

Ю. В. Карпець, Ю. Є. Колупаєв, М. В. Швиденко,
член-кореспондент НАН України О. П. Дмитрієв

Вплив екзогенного оксиду азоту (NO) на генерацію супероксидного аніон-радикала та теплостійкість колеоптилів пшениці

Показано, що обробка колеоптилів пшениці донорами оксиду азоту (NO) нітропрусидом натрію або нітритом натрію призводить до значного посилення генерації ними супероксидного аніон-радикала ($O_2^{\bullet-}$). Екзогенний NO дещо знижує активність супероксиддисмутази в колеоптилях і не впливає на активність різних форм пероксидази. Посилення генерації $O_2^{\bullet-}$, спричинюване донором NO, пригнічується інгібіторами НАДФН-оксидази, але не інгібітором пероксидази. Під дією донора NO підвищується теплостійкість колеоптилів пшениці. Цей ефект значною мірою знижують інгібітори НАДФН-оксидази. Встановлено, що підвищення теплостійкості колеоптилів під дією екзогенного NO відбувається за участю активних форм кисню, посилення утворення яких пов'язане зі збільшенням активності НАДФН-оксидази.

Оксид азоту (NO) є внутрішньоклітинним медіатором NO-синтазної сигнальної системи. Він бере участь у регуляції різних фізіологічних процесів у клітинах рослин і тварин, зокрема диференціації, морфогенезу, старіння й адаптації рослин [1–4], а також у формуванні захисних реакції у відповідь на біотичний стрес [1, 5].

Менш дослідженими залишаються механізми участі NO у формуванні стійкості рослин до дії абіотичних стресів. Повідомляється про позитивний вплив донорів NO на стійкість рослин до зневоднення, опроміювання УФ-В, сольового стресу, гіпертермії [4–8].

Біологічна активність NO реалізується у взаємодії з медіаторами інших сигнальних систем, зокрема з активними формами кисню (АФК) [1, 2]. На рослинах бобів показано, що ефект екзогенного NO як агента, що викликає закриття продихів, не пригнічується каталазою і реалізується незалежно від АФК [9]. З іншого боку, є відомості про здатність NO спричиняти зміни активності ряду ферментів, причетних до регуляції окиснювально-відновного балансу в рослинних тканинах. Показано, що введення донорів NO в апопласт листків пшениці призводить до зниження активності супероксиддисмутази (СОД), підвищення активності позаклітинної пероксидази і накопичення АФК [10]. У культурі тканин коренів женьшеню донор NO спричиняв активацію НАДФН-оксидази і посилення генерації супероксидного аніон-радикала $O_2^{\bullet-}$ [11]. Посилення утворення цієї АФК під впливом екзогенного NO виявлено нами на колеоптилях пшениці. При цьому обробка колеоптилів донором NO спричиняла підвищення їх теплостійкості [12].

Ми ставили за мету встановити ферментативні джерела, причетні до посилення генерації супероксидного аніон-радикала колеоптилями пшениці внаслідок їх обробки донорами NO, а також дослідити можливий зв'язок між активацією утворення $O_2^{\bullet-}$ і підвищенням теплостійкості рослинних клітин.

Об'єктом дослідження були відрізки колеоптилів (базальні частини), відокремлені від чотиридобових етіолованих проростків пшениці (*Triticum aestivum* L.) сорту Елегія. Підготовка рослинного матеріалу описана нами раніше [12].

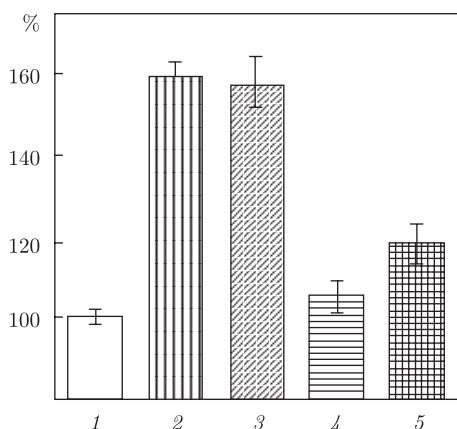


Рис. 1. Вплив донорів і скавенжера оксиду азоту на генерацію супероксидного аніон-радикала колеоптилями пшениці (% до контролю):

