

ФЕРМЕНТЫ В АНТИОКИСЛИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ РАСТЕНИЙ: СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗА

Е.В. Романова, Российский университет дружбы народов

Специфическим ферментом, препятствующим повреждающему влиянию супероксиданион-радикала кислорода на биологические структуры, является супероксиддисмутаза (SOD, СОД, КФ 1.15.1.1), превращающая этот радикал в пероксид водорода. Последний обладает окислительными свойствами, но его реакции с органическими молекулами протекают относительно медленно [24].

Этот фермент впервые был выделен из бычьей крови как медьсодержащий протеин [27]. Предполагалось, что его основная биологическая роль сводится к тому, чтобы быть накопителем меди. Каталитическая активность фермента была открыта в 1969 г. Этот фермент широко распространен среди кислородопотребляющих организмов, а также у аэротолерантных и некоторых облигатных анаэробов [19, 22]. Супероксиддисмутаза (СОД) или супероксид оксидоредуктаза — фермент, одна из основных биологических функций которого состоит в сохранении жизнедеятельности аэробных микроорганизмов. СОД является ключевым ферментом, лимитирующим процессы превращения супероксидного радикала в другие активные формы кислорода (прооксиданты), т.к. катализирует реакцию образования перекиси водорода из супероксидного анион-радикала [22, 6, 13].

СОД была идентифицирована во многих организмах, в том числе и в растениях [2, 9, 10, 16]. В настоящее время выяснена структура и механизм действия фермента. Он катализирует дисмутацию анионов супероксида в молекулярный кислород и перекись водорода по следующей схеме:



СОД участвует в каскаде реакций ферментов антиоксидантной системы, включающей глутатионпероксидазу, каталазу и глутатионредуктазу [4, 18, 24, 25, 28, 33]. Вместе с антиоксидантами — донорами водорода (аскорбиновая кислота, токоферолы, гидрохиноны), являющимися низкомолекулярными элементами антиоксидантной защиты клетки, этот фермент необходим для защиты организмов от повреждения активными окислителями.

Все СОД, независимо от источника их выделения — мультимерные металлопротеины, чрезвычайно эффективные в устранении супероксидных анионов (O_2^-) [23, 32]. В механизме их действия предусмотрено попеременное чередование процессов окисления — восстановления соответствующих металлов, находящихся в активном центре ферментов. Выделяют 3 типа супероксиддисмутаза: Zn/Cu-COD — димер, в основном обнаруживается в цитозоле и хлоропластах эукариот, во внеклеточной жидкости у млекопитающих — тетрамер; Mn-COD — димер, в митохондриях и у некоторых термофильных бактерий — тетрамер; Fe-COD — димер, в основном обнаруживается у прокариот, но встречается и у водорослей [17].

Исследования образцов различных растений с помощью электрофоретической техники показали, что существует около 10 мультиформ СОД. Существование изоферментов СОД в растениях впервые было показано на кукурузе, из нее же был впервые клонирован ген Sod [22, 17]. Позднее полиморфные СОД были обнаружены и в других растениях (овес, горох, ячмень, соя, амарант, люпин), причем в каждом из них выявлено разное количество форм СОД. Так, в кукурузе найдено 7 форм, тогда как в овсе и горохе — только 3. В последних двух растениях присутствовали лишь формы СОД с высокой электрофоретической подвижностью, а в кукурузе — еще и со средней и низкой подвижностью. Количество изоформ меняется в зависимости от стадии развития растения. Так у амаранта на стадии пяти листьев присутствует одна, а на стадии 10 листьев — две формы СОД. На стадии семян выявлены две изоформы фермента, а активность СОД у различных образцов амаранта достигает максимального значения у взрослого растения, минимальное значение характерно для стадии 5 листьев [8]. У люпина желтого обнаружено 6 изоформ СОД, у различных сортов винограда — от 3 до 8, причем, чем устойчивее сорт к карбонатному хлорозу, тем разнообразнее изоферментный состав СОД в листьях. На основании этого предположено, что фермент играет определенную роль в адаптации подвоев винограда к карбонатным почвам и увеличение активности СОД является способом защиты пигментного аппарата при хлорозе [14].

