

УДК 577.15: 581.143

Н.А. ОГАНЕСЯН, М.Г. СНАПЯН, Д.Ж. А. АГАДЖАНИЯН, М.Т. ПЕТРОСЯН, Ю.Г. ПОПОВ

ВЛИЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА НА АКТИВНОСТЬ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ *NIERACIUM CININNATUM FRIES*

Определена активность супероксиддисмутазы (СОД) в каллусной культуре ястребинки (*Nieracium cincinnatum Fries*), подвергнутой воздействию различных концентраций перекиси водорода (H_2O_2), 1,4-диоксана и нитрата натрия ($NaNO_3$). Показано, что при обработке каллусной культуры 14мМ H_2O_2 активность СОД уменьшается почти в два раза. Такой же эффект наблюдается под влиянием высоких концентраций $NaNO_3$. В то же время 1,4-диоксан вызывает увеличение активности СОД. Обсуждается возможность использования каллусных культур в качестве модели для изучения окислительного стресса у растений.

В процессе клеточного метаболизма при восстановлении кислорода до воды образуется супероксидный радикал O_2^* , который участвует в образовании H_2O_2 и гидроксильного радикала OH^* . Эти соединения, вступая во взаимодействие с клеточными компонентами, могут вызывать серьезные нарушения жизнедеятельности клетки, характеризующиеся как состояние окислительного стресса [1]. Растения, как и другие аэробные организмы, обладают защитной системой, предохраняющей клетки от токсического действия кислородных радикалов. Одним из клеточных антиоксидантов является супероксиддисмутаза (СОД), осуществляющая реакцию дисмутации супероксидного радикала, в результате которой образуется H_2O_2 и O_2 [2].

Растения синтезируют два типа СОД – цитоплазматическую $Cu/ZnCOД$ и митохондриальную $MnCOД$. $Cu/ZnCOД$ обнаружена также в пероксисомах и хлоропластах. Кроме того, для ряда растений показано наличие изоферментов СОД [3].

Контроль биосинтеза СОД в клетках играет ключевую роль в механизме защитного ответа организма на окислительный стресс. Показано, что в условиях окислительного стресса активность СОД в растениях возрастает [4]. С другой стороны, растения с высоким уровнем активности антиокислительных ферментов, в том числе СОД, демонстрируют повышенную устойчивость к окислительному стрессу [5].

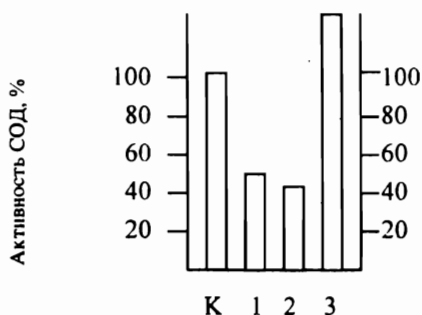
В настоящем сообщении приводятся результаты изучения влияния веществ, изменяющих окислительно-восстановительный потенциал в клетке, на проявление активности СОД в каллусной культуре ястребинки.

В экспериментах использовалась каллусная культура ястребинки, выращенная на среде Мурасиге-Скуга (MS) [6]. Каллусные культуры 11-14-ого пассажа помещались в растворы с различными концентрациями испытуемых веществ, выдерживались три часа при комнатной температуре, после чего гомогенизировались. Клеточные экстракты получали после осаждения обломков клеток. Активность СОД в клеточных экстрактах определяли методом ингибирования генерации супероксидных анионов в модельной системе фенозилметасульфат – НАДН - нитротетразольный хлористый [7]. Измерение оптической плотности проводили при 490 нм. За единицу активности принимали количество фермента, необходимого для подавления восста-

новления хлористого тетразолия на 50%. Концентрацию белка измеряли спектрофотометрическим методом [8].

Удельную активность СОД определяли в клеточных экстрактах каллусных культур, подверженных воздействию следующих веществ.

Нитрат натрия (NaNO_3). Каллусная культура ястребинки инкубировалась в растворах NaNO_3 следующих концентраций: 0.25M; 0.5M; 1M. Измерение активности СОД в клеточных экстрактах показало, что при воздействии 1M NaNO_3 активность СОД уменьшается почти в два раза (см. рис.). Под влиянием 0.25M и 0.5M NaNO_3 активность СОД не изменяется. Таким образом, согласно полученным данным, повышенная концентрация NaNO_3 (1M) оказывает негативное воздействие на проявление активности СОД. Можно предположить, что у солеустойчивых растений негативное влияние подавляется, что приводит к возрастанию активности СОД, как показано в случае солеустойчивых мутантов хлопка [9].



Активность СОД в каллусной культуре ястребинки, обработанной 14 мМ H_2O_2 (1), 2.5 М NaNO_3 (2) и 4.4 мМ 1,4 - диоксана (3), относительно контроля (К-активность СОД в каллусной культуре ястребинки).

