

Бисенбаев А.К., Алтыбаева Н.А., Мусина А.А., Тайпакова С.М.
**ЭФФЕКТ АСИДИФИКАЦИИ ИНКУБАЦИОННОЙ СРЕДЫ НА СЕКРЕТОРНУЮ И
АНТИОКСИДАНТНУЮ ФЕРМЕНТАТИВНУЮ СИСТЕМУ АЛЕЙРОНОВОГО СЛОЯ
ЗЕРНА ПШЕНИЦЫ**

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

Выявлена важная роль значения pH в гормонозависимой регуляции активности гидролитических и антиоксидантных ферментов алейронового слоя зерна пшеницы. Показано, что клетки алейронового слоя действительно усиливают процессы асидификации внеклеточной среды под действием гибберелловой кислоты (ГК). Установлено, что эффект ГК как по отношению к альфа - амилазе, так и супероксиддисмутазе существенно увеличивается тогда, когда pH инкубационной среды имеет нейтральное значение. Высказано предположение о том, что для формирования полного клеточного ответа необходимо взаимодействие гормона (ГК) с рецептором только для инициации последующие, дистальные этапы реализации гормонального эффекта.

Эндосперм злаков представляет собой триплоидную ткань, которая образуется в результате слияния спермии с центральной клеткой зародышевого мешка. Эндосперм ячменя через 8-10 дней после опыления дифференцируется на крахмальный эндосперм и алейроновый слой. Во время прорастания семян алейроновые клетки синтезируют и секретируют ферменты, катализирующие гидролиз запасных полимеров эндосперма, обеспечивая тем самым питание зародыша. Индукция синтеза этих гидролаз зависит от присутствия в ткани гибберелловой кислоты (ГК) [1,2]. Показано, что значение pH крахмального эндосперма играет важную роль в процессах прорастания и формирования зерна злаковых. Установлено, что процесс деградации эндосперма происходит при кислом значении pH. Показано, что большая часть гидролаз (α -амилаза, некоторые протеиназы и др.) участвующие в мобилизации запасных полимеров эндосперма проявляют оптимальную активность при кислом значении pH (4,2-5,0) [3,4]. Транспорт и утилизация щитком продуктов гидролиза запасных полимеров эндосперма так же происходит при кислом значении pH.

Ранее *in situ* окрашиванием крахмального эндосперма показано, что процесс асидификации эндосперма в условиях *in vivo* происходит во время прорастания зерна [5, 6].

Известно, что антиоксидантные ферменты такие как супероксиддисмутаза (СОД) и аскорбатпероксидаза (АРХ) играют важную роль в регуляции функциональной активности алейроновых клеток зерна злаковых [7]. Установлена строгая корреляция между сроком наступления программированной гибели клеток алейронового слоя, генерацией активных форм кислорода и изменением активности антиоксидантных ферментов. Выявлена важная роль активных форм кислорода и антиоксидантных ферментов в реализации гормон - регулируемой программированной гибели клеток алейронового слоя зерна пшеницы.

Однако, в настоящее время практически отсутствуют данные о роли pH внеклеточной среды на фитогормон регулирующую активность антиоксидантных ферментов алейронового слоя зерна пшеницы.

Материалы и методы

В исследованиях использовали семена пшеницы (*Triticum aestivum*), сорта Казахстанская 4. Семена с удаленными зародышами стерилизовали в 1% гипохлориде натрия в течение 10 мин, и несколько раз промывали дистиллированной водой. Беззародышевые половинки семян помещали в чашки Петри, содержащие 100 г стерилизованного песка и, замачивали в 20-25 мл деионизированной воды. Преинкубацию половинок семян проводили в течение двух дней при 25⁰ С в темноте. Алейроновые слои отделяли от эндосперма шпателем, несколько раз промывали деионизированной водой и инкубировали (10-15 алейроновых слоев на 2 мл) в зависимости от условия эксперимента в следующих буферах: 0,02М ацетатный буфер (pH 5.0); 0,02М натрий фосфатный буфер (pH 6.0, 7.0) и 1 мкМ ГК и/или 5 мкМ АБК. В контрольных вариантах ГК и абсцизовую кислоту (АБК) исключали из среды инкубации. Измерение pH инкубационной среды проводили с помощью специального наконечника электролитического контакта, в объеме 0,5-2 мл на иономере 75 М. Активность альфа-амилазы определяли по методу Шустера и Гиффорда [8].

Электрофоретическое фракционирование изоферментов супероксиддисмутазы (СОД) проводили в трис - глициновом буфере (рН 8,9) при 4⁰С (напряжении 100V) в 7% полиакриламидном геле (ПААГ). Выявление активности СОД проводили следующим образом: после электрофореза гель инкубировали в растворе нитротетразолиевого синего (2,5мМ) в течение 20 минут. Затем - в калий фосфатном буфере (рН 7,8) в течение 15 минут, содержащем 20мМ тетраметилэтилендиамид (ТЕМЕД), 28мкМ рибофлавина. Зоны активности СОД проявляли после освещения геля лампой (25Вт).

Результаты и их обсуждение

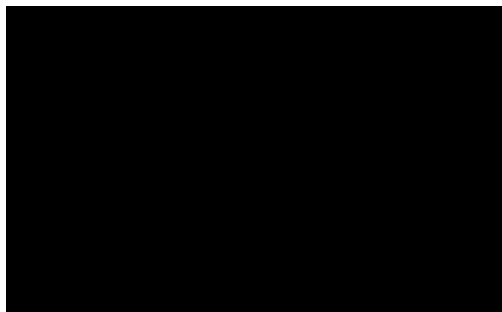
В первоначальных экспериментах мы изучали влияние ГК и АБК на изменение внеклеточного значения рН (рН_е) алейронового слоя зерна пшеницы. Как видно из рисунка 1 в контрольных экспериментах значение рН инкубационной среды составило – 5,1. Инкубация изолированного алейронового слоя с 10⁻⁶ М ГК в течение 48 часов, привела к существенному снижению рН_е (4,65). При этом внесение только АБК в дозе 5x10⁻⁶ М не оказывало существенного влияния на асидификацию инкубационной среды (рис.1-3).

Эти данные указывают на важную роль алейронового слоя и ГК в асидификации внеклеточной среды.

Ранее было высказано предположение о том, что ГК регулирует функциональную активность алейроновых клеток через рецепторы находящиеся на плазматической мембране. Однако до сих пор нет достоверных данных о месте локализации рецептора ГК.

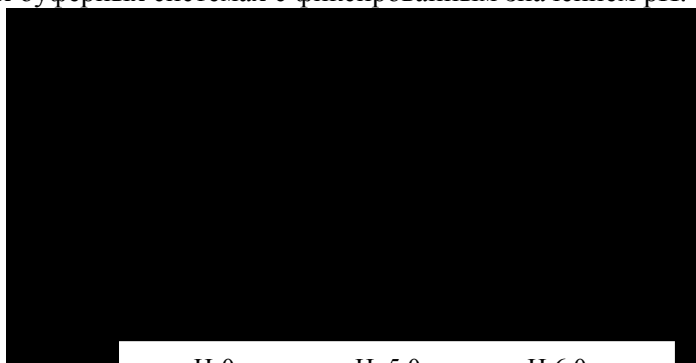
ГК является слабой гидрофобной кислотой дитерпеноидной природы со значением рК_а 4 - 4,2 . При кислом значении рН среды ГК в основном находится в протонированной форме. В этих условиях, вероятность пассивного транспорта ГК через плазматическую мембрану клеток алейронового слоя выше. При нейтральном значении рН среды ГК депротонирована и имеет отрицательный суммарный заряд, что полностью исключает пассивный транспорт ГК.

Эти данные указывают на важную роль рН среды в координации взаимодействия фитогормона с рецептором на плазматической мембране. Одним из возможных подходов в изучении роли и вклада рН_е в ГК стимулированной секреции альфа -амилазы могло бы явиться регистрация эффекта данного фитогормона в определенных буферных системах с фиксированным значением рН.



1-контроль; 2-ГК(10⁻⁶ М); 3-АБК(5x10⁻⁶ М)

Рисунок 1- Действие фитогормонов на асидификацию инкубационной среды клетками алейронового слоя зерна пшеницы



H₂O рН 5.0 рН 6.0

Рисунок 2 - Эффект значения внеклеточного рН на фитогормональную регуляцию амилазосекретирующей активности алейронового слоя зерна пшеницы

Для выяснения этого вопроса мы исследовали зависимость эффекта ГК на секрецию α-амилазы от использованных в качестве инкубационной среды буферных систем(0,02М ацетатный буфер, рН 5.0; 0,02М натрий фосфатный буфер, рН 6.0 - 7.0).