Разработка физиолого-генетических аспектов проблемы свободных радикалов и, в частности, изучение полиморфных белковых и ферментных систем, регулирующих протекание свободнорадикальных реакций, может оказаться одним из реальных путей решения физиолого-химических проблем продуктивности. В процессе работы с яровым ячменем установлено, что в период налива зерновок с 8-го дня после опыления и до восковой спелости изоферментный состав СОД не изменяется, поэтому сорт можно характеризовать по цифровой записи вариантов СОД по зонам подвижности. В быстроподвижной зоне (SOD F) выявлено 7 вариантов изофермента [7]. Изучение полиморфизма по другим тканям (листья, пыльца и др.) существенно увеличивает число идентифицируемых локусов [10].

На ячмене нами были изучены две формы СОД, обусловленные двумя локусами: Sod S и Sod F, контролирующими фермент в медленно- и быстроподвижной зоне зимogramмы [12]. Медленноподвижная зона представлена локусом Sod S и выделена из корней растений ячменя. Быстроподвижная зона контролируется локусами Sod F и выделена из наливающих зерновок. При анализе гибридной комбинации скрещивания сортов Карат х Винер, различавшихся по изоферментному составу СОД, выявлено существование связи между изоферментным составом СОД и элементами продуктивности растений и качеством зерна ярового ячменя. У сорта Карат присутствовал аллель Sod S1, у сорта Винер — Sod S2. По локусу Sod F сорт Карат несет аллель Sod F4. По остальным генетическим факторам родители не различались. Установлено, что наиболее продуктивными являются гомозиготные линии, несущие аллель Sod S1. Преимущество перед линиями, несущими аллель Sod S2, было очевидным. Так, линии Sod S1 имели более высокую массу зерна с растения и массу 1000 зерен по сравнению с Sod S2 (на 27 и 14% соответственно).

По локусам Sod F1 и Sod F4 по данным признакам существенных различий обнаружено не было. Можно предположить, что на массу 1000 зерен имеет некоторое положительное влияние локус Sod F4. По процентному содержанию белка в зерне существенных различий по обоим локусам не обнаружено. Линии, гетерозиготные по данным локусам, по продуктивности занимают промежуточное положение. Среди сочетаний аллелей наиболее удачным, с селекционной точки зрения, является генотип Sod F1 Sod S1. Растения, несущие такой генотип, отлича-

лись самой высокой зерновой продуктивностью и содержанием белка. Экспериментальные данные показали, что различные сочетания аллелей оказывают статистически достоверное влияние на изучаемые показатели и могут использоваться в качестве генетических маркеров селекционных признаков.

Описаны [10] еще два варианта СОД ячменя — Sod B и Sod D, и установлено, что изоферментный состав СОД, выделенной из корней, обуславливает не строго специфичную реакцию растений к неблагоприятным факторам в корневой зоне. На плодородных почвах юга России с нормальным рН идеальной по потенциальной продуктивности является форма ячменя, сочетающая в одном генотипе аллели Sod B1, Sod F1, Sod D, Sod S1. В Нечерноземной зоне на низкоплодородных почвах наибольшей продуктивностью отличаются генотипы с аллелями Sod F4 и Sod S2. Носители аллеля Sod S2 обладают большей толерантностью к таким неблагоприятным факторам среды, затрагивающим корневую систему, как отрицательные температуры, низкие значения рН, повышенное содержание солей в почве [10].

Точная характеристика изоферментного состава СОД позволяет решать ряд теоретических и прикладных задач, одной из которых является изучение происхождения и систематики различных видов растений. Выявление сортового полиморфизма ферментов открывает перспективы использования его для идентификации сортов и гибридов, исследования их гетерогенности и целенаправленного подбора родительских пар для скрещиваний.