1 — контроль; 2 — НПН (500 мкМ); 3 — NaNO₂ (5 мМ); 4 — метиленовий синій (5 мкМ); 5 — НПН (500 мкМ) + метиленовий синій (5 мкМ)

Обробку колеоптилів донорами NO (500 мкМ нітропрусид натрію (НПН) та 5 мМ нітрит натрію (NaNO₂)) проводили протягом 2 год. Оптимальні концентрації цих сполук і час їх впливу на колеоптилі вибирали на підставі даних попередніх експериментів. В окремих серіях експериментів колеоптилі обробляли протягом 3 год скавенжером NO метиленовим синім (5 мкМ) [7], інгібіторами НАДФН-оксидази імідазолом (1 мкМ) або α-нафтолом (1 мкМ) [13] та інгібітором пероксидази саліцилгідроксамовою кислотою (СГК, 500 мкМ) [14]. Концентрації цих сполук вибирали на підставі результатів попередніх дослідів. У варіантах з комбінованою обробкою дані ефектори додавали в основне середовище інкубації колеоптилів (2% сахарозу) за 1 год до введення в нього НПН. Колеоптилі контрольних варіантів інкубували в 2% розчині сахарози.

Після інкубації колеоптилів на розчинах досліджуваних ефекторів частину зразків кожного варіанта піддавали потенційно летальному нагріванню у водному термостаті при (43 ± ± 0,1) °С протягом 10 хв. Далі відрізки всіх варіантів продовжували інкубувати на 2% сахарозі. Через 3 доби після нагрівання оцінювали виживаність колеоптилів [12, 14].

Інтенсивність генерації O₂^{•-} відрізками колеоптилів оцінювали за відновленням нітротетразолію синього [14]. Активність пероксидази визначали за методом Ріджа і Осборна з нашими модифікаціями [14]. Субстратом був пероксид водню, а відновником — гваякол. Активність СОД розраховували, використовуючи метод, в основі якого лежить здатність ферменту конкурувати з нітротетразолієм синім за супероксидні аніон-радикали, що утворюються внаслідок аеробної взаємодії НАДН і феназинметасульфату [14].

На рисунках наведено середні значення трьох незалежних експериментів, проведених у 3–4-разовому біологічному повторенні кожен, та їх стандартні відхилення.

У більшості експериментів як джерело NO використовували НПН. Для оцінки специфічності його впливу як донора NO на генерацію O₂^{•-} колеоптилями пшениці порівнювали ефект НПН з дією NaNO₂, а також досліджували ефект НПН у поєднанні зі скавенжером NO метиленовим синім. Двогодинна обробка колеоптилів обома джерелами NO — НПН і NaNO₂ — при їх введенні у середовище інкубації призводила до посилення генерації O₂^{•-} колеоптилями більш ніж у 1,5 раза (рис. 1). Метиленовий синій, який сам по собі у низькій (5 мкМ) концентрації мало впливав на продукування супероксиду колеоптилями, значною

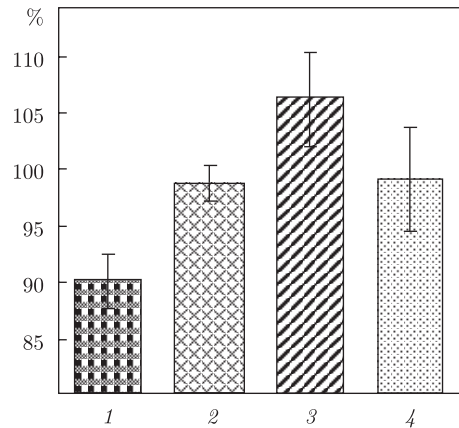


Рис. 2. Активність СОД (1) та загальної (2), іонозв'язаної (3), вільної позаклітинної (4) пероксидази в колеоптилях пшениці, оброблених 500 мкМ НПН (% до контролю без обробки)