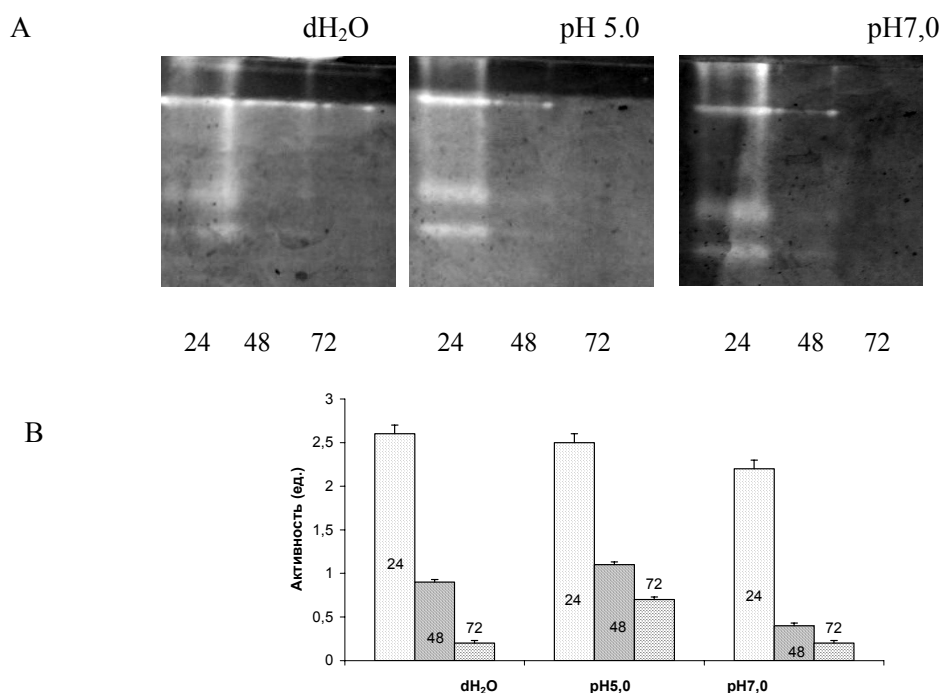
Результаты этих экспериментов показали, что инкубация изолированного алейронового слоя в дистиллированной воде, в присутствии ГК(1мкМ) в течение 48 часов приводит к увеличению активности секретированной альфа - амилазы на 60% по сравнению с контролем (рисунок 2). При инкубации ткани в буферных системах со значением рН 5 и 6 в течение 48 часов существенных различий в гормонозависимой активации секретированной α-амилазы (65-75% , соответственно), по сравнению с предыдущими условиями эксперимента обнаружено не было (рисунок 2). При этом внесение АБК в дозе 5мкМ к инкубируемым, вышеназванным условиям, тканям тормозило ГК зависимую секрецию альфа - амилазы до уровня контроля. Незначительный эффект АБК на ГК стимулированную секрецию фермента наблюдалось при значении рН инкубационной среды - 6.

Как отмечалось выше, ГК в алейроновых клетках злаковых значительно подавляет активность антиоксидантных ферментов таких как, супероксиддисмутаза, аскорбатпероксидаза и др. [9]. Следовательно, действие ГК в данной модельной системе, наряду со стимуляцией секреции альфа - амилазы, направлено на подавление активности антиоксидантных ферментов.

Каков эффект рН_e на действие ГК на активность супероксиддисмутазы в алейроновом слое зерна пшеницы?

Инкубации изолированного алейронового слоя в присутствии ГК в дозе 1мкМ в течение 48 часов, приводило к существенному снижению активности СОД в ткани по сравнению с контролем при всех использованных значениях рН инкубационной среды (рисунок 3).

Инкубация изолированного алейронового слоя в дистиллированной воде, в присутствии ГК (1мкМ) в течение 48 часов приводило к снижению активности супероксиддисмутазы приблизительно на 70% по сравнению с контролем (рис.3В). Через 72 часа инкубации с ГК, активность супероксиддисмутазы почти исчезла. При инкубации ткани в буферных системах со значением рН 5 в течение 48 и 72 часов приводило к снижению активности на 52% и 72% соответственно.



А – Эффект значения рН_e на изоферментный спектр супероксиддисмутазы

В – Действие рН_e на активность супероксиддисмутазы

Рисунок 3 - Эффект значения внеклеточного рН на ГК зависимое изменение активности супероксиддисмутазы алейронового слоя зерна пшеницы

Наиболее существенный эффект ГК по отношению к супероксиддисмутаза наблюдалось при инкубации ткани при значении рН инкубационной среды равной к 7 . В этом случае гормонозависимое снижение активности фермента при инкубации ткани в течение 48 и 72 часов достигало 84% и 92% соответственно. Выявление зон активности фермента на электрофореграмме при гистохимической окраске во всех исследованных условиях показали сходные качественные результаты. При этом максимальный ингибирующий эффект ГК на активность изоферментов супероксиддисмутаза приходилось на 72 часов инкубации, в этих случаях активность изоферментов не обнаруживалась на электрофореграмме (рис.3А).