У высших растений СОД устраняет кислородные радикалы [31, 30]. В невозбужденном состоянии молекулы кислорода относительно неактивны, однако способны под воздействием металлов или квантов света превращаться в свободные радикалы, что вызывается негативным воздействием биотических и абиотических стрессоров, антропогенным воздействием (применение пестицидов) [15,20,6]. В процессе адаптации растения к окислительному стрессу уровень содержания СОД может увеличиваться в зависимости от вида растения, стадии его развития и степени стрессового воздействия. Наличие изозимов СОД обеспечивает стрессовую устойчивость растения.

При действии низких и высоких температур (тепловой шок) в клетках растений усиливается генерация активных форм кислорода, при этом активность ключевых ферментов — каталазы и СОД снижается [21]. Снижение активности ферментов-антиоксидантов на фоне ослабления антиоксидантной системы растительных клеток приводит к повышению содержания активных кислородных радикалов. По мнению Зауралова и Лукаткина [5], увеличение прооксидантов может быть предпосылкой (сигналом) для изменения генной активности в клетке при различных стрессах. Известно, что тепловой шок репрессирует биосинтез многих белков, за исключением белков теплового шока. Воздействие высоких и низких температур на растительный организм существенно смещает равновесие антиоксиданты — прооксиданты в сторону последних. В результате окислительного стресса в клетках накапливаются в большом количестве денатурированные белки, продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ), которые могут быть не только первичными медиаторами стрессового


воздействия температурного фактора, но и индукторами соответствующих защитных механизмов в растительных клетках [6, 29].

При тепловом шоке усиливается экспрессия гена СОД, и эта активация ускоряется в условиях гипертермии под влиянием экзогенной ИУК (3-индолилуксусная кислота) [1]. Экзогенная ИУК не стимулирует экспрессию этого гена при обычной температуре, но ускоряет его активацию при высоких температурах. Результаты экспериментов подтвердили предположение о генетически детерминированном механизме повышения уровня СОД при тепловом шоке и участии ИУК в регуляции этого процесса [1].

Заражение растений различными патогенами, являющимися биотическими стрессорами, также изменяет активность СОД. Она возрастает с развитием болезни и снижается при нормализации обмена веществ и ослаблении заболевания после обработки растений фунгицидами.

Следует отметить, что СОД является одним из самых важных ферментов, предотвращающих свободнорадикальное окисление в организме человека. Как говорилось выше, в свежих продуктах растительного происхождения СОД присутствует в виде разных изоформ. Однако при замораживании, переработке, нагревании или высушивании изоферменты могут полностью или частично дезактивироваться, что приводит к снижению устойчивости натурального продукта к самоокислению [11]. К сожалению, важная роль СОД в диетическом питании еще недостаточно осознается, она пока не используется в коммерческих масштабах в качестве антиоксидантной добавки к пище, не разработана технология ее выделения из растений и производства.

Сейчас за рубежом ведется активный поиск источников СОД, которые можно было бы использовать в качестве пищевых добавок. Корейскими учеными изучена СОД-подобная активность водных экстрактов различных овощей, фруктов и грибов. Ее определяли в модельной системе автоокисления пирогаллола. Самая высокая СОД-активирующая способность отмечалась у лука (48%), чеснока (41%), брокколи (38%), арбуза (40%), киви (35%), земляники (32%). У капусты китайской этот показатель составил 19, у сои — 8% [26]. Установлена также способность этанольных экстрактов ряда растений активировать СОД в эритроцитах человека. Что касается водных экстрактов растений, то, по нашим данным, наибольшей антиоксидантной активностью обладали водные экстракты листьев амаранта, в которых было отмечено высокое значение активности фермента, наименьшей — экстракт из семян сои. Экстракт из листьев китайской капусты отличался средним значением этого показателя [3].

Таким образом, супероксиддисмутаза (СОД) играет важнейшую роль одного из главных представителей антиоксидантной системы защиты живых организмов. Изучение внутренних физиолого-биохимических механизмов формирования продуктивности и различных форм устойчивости растений к биотическим и абиотическим стрессорам целесообразно дополнять генетическими методами исследований. Полиморфизм по изоферментному составу СОД может быть использован при генетическом маркировании селекционных признаков сельскохозяйственных растений. 

