

РОЛЬ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ В МЕХАНИЗМАХ ПОКОЯ ЗЕРНОВОК ПШЕНИЦЫ

Ключевые слова: физиология растений, покой, зерна пшеницы, алкогольдегидрогеназа, этанол, ацетальдегид.

Введение

Семена культурных растений при отсутствии воды и низкой температуры находятся в состоянии вынужденного покоя. В основе действия механизмов покоя заложено функционирование различных физиолого-биохимических процессов. Контроль за этими процессами осуществляется комплексом биологически активных веществ, которые регулируют рост и развитие растительного организма, обеспечивая сохранение его жизнеспособности. Вхождение в состояние покоя сопровождается понижением активности биосинтетических процессов и дыхания митохондрий, последнее вызывается разобщением окислительного фосфорилирования, переключением аэробных метаболических процессов на анаэробные. При этом активность анаэробных метаболических систем начинает преобладать над активностью аэробных процессов. Показателями анаэробных метаболических процессов могут служить ферменты: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, алкогольдегидрогеназа и др. Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа является ключевым ферментом пентозофосфатного пути превращения углеводов, катализирует реакцию окисления глюкозо-6-фосфата в присутствии НАДФ, который необходим для метаболизма липидов (жирных кислот и стероидов). Алкогольдегидрогеназа катализирует обратимые реакции окисления алифатических спиртов с участием НАД. Реакция легко обратима в физиологической области рН [1, 2]. В живых организмах основными субстратами фермента являются двухуглеродные соединения – этанол и ацетальдегид, которые образуются преимущественно при окислении углеводов производных [3].

Отношение концентраций альдегида к спирту отражает уровень протекания анаэробных биоэнергетических процессов в растительных тканях. Снижение этого соотношения должно сопровождаться активацией катаболических процессов, а повышение – углублением гипобиотического состояния. Однако этот регуляторный механизм в семенах культурных и дикорастущих растений недостаточно изучен.

При этом известно, что уровень эндогенного этанола в зерновках пшеницы в зимний период бывает значительно выше, чем в тканях вегетирующего растения летом, и описывается кривой с максимумом, который независимо от сорта пшеницы и условий хранения приходится на декабрь-январь и составляет от 20 до 42 мкмоль/г. В целом уровень этанола в зерновках изменяется по кривой, имеющей характер затухающих колебаний, уменьшаясь к началу мая до 0,2-1,2 мкмоль/г [4].

Равновесие алкогольдегидрогеназной реакции сдвинуто в сторону образования этанола, накопление которого может служить адаптивным признаком растений и семян переносить ряд внешних неблагоприятных условий (низкая температура, повышенная влажность и др.).

Одним из наиболее часто встречающихся в растениях типов анаэробных процессов является превращение углеводов до этилового спирта – аналог спиртового брожения в клетках микроорганизмов. В этом процессе, в отличие от аэробного окисления углеводов, образуются такие новые метаболиты, как ацетальдегид (при пируватдекарбоксилазном превращении пировиноградной кислоты) и этанол (при алкогольдегидрогеназном восстановлении ацетальдегида), накапливающиеся в во вполне заметных концентрациях. Так, в семенах озимой ржи, пшеницы уровень эндогенного этанола составляет от 2,2 до 6,0 мкмоль/г сухих семян, а при погружении их в воду в течение трех дней достигает 24,8-27,6 мкмоль/г, уровень ацетальдегида при этом – 25-27 мкмоль/г сухих семян [5]. По современным представлениям ацетальдегид является важным биологически активным соединением; в частности, он регулирует (тормозит) процессы переноса электронов в мембране митохондрий [6], возможно, хлоропластов, т.е. обратимо ингибирует процессы дыхания; химически модифицирует все клеточные структуры, резко снижает уровень обмена, переводит клетки в состояние гипобиоза. При больших концентрациях ацетальдегида, образующихся, например, в семенах при длительном затоплении, гипобиоз может перейти в необратимую гибель зародыша [5]. Этанол проникает через клеточные мембраны, стабилизируя их [7]. Например, показано его активное поглощение