Таким образом, результаты этой серии экспериментов свидетельствует о том, что клетки алейронового слоя действительно усиливают процессы асидификации внеклеточной среды под действием ГК. При этом чувствительность алейроновых клеток зерна пшеницы по отношению к ГК как по отношению амилазы, так и антиоксидантных ферментов существенно увеличивается тогда,

когда pH инкубационной среды имеет нейтральное значение. Эти данные позволяют предположить, что для формирования полного клеточного ответа необходимо взаимодействие гормона (ГК) с рецептором только для инициации последующие, дистальные этапы реализации гормонального эффекта.

Литература

1 Бисенбаев А.К., Тауров 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 Hamabata A., Garcia-Maya M, Romero T, Bernal-Lugo Y. Kinetics of the acidification capacity of aleurone layer and its effect upon solubilization of reserve substances from starchy endosperm of wheat// Plant Physiol., 1988, v. 86, p. 643-644.

4 Drozdowich Y.M., Jones R.L. Hormonal regulation of organic and phosphoric acids release by barley aleurone layers and scutella// Plant Physiol., 1995, v. 108, p. 769-776.

5 Domingues F. And Cejudo F.J. Pattern of starchy endosperm acidification and protease gene expression in wheat grains following germination// Plant Physiology, 1999. V. 119, p. 81-88.

6 Алтыбаева Н.А., Бисенбаев А.К., Бельгубаева А.К., Берсимбаев Р.И. Бидай алейрон ұлпаларының инкубациялық ортаны асидификациялау активтілігіне фитогормондардың әсері // Известия НАН РК, серия биол., вып.6, с. 18-23, 2004., №1.

7 Bissenbaev A.K., 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 6(1): 41-48, 2007.

8 Chrispeels M.J. Varner J.E. Gibberellic acid –enhanced syntesis and release of alpha-amylase and ribonuclease by isolated barley aleurone layers// Plant physiol., 1967. V. 42., N.3. p 398-406.

9 Бисенбаев А.К. Роль активных форм кислорода и антиоксидантных ферментов в гормонально регулируемой гибели клеток алейронового слоя зерна пшеницы// «Биотехнология Теория и практика», 2005, N4, с. 142-149.

Тұжырым

Бидай дәнінің алейрон клеткаларының гидролитикалық және антиоксиданты ферменттер белсенділігінің гормонға тәуелді реттелуінде pH мәнінің шешуші рөл атқаратындығы анықталған. Шынында да, алейрон қабатының клеткалары ГК-ның әсерінен клеткадан тыс ортаның асидификация үрдісін жандандыратынын көрсетеді. Альфа-амилазаға, сондай-ақ супероксиддисмутазаға қатысты ГК-ның әсер, инкубациялық орта pH мәні нейтральды болған жағдайда айтарлықтай жоғарлайтындығы анықталған. Бұл нәтижелер, клеткалық жауаптың толық қалыптасуы үшін, ГК гормонының рецептормен өзара әсерлесуі қажет екендігі туралы болжам жасауға мүмкіндік береді.

Summary

The results presented in this report show real effect of the pH of the incubation medium on the activities of alpha -amylase and superoxidizedismutase of wheat aleurone layer. It has been shown that aleurone layer cells really enhance the extracellular medium acidification processes under the action of GA. At the same time, the sensitivity of aleurone layer cells towards GA in respect to both amylase and antioxidant enzymes substantially increases when the pH of incubation medium is neutral. It has been proposed that to form full cell response only the interaction of GA with its receptor is required to initiate subsequent distal stages of hormonal effect realization.

УДК 636.293.1.(574.5)

Есмұханбетов Д. Н., Садықұлов Т.С., Серикбаева А.Д.

ИЗУЧЕНИЕ БЕЛКОВОГО СОСТАВА СЫВОРОТКИ КРОВИ МАРАЛОВ – РОГАЧЕЙ

Белковые фракций сыворотки крови маралов – рогачей определяли фотометрическим методом. Изменчивость белковых фракций сыворотки крови маралов – рогачей определяли в зависимости от возраста. В период их роста увеличение концентрации глобулинов в крови указывает на интенсивность процесса обмена в тканях и функциональную активность клеток. Увеличения привесов маралов рогачей находится в прямой зависимости от сбалансированного питания и содержания в крови общего белка и глобулинов. Исследования выявили, что увеличения уровня общего белка в крови обусловлено в основном увеличением количества β и γ глобулинов.