ЛИТЕРАТУРА

1. Веселов А.П. Гормональная и антиоксидантная системы при ответе растения на тепловой шок: Автореф. дис...док-ра. биол. наук. – М.: ИФР, 2001. – 40 с.
2. Власов Н.Ф., Зятчина Г.П. О сортовой специфичности изоферментов супероксиддисмутазы кормовых белков// Сельскохозяйственная биология. - 2000.- №5. - С. 93-96.
3. Гинс М. С., Гинс В.К., Романова Е.В., Потапов С.А., Або Хегази С.Р.Е., Любичкий О.Б., Ильина С.Е. Возможные механизмы антиоксидантной активности растительных экстрактов// Актуальные проблемы современной науки, 2005. - № 5(26). – С. 148-150.
4. Дурнев А.Д., Середенин С.Б. Мутагены (скрининг и фармакологическая профилактика воздействий). – М.: Медицина, 1998. – 328 с.
5. Зауралов О.А., Лукаткин Ф.С. Последствие пониженных температур на дыхание теплолюбивых растений// Физиология растений. – 1997.- Т.44. - №5.- С.736-741.
6. Кириллова Н.В. Изменение активности супероксиддисмутазы в каллусной культуре *Rauwolfia serpentina* Benth. При выращивании в стандартных условиях и при тепловом шоке // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – Т.40. -№1. – С.89-93.
7. Крестинков И.С., Бирюков С.В., Нецветаев В.П., Линчевский А.А. Полиморфизм ячменя по супероксиддисмутазной системе в зерне// Научно-технич. биол. Всесоюзного селекционно-генетического института. – Одесса: ВСГИ, 1987. – Т.1. – С.22-25.
8. Кропова Ю.Г., Филякова Л.В., Коничев А.С., Коничева А.П. Исследование антиоксидантного потенциала некоторых сортов амаранта // Сб. науч. трудов биол.-химического факультета МГОПУ им. М.А.Шолохова. – М.: МГОПУ, 2003. – Т.3. – С.100-103.
9. Левитес Е.В. Генетика изоферментов растений. - Новосибирск: Наука. Сибирское отделение, 1986.- 145 с.
10. Нецветаев В.П. Теоретические основы использования белкового полиморфизма для оптимизации селекционного процесса: Автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук: /Санкт-Петербург, 2000. - 40 с.
11. Осадчая О.Е. Антиоксиданты и их роль в питании человека при неблагоприятных экологических условиях. – М.: ВНИИТ-ЭИагропром, 1998. – 44 с.
12. Романова Е. В. Полиморфизм гордеина и изоферментов и их селекционная значимость у ярового ячменя. Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук.- М.: УДН, 1992. - 16 с.
13. Романова Е.В. Изоферментный состав и подвижность супероксиддисмутазы амаранта// Объединенный научный журнал. Сельское хозяйство. - 2005. – № 9(137). – С.79-80.
14. Трач В.В. Супероксиддисмутазы как показатель состояния и устойчивости растений при карбонатном хлорозе: Автореф. дис...канд. биол. наук. – Киев: ИФР, 1987. – 23 с.
15. Фридович И. Кислородные радикалы, перекись водорода и токсичность кислорода // Свободные радикалы в биологии. – М., 1979. – 302 с.
16. Яаска В. Изоферменты СОД в проростках фасолевого (фасоли и вигны)// Изв. Ан. ЭССР. Биология. - 1984.- Т.33.- №1.- С. 42-48.
17. Bannister W. N. From haemocuprein to copper- zinc superoxide dismutase: a history on the fiftieth anniversary of the discovery of haemocuprein and twentieth anniversary of the discovery of superoxide dismutase // Free Rad. Res. Comms. 1988 . -V.5. - №1. - P. 35-42.
18. Beauchamp C.O., Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assay and an assay applicable to acrylamide gels// Anal. Biochem. 1971.- V.44. - P.276-287.
19. Beauchamp C.O., Fridovich I. Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ// Biochim. Biophys. Acta. 1973. - V.317. - P.50-64.
20. Cardinaels C., Put C., Van Assche F., Clijster H. The superoxide dismutase as Biochemical Indicator Discriminating between Zinc and Cadmium Toxicity// Arch. Int. Physiol. Biochem. 1984 -V.92. - P. 27-28.