корневой системой и передвижение этанола в надземные органы растения [8]. Этанол легче и быстрее углеводов метаболизируется в аэробных процессах при поступлении кислорода, т.е. является хорошим энергетическим сырьем; обладает малой клеточной токсичностью (существенно меньшей, чем, например, молочная кислота), более того оказывает защитный эффект, предохраняя клеточные структуры от неизбирательного перекисного окисления, т.к. является ловушкой супероксидрадикалов [9], может снижать температуру замерзания цитоплазматического раствора при действии холодового фактора. Все это позволяет предположить, что биологическая функция этанола, вероятно, заключается в регуляции текучести и проницаемости клеточных мембран, увеличении энергетической мощности клетки на не очень длительный период, оказании защитного эффекта в условиях повышенных концентраций кислорода или супероксидрадикала в клетках (интенсивный фотосинтез или дыхание), протекания процессов, приводящих к образованию активных форм кислорода, при воздействии холода. Кроме того, эндогенный этанол, вероятно, является нетоксичной формой депонирования ацетальдегида, а алкогольдегидрогеназа является важнейшим регулятором содержания этих метаболитов в растительных тканях. Поэтому в данной работе были проведены исследования по выявлению участия алкогольдегидрогеназы в поддержании состояния покоя зерновок пшеницы и изучен механизм регулирования активности фермента.

Экспериментальная часть

Исследования проводили на зерновках пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Скоропелка улучшенная, которые замачивали в дистиллированной воде в течение 24 ч, а затем проращивали на фильтровальной бумаге в чашках Петри при 23°C на свету в течение 7 сут., смачивая их дистиллированной водой (10 мл на чашку Петри). Количество зерновок в одной чашке – 100 шт. Опыты проводили в трех биологических повторностях (по 3-4 аналитических в каждой). Образцы для анализа отбирали в одно и то же время суток. Жизнеспособность зерновок пшеницы определяли по тетразолюному методу [10]. Активность АДГ в прямой реакции определяли по скорости окисления этанола и образования НАДН при 340 нм ($\epsilon = 6,22 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$) [11]. К 2,2 мл 0,1 М глицин-NaOH буфера pH 10 добавляли 0,1 мл 36 мМ раствора НАД и 0,1 мл 0,41 М раствора этанола. Реакцию инициировали введением 0,1 мл 2,5 мкМ раствора АДГ. Активность АДГ в реакции восстановления ацетальдегида наблюдали при 340 нм по

убыли НАДН в процессе реакции. В кювету вносили 2,2 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера, pH 6,0, добавляли 0,1 мл раствора НАДН 11,3 мМ и 0,1 мл 2,5 мкМ фермента. Реакцию инициировали 0,1 мл 0,1 М раствора ацетальдегида. За меру активности фермента принимали количество микромолей НАДН, восстановленного или окисленного за 1 мин. Концентрацию АДГ находили спектрофотометрически по спектру поглощения комплекса фермента с НАД в присутствии пиразола [12] или с помощью титрования хлор- и гидроксимеркурибензоатом [13]. Активность НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы определяли по [14]. Для кинетических исследований АДГ очищали по методике [15]. Спектрофотометрические исследования проводили на двухлучевом спектрофотометре DMS 100 S («Varian», США). Кажущиеся константы скорости реакций окисления субстратов АДГ, НАДФ-ИЦДГ и Г6ФДГ определяли из данных по стационарной кинетике [16]. В работе использовали этанол, очищенный перегонкой, НАД, НАДН, НАДФ, АМФ, АДФ, АТФ, глюкозо-6-фосфат (Reanal, Венгрия), остальные реактивы ос.ч., (Химреактив, Россия). В работе использовали соли ос.ч. или дважды перекристаллизованные из бидистиллированной воды. Результаты обрабатывали статистически по Лакину [17]. При оценке достоверности использовали критерий Стьюдента при 5%-ном уровне значимости.

Результаты и их обсуждение

Если подойти к вопросам сохранения и повышения жизнеспособности семян растений с позиций биоэнергетики, то можно предположить, что жизнеспособность семян базируется на сохранении на оптимальном уровне активности катаболических дегидрогеназных и аэробных систем. Поэтому мы вначале изучили активность ряда ключевых дегидрогеназ (алкогольдегидрогеназа, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа и НАДФ-зависимая изоцитратдегидрогеназа) при длительном хранении и на ранних этапах прорастания зерновок пшеницы.

Из результатов, приведенных в таблице 1, следует, что с понижением жизнеспособности семян коррелирует уменьшение активности изученных дегидрогеназ, а снижение активности пероксидазы – с понижением всхожести семян, хотя можно предположить, что на ключевые катаболические дегидрогеназы выявленные закономерности не распространяются.