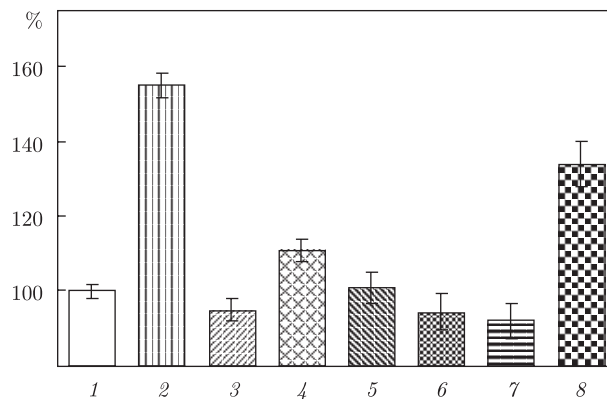


Рис. 3. Вплив НПН та інгібіторів НАДФН-оксидази і пероксидази на генерацію супероксидного аніон-радикала колеоптилями пшениці (% до контролю):

1 — контроль; 2 — НПН (500 мкМ); 3 — імідазол (1 мкМ); 4 — НПН (500 мкМ) + імідазол (1 мкМ); 5 — α-нафтол (1 мкМ); 6 — НПН (500 мкМ) + α-нафтол (1 мкМ); 7 — SGK (500 мкМ); 8 — НПН (500 мкМ) + SGK (500 мкМ)

мірою нівелював дію НПН на генерацію $O_2^{\bullet-}$. Таким чином, є підстави вважати, що вплив НПН на продукування $O_2^{\bullet-}$ зумовлений саме утворенням NO, а не його побічними ефектами.

У наступній серії експериментів досліджували вплив донора NO на активність СОД і різних форм пероксидази. Обробка колеоптилів НПН, яка спричинювала істотне посилення генерації $O_2^{\bullet-}$, призводила до незначного (приблизно на 10%) інгібування СОД і достовірно не впливала на активність пероксидази (рис. 2). Можна припустити, що у посиленні генерації $O_2^{\bullet-}$ колеоптилями пшениці під впливом донора NO задіяні інші ферментні системи.

Відомо, що одним з основних джерел утворення $O_2^{\bullet-}$ клітинною поверхнею є НАДФН-оксидаза [15]. Наші експерименти показали, що попередня обробка колеоптилів специфічними інгібіторами цього ферменту — імідазолом і α-нафтолом — нівелювала дію донора NO на генерацію $O_2^{\bullet-}$, хоча самі по собі ці інгібітори істотно не впливали на виділення $O_2^{\bullet-}$ колеоптилями (рис. 3). Водночас інгібітор пероксидази SGK не знімав посилення генерації $O_2^{\bullet-}$, що відбувалося під впливом екзогенного NO.

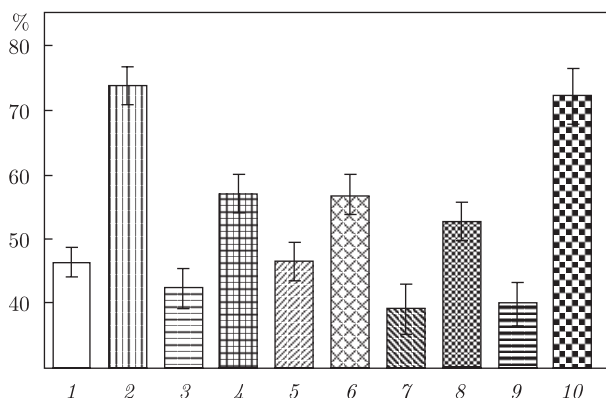


Рис. 4. Вживаність (%) колеоптилів пшениці після ушкоджуючого нагрівання (43 °С, 10 хв):
 1 – контроль; 2 – НПН (500 мкМ); 3 – метиленовий синій (5 мкМ); 4 – НПН (500 мкМ) + метиленовий синій (5 мкМ); 5 – імідазол (1 мкМ); 6 – НПН (500 мкМ) + імідазол (1 мкМ); 7 – α-нафтол (1 мкМ); 8 – НПН (500 мкМ) + α-нафтол (1 мкМ); 9 – SGK (500 мкМ); 10 – НПН (500 мкМ) + SGK (500 мкМ)