21. Doke N., Miura Y., Lesndro M.S., Kawakita K. Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants/ Ed. C.N. Foyer., P. M. Mullineaux Boca Radon: CRC Press. 1994. – P. 177-197.
22. Fridovich I. Superoxide dismutases// Advances in Enzymology. 1986. - V.58. - - P. 61-97.
23. Getzoff E. D., Tainer J. A., Weiner P. K., Kolman P. A., Richardson D. S. Electrostatic recognition between superoxide and copper zinc superoxide dismutase // Nature. 1983 - V.306. - P. 287-290.
24. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Free radicals in biology and medicine. - Oxford: Clarendon Press, 1986. – 346 p.
25. Ishikawa Y. Purification and immunological characterization of superoxide dismutase of the onion maggot, *Delia antiqua*// Archives of Insect Biochem. and Physiol. 1995.- V.28.- P. 387-396.
26. Kim S.M., Han D., Park M. N., Rhee J. S. Screening for superoxide dismutase – like compounds and it's activators in extracts of fruits and vegetables// Bioscience, Biotechnology, Biochemistry. 1994 -V.58. - №12. - P. 2263-2265.
27. Mann T., Kelen D. Haemocuprein and hepatocuprein, copper-protein compound of blood and liver in mammals// Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B. 1938. - V. 126. - P. 303-310.
28. Parker M.W., Schinina M.E., Bossa F., Bannister J.V. Chemical aspects of the structure, function and evolution of superoxide dismutases// Inorg. Chim. Acta. 1984.- V.91.- P.307-317.
29. Prasad T.K., Anderson M. D., Martin B.A., Stewart C.R. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide // Plant Cell. 1994. - V.6. - №1. - P. 65-74.
30. Raychaudhuri S. S., Deng X.W. The role of SOD in combat oxidative stress in higher plants // Bot .Rev. 2000. - V.66. - №1. - P. 89-98.
31. Scandalios Y. G. Oxygen stress and Superoxide Dismutase // Plant Physiol. 1993 -V.101. - №1. - P. 7-12.
32. Tainer J. A., Getzoff E. D., Richardson J. S., Richardson D. S. Structure and mechanism of copper zinc superoxide dismutase // Nature. 1983 - V.306. - P. 284-287.
33. Yoyce G.F., Jhon L.H. Responses of superoxide dismutase and glutathione reductase activities in cotton leaf tissue exposed to an atmosphere enriched in oxygen// Plant Physiol.- 1980. - V.66. - №5. - P. 482-487.

УДК 631.522/.524

ФЕРМЕНТЫ В АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЕ РАСТЕНИЙ.

1.СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗА

ФЕРМЕНТЫ В АНТИОКСИДЛИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ РАСТЕНИЙ. 1. СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗА
ENZYMES IN ANTIOXIDANT SYSTEM OF PLANTS. 1. Superoxide dismutase

Е.В.Романова
Romanova E.V.

Российский университет дружбы народов.

Проанализированы и обобщены литературные данные и результаты собственных исследований по изучению активности и биохимического полиморфизма одного из важнейших ферментов антиоксидантной системы растений – супероксиддисмутазы (СОД). Установлено влияние аллельного состояния локуса СОД на селекционные признаки растений.

Russian People's Friendship University.

The literary data and results of own investigation on studying activity and biochemical polymorphism of superoxide dismutase (SOD) which is on of the most important antioxidant system enzymes of the plants are generalized and analyzed.

The influence of the SOD locus allele state on the selection indications of the plants was determined.

Ключевые слова: антиоксиданты, ферменты, супероксиддисмутаза, зерновые культуры

Keywords: antioxidants, enzymes, Superoxide dismutase , grain crops