

Ю. Є. Колупаєв, О. І. Обозний,  
член-кореспондент НАН України Л. І. Мусатенко

## Участь супероксиддисмутази у клітинному сигналінгу при тепловому загартуванні проростків пшениці

*Показано, що 1-хвилинний вплив на проростки пшениці температури 42 °С викликає транзиторне посилення генерації супероксидного аніон-радикала ( $O_2^{\bullet-}$ ) і підвищення вмісту пероксиду водню в коренях з максимумами через 5 і 10 хв відповідно. 10-хвилинний прогрів підвищував активність супероксиддисмутази (СОД). Обробка проростків інгібітором СОД діетилдитіокарбаматом натрію (ДДК) спричинювала зниження активності ферменту, посилення генерації  $O_2^{\bullet-}$  коренями і зменшення в них вмісту  $H_2O_2$ . Після впливу гіпертермії відбувалося поступове підвищення теплостійкості проростків, яке частково нівелювалося передобробкою ДДК. Зроблено висновок про участь СОД у передачі сигналу гіпертермії в генетичний апарат, що зумовлює розвиток теплостійкості рослин.*

За сучасними уявленнями, активні форми кисню (АФК) розглядаються як учасники трансдукції в генетичний апарат різноманітних (наприклад, гормональних, стресових) сигналів, що сприймаються рослинною клітиною [1, 2]. Водночас експериментальних доказів причинно-наслідкового зв'язку між посиленням утворення АФК рослинними клітинами під впливом тих чи інших чинників і розвитком адаптивних реакцій досі недостатньо. Є підстави припускати, що особливу роль у процесах сигнальної трансдукції відіграє генерація АФК у ферментативних реакціях, адже вона, на відміну від спонтанного утворення АФК, як правило, перебуває під контролем клітини.

Раніше нами було показано транзиторне посилення утворення пероксиду водню в рослинних об'єктах у відповідь на дію загартовуючих високих температур [3]. Встановлено пригнічення утворення  $H_2O_2$ , спричинюваного гіпертермією, інгібіторами НАДФН-оксидази і пероксидази [4] — ферментів, здатних продукувати супероксидний аніон-радикал  $O_2^{\bullet-}$ . Проте нез'ясованою залишається роль конкретних АФК в індукуванні адаптивних реакцій. Вважається, що сигнальні функції в клітинах виконує насамперед  $H_2O_2$  — стабільна молекула, здатна проникати через мембрани [5]. Пероксид водню може утворюватися із супероксидного аніон-радикала спонтанно або з участю супероксиддисмутази (СОД). Роль останньої в АФК-залежній передачі сигналу, спричиненого дією гіпертермії, наскільки нам відомо, спеціально не досліджувалася. Зважаючи на це, метою дослідження було з'ясування участі СОД в посиленні утворення пероксиду водню клітинами коренів проростків пшениці у відповідь на дію загартовуючої температури і значення цього процесу для подальшого розвитку теплостійкості рослин.

**Матеріали і методи дослідження.** Об'єктом дослідження були етіюльовані проростки м'якої озимої пшениці (*Triticum aestivum* L.) сорту Елегія, вирощені на очищеній водопровідній воді при 20 °С. Тридобові проростки відповідних варіантів досліду на 14–16 год переносили на 5 мМ розчин інгібітора СОД діетилдитіокарбамату натрію (ДДК) [6], контрольні зразки в цей час продовжували інкубувати на воді.

Потім проростки піддавали 1-хвилинному загартовуючому прогріву у водному термостаті при  $(42,0 \pm 0,1)$  °С. Після загартування проростки відповідних варіантів протягом 1 год