Полученные данные позволили сделать вывод, что дегидрогеназы, в том числе и АДГ, необходимы прежде всего для сохра-

нения жизнеспособности семян и при запуске процессов, связанных с их прорастанием. Далее при прорастании происходят интенсификация аэробных биоэнергетических процессов, активация оксидаз. Активизация пусковых механизмов прорастания семян сопровождается иницированием реакций свободно-радикального окисления, которые через активизацию ПОЛ могут способствовать возрастанию дыхательной активности митохондрий.

Для проверки высказанного предположения был проведен следующий эксперимент. Семена пшеницы сорта Скороспелка улучшенная (всхожесть 44%, жизнеспособность 70%) проращивались в течение трех дней и дифференцировались на проросшие и непроросшие, находящиеся в покое семена. У семян этих двух групп определялась активность АДГ. Из результатов таблицы 2 следует, что у непроросших семян, остающихся в покое, активность АДГ возрастает на 13-21%, в то время как в прорастающих семенах наблюдается снижение активности АДГ на третий день прорастания в 5,4 раза. Эти результаты указывают на то, что для прорастания семян необходима не просто активация всех биоэнергетических процессов, а переключение дегидрогеназных реакций на аэробные.

Однако при прорастании семян с появлением корней и побегов активность АДГ резко снижается к шестому дню практически до нуля. Мы предположили, что малые концентрации этанола или ацетальдегида оказывают свое влияние именно на эти механизмы. Результаты, приведенные в таблице 3, подтверждают сделанное предполо-

жение. Увеличение всхожести семян пшеницы наблюдается в тех случаях, когда зерновки подвергались обработке малыми концентрациями этанола или ацетальдегида, что сопровождалось снижением активности АДГ. Однако высокие концентрации этанола и ацетальдегида способствовали понижению всхожести при сохранении достаточно высоких показателей жизнеспособности зерновок пшеницы.

Понижение активности АДГ в процессе прорастания зерновок пшеницы, возможно, обусловлено действием на фермент метаболитов синтетических процессов, в частности, нуклеотидфосфатов, которые имеют сходство с коферментом. Однако для изучения ингибирующих свойств нуклеотидфосфатов нам необходимо было иметь очищенный препарат фермента, который бы длительное время мог храниться без потери активности.

Ранее были разработаны условия очистки алкогольдегидрогеназы из животных тканей [18]. Сложность получения высокоочищенного препарата фермента заключается в том, что в водных растворах алкогольдегидрогеназа быстро инактивируется. Для ее стабилизации используется 10%-ный этанол, что неприемлемо в случаях использования препарата АДГ для анализа содержания этанола и изучения физико-химических свойств фермента. При попытке лиофилизации образец фермента полностью теряет активность. Поэтому мы использовали ранее разработанную нами методику очистки алкогольдегидрогеназы [15]. Очищенный по данной методике фермент использовался нами в дальнейших исследованиях.

Таблица 1

Активность ферментов зерновок пшеницы сорта Скороспелка улучшенная в зависимости от сроков сбора урожая

Срок хранения зерновок, годы	Жизнеспособность, %	Всхожесть, %	Активность ферментов, мкмоль/мин. г сухой массы, %		
			АДГ	Г-6-ФДГ	НАДФ-ИЦДГ
1	99±1	96±2	2,89 (100)	1,75 (100)	2,83 (100)
3	88±2	79±5	1,56 (53,9)	1,20 (68,6)	2,11 (74,6)
5	56±2	24±2	1,26 (43,6)	0,78 (44,6)	1,39 (49,0)

Таблица 2

Активность (мкмоль/мин. г сухой массы) АДГ в жизнеспособных прорастающих и находящихся в состоянии покоя зерновок пшеницы сорта Скороспелка улучшенная

Состояние зерновок	Время прорастания зерновок	АДГ
Контроль	-	3,8±0,3
	1	3,1±0,3
Проросшие	3	0,7±0,1
	1	4,3±0,4
Непроросшие	3	4,6±0,4

Таблица 3

Влияние обработки зерновок пшеницы сорта Скороспелка улучшенная растворами этанола и ацетальдегида на их жизнеспособность и всхожесть. Условия: 23°C, активность ферментов в зерновках измеряли на 4-е сутки после начала проращивания