Перекись водорода H_2O_2 . Каллусная культура подвергалась воздействию следующих концентраций H_2O_2 : 1мМ; 7мМ; 14мМ. Изменение активности СОД наблюдается в клеточных экстрактах каллусной культуры, обработанной 14мМ H_2O_2 , при этом активность СОД уменьшается в два раза (см. рис.). При других концентрациях перекиси водорода (1мМ и 7мМ) изменений в проявлении активности СОД не происходит. Известно, что под воздействием перекиси водорода СОД инактивируется и становится чувствительной к клеточным протеазам, что приводит к уменьшению активности этого фермента в клетках [10]. Уменьшение активности СОД в наших экспериментах также можно объяснить инактивацией фермента перекисью водорода. Низкие концентрации перекиси водорода, возможно, обезвреживаются клеточными ферментами.

1,4-диоксан. Для обработки каллусной культуры ястребинки использовались 1.1 мМ; 4.4 мМ и 11 мМ растворы диоксана. Результаты определения активности СОД приведены на рисунке. Значительное увеличение активности СОД (до 55%) наблюдается при воздействии 4.4 мМ и 11 мМ диоксана. В клетках *E. coli* индуктором СОД является супероксидный радикал, который образуется как в процессе клеточного метаболизма, так и в результате реакций с участием различных веществ, в том числе диоксана [11]. Однако для подтверждения индукции биосинтеза СОД в каллусной культуре ястребинки диоксаном требуется проведение дальнейших экспериментов.

На каллусной культуре ястребинки показана возможность изучения влияния различных веществ на проявление активности СОД, что позволит в дальнейшем раскрыть механизмы ответной реакции растений на окислительный стресс.

Выполнение работы финансировалось за счет гранта Ассоциации ИНТАС ЕС.

1. Fridovich I. Biological effects of the superoxide radical.- Arch. Biochem. Biophys., 1986, v. 247, p.1-11.
2. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. The superoxide radical is an agent of oxygen toxicity, superoxide dismutases provide an important defense.- Science, 1978, v. 201, p. 875-880.
3. Scandalios J.C. The antioxidant enzyme genes Cat and Sod of maize: regulation, functional significance and molecular biology. In: Rallazzi M.L., Scandalios J.C., Whitt G.S., eds. Isoenzymes: current topics in biological and medical research. New-York: Alan R. Liss, 1987, v. 14, p. 19-44.
4. Bowler C., Van Montagu M., Inze D. Superoxide dismutase and stress tolerance.- Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol., 1992, v. 43, p. 83-116.
5. Gupta A.S., Heinen G.L., Holaday A.S., Burke J.J., Allen R.D. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. -Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1993, v. 90, p.1629-1633.
6. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. - Physiol. plant., 1962, v. 15, p. 473-497.
7. Fridovich I. Superoxide dismutase., - Adv. in Enzymol., 1986, v. 58, p. 61-97.
8. Peterson G.L.,- Meth. Enzymol., 1983, v. 91, p. 95-119.
9. Gossett D.R., Millhollon F.P., Lucas M.C., Banks S.W., Marney M.-M. The effects of NaCl on antioxidant enzyme activities in callus tissue of salt-tolerant and salt-sensitive cotton cultivars.,- Plant Cell Reports, 1994, v. 13, p. 498-503.
10. Salo D.C., Pacifici R.E., Lin Sh-W., Giullivi C., Davies J.A. Superoxide dismutase undergoes proteolysis and fragmentation following oxidative modification and inactivation., - J. Biol. Chemistry, 1990, v. 265., p. 11919-11927.
11. Hassan H.M., Moody C.S. Regulation of manganese-containing superoxide dismutase in Esherichia coli, - J. Biol. Chemistry, 1987, v. 262, p. 17173-17177.

Ն.Ա. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ, Մ.Գ. ՄՆԱՓՅԱՆ, Զ.Ա. ԱՂԱՋԱՆՅԱՆ,
Մ.Թ. ՊԵՏՐՈՍՅԱՆ, ՅՈՒ.Գ. ՊՈՊՈՎ

ՃՈՒՌԱԿԱՆՈՏԻ ԿԱԼԼՈՒՍԱՅԻՆ ԿՈՒՆՏՈՒՐԱՅԻ
ՍՈՒՊԵՐՕՔՍԻԴԻՄՍՈՒՏԱԶԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ ՕՔՍԻԴԱՅԻՆ
ՍՏՐԵՍԻ ԱԶԴԵՅՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ա մ փ ո փ ո մ

Ճուռակախտի կալլուսային կուլտուրայում որոշվել է սուպերօքսիդի սնու-տազի (ՍՕԴ) ակտիվությունը ջրածնի պերօքսիդի, 1.4 դիօքսանի և նատրիումի նիտրատի տարբեր կոնցենտրացիաների ազդեցության տակ: Ճուռակախտի կալլուսը 7MM ջրածնի պերօքսիդի լուծույթով մշակելու դեպքում ՍՕԴ-ի ակտիվությունը ընկնում է մոտավորապես երկու անգամ: Նման պատկեր դիտվում է նաև կալլուսի վրա նատրիումի նիտրատի (NaNO₃) բարձր կոնցենտրացիաներով ազդելիս: Մինչդեռ օօտագործվող 1.4 դիօքսանը բարձրացնում է ՍՕԴ-ի ակտիվությունը:

Զննարկվում է կալլուսային կուլտուրայի օօտագործման հնարավորությունը որպես փորձնական համակարգ բույսերի օքսիդային ստրեսը ուսումնասիրելու համար: