., Han O., Cho B.H., Jung S., Guh J.O. Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice plants // Crop. Sci. - 2003. - Vol. 43. - P. 2109-2117.
4. Rauchova H., Vokurkova M., Koudelova J. Developmental changes of erythrocyte catalase activity in rats exposed to acute hypoxia // Physiol. Res. - 2005. - Vol.54(5). - P.527-532.
5. Kvaratskhelia M., Winkel C., Thornclay R. Purification and characterization of a novel class III peroxidase isoenzyme from tea leaves // Plant Physiology. - 1997. - Vol.114. - P.1237-1245.
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. Бисенбаев А.К., Altybaeva N.A., Kolbaeva G.A. Role of reactive oxygen species and antioxidant enzymes in hormone regulating programmed cell death of wheat aleurone layer // Journal of Cell and Molecular Biology. - 2007. - Vol.6(1). - P. 41-48.
8. Бисенбаев А.К. Внутриклеточная локализация эндодезоксирибонуклеаз алейронового слоя зерна пшеницы // «Биотехнология. Теория и практика». - 2005. - №4. - С. 137-141.
9. Бисенбаев А.К. Биохимические механизмы программированной гибели клеток эндосперма зерна пшеницы // Материалы Международной научной конференции. «Актуальные проблемы науки и образования в области химии и биологии». - Алматы. - С. 434-438.
10. Ogawa K., Kanematsu S., Asada K. Generation of superoxide anion and localization of CuZn-superoxide dismutase in vascular tissue of spinach hypocotyls: their association with lignification // Plant Cell Physiol. - 1997. - Vol. 38. - P. 1118-1126.
11. Wanders R.J.A., Denis S. Identification of superoxide dismutase in rat liver peroxisomes // Вopchim. Biophys. Acta. - 1992. - Vol. 1115. - P. 259-262.

Бұл жұмыста гиббереллин қышқылымен өңделген алейрон ұлпалары экзогенді қосылған H_2O_2 алғашқы 24 сағатта ыдыратуға қабілеті жоғары екені көрсетілген. Инкубация уақытын әрі қарай жоғарылату нәтижесінде экзогенді қосылған H_2O_2 ыдырату қабілеті төмендей түсетіндігі байқалады. Керісінше, абсциз қышқылымен өңделген алейрон ұлпалары H_2O_2 ыдырату қабілеті барлық инкубация уақытында қалыпты сақталатындығын көрсетті. ГК-ның әсері тікелей СОД белсенділігінің төмендеуімен байланысты. Алейрон ұлпаларында АБК СОД белсенділігін жоғарылату нәтижесінде $O_2\bullet$ түзілуін тежейді деген болжам бар. Алейрон қабатының ПКӨ басталу уақыты, $O_2\bullet$ бөлініп шығуы және СОД белсенділігінің өзгеруі арасында қатаң корреляция сақталатыны көрінеді.

In present work we show that an intact aleurone tissue in presence of gibberellic acid possesses a significant capacity of utilizing exogenous H_2O_2 during first 24 hours of incubation. Subsequent increase of incubation time leads to dramatic attenuation of H_2O_2 utilization. Conversely, abscisic acid-treated aleurones retain the H_2O_2 -utilizing capability throughout the whole incubation period. The effect of GA is coincident with maximal decrease in SOD activity. Supposedly, ABA retards a $O_2\bullet$ generation in aleurone cells via activation of SOD. The strong correlation between the time of aleurone layer PCD onset, $O_2\bullet$ generation and oscillation of SOD activity is observed.