Реагенты	Концентрация, мМ	Жизнеспособность, %	Всхожесть, %	Активность АДГ, мкмоль/мин. г сухой массы
Контроль	-	-	-	2,6±0,3
Вода	-	92±2	79±5	1,0±0,1
Этанол	1,0	93±2	91±3	0,6±0,1
	10,0	93±2	89±3	0,3±0,1
	100,0	89±3	76±6	1,3±0,1
	500,0	88±4	70±5	1,8±0,2
	1000,0	43±4	25±5	3,0±0,3
Ацетальдегид	0,1	92±2	80±3	1,0±0,1
	10,0	92±2	82±4	1,1±0,1
	25,0	91±3	75±5	1,5±0,1
	50,0	88±6	56±4	2,0±0,2
	65,0	70±4	44±4	2,9±0,3
	80,0	20±5	3±2	0,8±0,1

Известно, что АТФ и другие нуклеотид-фосфаты способны регулировать активность ключевых метаболических ферментов. К таким ферментам относятся гексокиназа, пируваткиназа, фосфофруктокиназа и другие. Однако в доступной нам литературе мы не нашли работ о влиянии нуклеотид-фосфатов на активность алкогольдегидрогеназы. Поэтому в дальнейшем была изучена роль АТФ, АДФ и АМФ на кинетику реакций окисления этанола и восстановления ацетальдегида, катализируемых алкогольдегидрогеназой, причем ингибирование прямой реакции (АДГ₁) изучено при рН 10,0, а обратной (АДГ₂) – при рН 6,5 (табл. 4). Показано, что нуклеотидфосфаты способны конкурентно ингибировать АДГ в реакции окисления этанола с константой ингибирования, равной 3,4-7,0 мМ, а в реакции восстановления ацетальдегида – 0,6-24,0 мМ. Отсюда следует, что АТФ и АДФ сильнее ингибируют АДГ в реакции восстановления ацетальдегида, тогда как АМФ ингибирует эту реакцию в 40-48 раз хуже.

Таким образом, под контролем нуклеотидфосфатов находятся как прямая, так и обратная реакции. Однако АТФ и АДФ более избирательно действуют на алкогольдегидрогеназу в реакции восстановления ацетальдегида, что, по-видимому, связано с преимущественным использованием образующегося ацетальдегида в анаболических реакциях для синтеза функционально активных соединений, активизации автокаталитиче-

ских реакций за счет модификации NH₂-групп и других групп белков, а также частично для синтеза АТФ. В случае накопления АТФ в чрезмерно высоких концентрациях нуклеотиды способны ингибировать и прямую реакцию, предотвращая использование ацетальдегида в синтетических процессах, в том числе и в реакциях синтеза АТФ.

Следовательно, АДГ семян при физиологических рН преимущественно способна катализировать реакцию накопления этанола, который в покоящихся семенах может выполнять роль основного энергетического субстрата метаболических процессов. За счет генерации этанола в семенах поддерживаются их высокая жизнеспособность и длительная сохранность. При этом реакция восстановления ацетальдегида находится под контролем эндогенных нуклеотидфосфатов (АТФ и АДФ), избыток которых, по-видимому, может ингибировать фермент, регулируя таким образом уровень эндогенных этанола и ацетальдегида в семенах, находящихся в состоянии вынужденного покоя.

При прорастании семян активизируются метаболические процессы, увеличивающие концентрацию АТФ в проростке, в результате содержание нуклеотидфосфатов начинает накапливаться в системе. Избыточное содержание АТФ в проростках приводит к ингибированию АДГ, что и проявляется в виде понижения активности фермента при прорастании проростков пшеницы.

Таблица 4

Величины констант ингибирования алкогольдегидрогеназы зерен пшеницы нуклеотидфосфатами

Нуклеотидфосфаты	Константы ингибирования, мМ		Отношение $k_{инАДГ1}/k_{инАДГ2}$
	АДГ ₁	АДГ ₂	
АТФ	3,4	0,6	5,7
АДФ	7,0	0,5	14,0
АМФ	4,0	24,0	0,2

Таким образом, АТФ может выполнять роль регулятора или «триггера» алкогольдегидрогеназной активности, осуществляя направленное переключение процессов с анаэробных на аэробные, при повышении функциональной активности митохондрий.