Досліджувані інгібітори НАДФН-оксидази (імідазол і α-нафтол) достовірно не впливали на загальну активність пероксидази, а також на активність іонозв'язаної пероксидази клітинних стінок і вільну форму цього ферменту (результати не наводяться). Не виявлено впливу цих інгібіторів і на активність пероксидази *in vitro* при додаванні їх до екстракту ферменту в концентраціях 1 або 10 мкМ. Водночас специфічний інгібітор пероксидази SGK в концентрації 500 мкМ при обробці ним колеоптилів інгібував загальну активність пероксидази та активність її іонозв'язаної і вільної позаклітинної форми на 60–70%. Ефект інгібування пероксидази дією SGK відтворювався і в умовах *in vitro*.

Таким чином, є підстави стверджувати, що основним джерелом утворення $O_2^{\bullet-}$, індукваного екзогенним NO, є НАДФН-оксидаза, хоча частково даний ефект може бути пов'язаний з інгібуванням СОД. Проте, як уже зазначалося, інгібування СОД в колеоптилях під дією НПН в наших експериментах було незначним (див. рис. 2).

Якщо супероксидний радикал, генерація якого збільшується в рослинних тканинах під дією донора NO, причетний до реалізації індукованих NO захисних реакцій, то модифікація його утворення має позначитися на розвитку теплостійкості колеоптилів. Обробка колеоптилів скавенджером NO метиленовим синім сама по собі не спричиняла достовірних змін теплостійкості колеоптилів пшениці, але зменшувала позитивний ефект НПН (рис. 4). Це можна розглядати як свідчення специфічного впливу NO, а не НПН як солі, на теплостійкість. Під дією імідазолу, α-нафтолу та SGK істотних змін теплостійкості колеоптилів не спостерігалось. У той же час обидва інгібітори НАДФН-оксидази значно зменшували позитивну дію донора NO на теплостійкість колеоптилів, а при обробці їх інгібітором пероксидази SGK істотних змін ефекту донора NO не відбувалося (див. рис. 4).

Отже, інгібітори НАДФН-оксидази, які зменшували індукване донором NO посилення утворення супероксидного радикала, знижували і розвиток теплостійкості колеоптилів.

Цілком ймовірно, що зареєстроване нами посилення генерації $O_2^{\bullet-}$ колеоптилями пшениці під дією донора NO могло призводити до локального підвищення вмісту пероксиду водню, який безпосередньо виконує сигнальні функції [15]. Однією із захисних реакцій, індукованих дією NO за посередництва АФК, може бути активація антиоксидантних ферментів. Так, обробка донором NO культури коренів женьшеню разом з посиленням генерації $O_2^{\bullet-}$ спричиняла підвищення активності каталази та аскорбатпероксидази [11]. Обробка екзоген-

ним NO листків мутанта арабідопсису з порушеним синтезом ендogenous NO призводила до підвищення активності антиоксидантних ферментів у відповідь на опромінення рослин УФ-В [4]. Повідомляється і про посилення накопичення низькомолекулярних антиоксидантів, зокрема проліну, за обробки рослинних об'єктів донорами NO [6].

Таким чином, одержані результати свідчать про те, що обробка колеоптилів пшениці донорами NO активує захисні реакції, необхідні для розвитку теплостійкості. Індукування цих реакцій відбувається за участю АФК, оскільки супроводжується посиленням генерації $O_2^{\bullet-}$ колеоптилями і нівелюється інгібіторами НАДФН-оксидази.

1. *Дмитриев А. П.* Сигнальная роль оксида азота у растений // Цитология и генетика. – 2004. – **38**, № 4. – С. 67–75.
2. *Wilson I. D., Neill S. J., Hancock J. T.* Nitric oxide synthesis and signalling in plants // Plant Cell Environ. – 2008. – **31**. – P. 622–631.
3. *Красиленко Ю. А., Емец А. И., Блом Я. Б.* Функциональная роль оксида азота у растений // Физиология растений. – 2010. – **57**, № 4. – С. 483–494.
4. *Zhang L., Zhou S., Xuan Y. et al.* Protective effect of nitric oxide against oxidative damage in *Arabidopsis* leaves under ultraviolet-B irradiation // J. Plant Biol. – 2009. – **52**. – P. 135–140.
5. *Zaninotto F., Camera S. L., Polverari A., Delledonne M.* Cross talk between reactive nitrogen and oxygen species during the hypersensitive disease resistance response // Plant Physiol. – 2006. – **141**. – P. 379–383.
6. *Zhang H., Shen W. B., Xu L. L.* Effect of nitric oxide on the germination of wheat seeds and its reactive oxygen species metabolisms under osmotic stress // Acta Bot. Sinica. – 2003. – **45**. – P. 901–905.
7. *Zhang Y., Wang L., Liu Y. et al.* Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na^+/H^+ antiport in the tonoplast // Planta. – 2006. – **224**. – P. 545–555.
8. *Uchida A., Jagendorf A. T., Hibino T. et al.* Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice // Plant Sci. – 2002. – **163**. – P. 515–523.
9. *Lu D., Zhang X., Jiang J. et al.* NO may function in the downstream of H_2O_2 in ABA-induced stomatal closure in *Vicia faba* L. // J. Plant Physiol. Mol. Biol. – 2005. – **31**. – P. 62–70.
10. *Викторова Л. В., Максютова Н. Н., Трифонова Т. В., Андрианов В. В.* Образование пероксида водорода и оксида азота при введении нитрата и нитрита в апопласт листьев пшеницы // Биохимия. – 2010. – **75**, № 1. – С. 117–124.
11. *Tewari R. K., Hahn E. J., Paek K. Y.* Function of nitric oxide and superoxide anion in the adventitious root development and antioxidant defence in *Panax ginseng* // Plant Cell Rep. – 2008. – **27**. – P. 563–573.
12. *Карпец Ю. В., Колупаев Ю. Е., Ястреб Т. О. и др.* Индуцирование теплоустойчивости колеоптилей пшеницы действием донора оксида азота: связь NO с другими сигнальными мессенджерами // Вісн. Харків. нац. аграр. ун-ту. Сер. Біологія. – 2010. – Вип. 1 (19). – С. 44–55.
13. *Hung K. T., Hsu Y. T., Kao C. H.* Hydrogen peroxide is involved in methyl jasmonate-induced senescence of rice leaves // Physiol. Plant. – 2006. – **127**. – P. 293–303.
14. *Колупаев Ю. Е., Карпец Ю. В., Ястреб Т. О., Мусатенко Л. И.* Участие пероксидазы и супероксиддисмутазы в усилении генерации активных форм кислорода колеоптилями пшеницы при действии салициловой кислоты // Физиология и биохимия культ. растений. – 2010. – **42**. – С. 210–217.
15. *Neill S. J., Desikan R., Clarke A. et al.* Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants // J. Exp. Bot. – 2002. – **53**. – P. 1237–1247.

Харківський національний аграрний
університет ім. В. В. Докучаєва
Інститут клітинної біології і генетичної
інженерії НАН України, Київ

Надійшло до редакції 10.02.2011

Yu. V. Karpets, Yu. E. Kolupaev, M. V. Shvidenko,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine **O. P. Dmitriev**

Effects of exogenous nitric oxide (NO) on the generation of superoxide anion-radical and heat resistance of wheat coleoptiles

Treatment of wheat coleoptiles with nitric oxide (NO) donors, sodium nitroprusside or sodium nitrite, induces a considerable intensification of superoxide anion-radical ($O_2^{\bullet-}$) generation by them. Exogenous nitric oxide insignificantly reduces the superoxide dismutase activity in coleoptiles and does not change the activity of different peroxidase forms. The intensification of $O_2^{\bullet-}$ generation caused by NO donor is suppressed by NADPH-oxidase inhibitors, but not by peroxidase inhibitor. The heat resistance of wheat coleoptiles increases under the influence of NO donor. This effect is substantially reduced by NADPH-oxidase inhibitors. Thus, the induction of heat resistance of coleoptiles under the influence of exogenous NO occurs with the involvement of reactive oxygen species, whose increased generation is related to an enhancement of the NADPH-oxidase activity.