Заключение

Алкогольдегидрогеназа является ферментом, регулирующим в живых организмах равновесие эндогенных спиртов и альдегидов и за счет этого обеспечивающая жизнеспособность зерновок в состоянии гипобиоза. Высокая активность фермента отмечается в зерновках пшеницы в период их вынужденного покоя. АДГ способна регулировать в клетках уровень эндогенных алифатических спиртов и альдегидов, которые являются промежуточными продуктами метаболических процессов, и поэтому накапливается в клетках живых организмов, находящихся в состоянии покоя. Кроме того, АДГ может регулировать соотношение окисленной и восстановленной формы НАД и за счет этого поддерживать жизнеспособность живых организмов. Основными субстратами АДГ в клетках являются этанол и ацетальдегид, которые могут участвовать в энергетических процессах в растительных тканях. Кроме того, этанол может регулировать интенсивность перекисного окисления и проницаемость клеточных мембран, тогда как высокая реакционная способность ацетальдегида позволяет ему участвовать в реакциях автокаталитических процессов. При этом ацетальдегид может модифицировать функциональные группы белков, изменяя их биологическую активность. Увеличение содержания ацетальдегида в клетках может приводить к ингибированию терминального окисления. Поэтому алкогольдегидрогеназа в клетках покоящихся организмов способна участвовать в процессах автокатализа и апоптоза. Регулировать активность фермента в клетках растений могут нуклеотидфосфаты, конкурирующие с коферментом за центр связывания.

Библиографический список

1. Stiborova M., Leblova S. Study on the bonding of the substrate to alcohol dehydrogenase // *Biochem and Physiol. Plant.* – 1979. – V. 174. – № 5. – P. 446-450.
2. Stege T.E. Induction of acetaldehyde lipid peroxidation in hepatic cell // *Res. Commun. Chem. Phatol. and Pharmacol.* – 1982. – V. 36. – № 2. – P. 287-297.
3. Winter H., Wiersema P.K. Glucose and alcohol metabolism in *Pisum sativum* L // *Acta bot. neer.* – 1981. – V. 30. – № 1-2. – P. 131-138.
4. Иванов Б.И., Кершенгольц Б.М., Ксенофонтова К.И., Рогожин В.В. Эколого-фи-

зиологические и некоторые биохимические аспекты жизнеспособности семян пшеницы в условиях Якутии // *Деп. ВИНТИ.* – 1988. – № 6629-В-88. – 30 с.

5. Остапчук Е.Д. Чувствительность озимых культур к затоплению, этанолу и ацетальдегиду // *Устойчивость растений к неблагоприятным температурным условиям среды: сб. науч. тр.* – Киев: Наукова думка, 1976. – С. 141-148.

6. Комиссарова И.А., Магалиф А.Ю., Ротенберг Ю.С., Гудкова Ю.В. Молекулярные механизмы действия эндогенного и экзогенного этанола // *Известия АН СССР, Серия биологическая.* – 1963. – № 2. – С. 260-267.

7. Goldstein D.B., Chin Y.H. Interaction of ethanol with biological membranes // *Ped. Proc.* – 1981. – V. 40. – № 7. – P. 2073-2076.

8. Fulton J.M., Erickson A.E. Relation between soil aeration and ethyl alcohol accumulation in xylen oxidase of tomatoes // *Soil. Scie. Soc. Amer. Proc.* – 1964. – V. 28. – № 5. – P. 610-616.

9. Сторожок С.А. Содержание гидроперекисей в липидах, активность супероксиддисмутазы и глюконозо-6-фосфатдегидрогеназы эритроцитов при алкогольной интоксикации // *Вопросы медицинской химии.* – 1983. – Т. 29. – № 6. – С. 31-34.

10. Жизнеспособность семян / под ред. М.К. Фирсовой. – М.: Колос, 1975. – 415 с.

11. Рогожин В.В. Практикум по биологической химии. – СПб.: Лань, 2006. – 256 с.

12. Einarsson R., Widell L., Zeppezawer M. Active site titration of Horse liver ADH by Dual Wavelength Spectrophotometry // *Analyt. Letters.* – 1976. – V. 9. – № 9. – P. 815-823.

13. Рогожин В.В., Говорова Т.П., Кершенгольц Б.М. Селективный метод титрования активных центров алкогольдегидрогеназы хлор- и гидроксимеркурибензоатом // *Биоорганическая химия.* – 1988. – Т. 14. – № 12. – С. 1626-1631.

14. Методы биохимических исследований / под ред. М.Н. Прохоровой. – Л., 1982. – 271 с.

15. Рогожин В.В., Говорова Т.П., Кершенгольц Б.М. Получение активного и стабильного препарата АДГ зерен пшеницы // *Краевая патология сельскохозяйственных животных: сб. науч. тр.* – Якутск: Изд-во Госкомиздат ЯАССР, 1990. – С. 40-50.

16. Березин И.В., Березин И.В., Клевсов А.А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. – М.: Изд-во МГУ, 1976. – 320 с.

17. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.

18. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. – М.: Высшая школа, 1971. – С. 121-125.