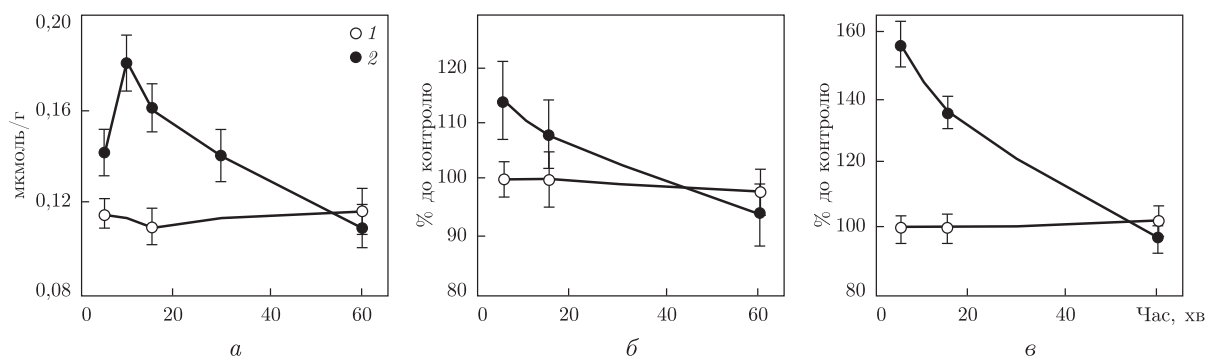


Рис. 1. Динаміка вмісту перексиду водню (а), генерації супероксидного аніон-радикала (б) і активності позаклітинної пероксидази (в) у коренях проростків пшениці після 1-хвилинного впливу температури 42 °С: 1 — контроль; 2 — дослід

продовжували інкубувати на розчині ДДК, після чого переносили на воду. Ушкоджуючому 10-хвилинному прогріву при  $(46,0 \pm 0,1)$  °С проростки піддавали через 24 год після загартовування. Як показано раніше, через такий проміжок часу відзначалася найвища теплостійкість проростків [3]. Через 4 доби після дії ушкоджуючого прогріву оцінювали виживаність зразків.

Вміст  $\text{H}_2\text{O}_2$  водню визначали феротіоціанатним методом, екстрагуючи його з розтертих рослинних тканин 5% трихлороцтовою кислотою [7]. Генерацію  $\text{O}_2^{\bullet-}$  оцінювали шляхом занурення коренів інтактних проростків, у яких попередньо відокремлювали ендосперм, у 0,1 М фосфатний буфер, що містив 0,025% нітросинього тетразолію, 10 мкМ ЕДТА, 0,1% тритону Х-100 на 30 хв. Після цього визначали світлопоглинання при довжині хвилі 530 нм [8]. Для визначення активності позаклітинної пероксидази [9] кореневу систему інтактних проростків занурювали у дистильовану воду (10 мл) на 15 хв. В одержаному екстракційному розчині визначали активність ферменту. Для цього в реакційну кювету вносили 0,75 мл розчину 0,07% гваяколу, 2,25 мл 0,1 М К,Na-фосфатного буферу (рН 6,2), 0,75 мл екстракційного розчину і 0,75 мл 0,15%  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Активність виражали в одиницях збільшення світлопоглинання ( $A_{440}$ ) за 1 хв у розрахунку на один проросток. Для визначення активності СОД і каталази корені гомогенізували на холоді в 0,15 М фосфатному буфері (рН 7,6) з додаванням детергента тритону Х-100 (кінцева концентрація 0,1%). Для аналізу використовували супернатант після центрифугування гомогенату при 8000 g. Активність СОД визначали за методом, в основі якого лежить здатність ферменту конкурувати з нітросинім тетразолієм за супероксидні аніони, що утворюються внаслідок аеробної взаємодії НАДН і феназинметасульфату [10], активність каталази — за кількістю розкладеного  $\text{H}_2\text{O}_2$  [10]. Вміст білка у досліджуваних зразках аналізували за методом Бредфорд [11].

На рисунках наведені результати типових дослідів (середні величини не менш ніж з трьох повторень) та їх стандартні відхилення.

**Результати дослідження та їх обговорення.** У попередніх дослідках аналізували вміст  $\text{H}_2\text{O}_2$  в коренях і пагонах проростків пшениці після 1-хвилинного загартовуючого прогріву при 42 °С. Вміст  $\text{H}_2\text{O}_2$  у пагонах підвищувався на 17–25% протягом перших 5–10 хв після дії гіпертермії і надалі знижувався до рівня контролю. Підвищення вмісту  $\text{H}_2\text{O}_2$  в коренях було істотнішим (максимум через 10 хв становив 64%) і тривалішим, ефект зберігався протягом 30 хв після прогріву. Через 60 хв кількість  $\text{H}_2\text{O}_2$  зменшувалася до величини контрольованого варіанта (рис. 1, а). Зважаючи на більш виражену реакцію коренів на гіпер-

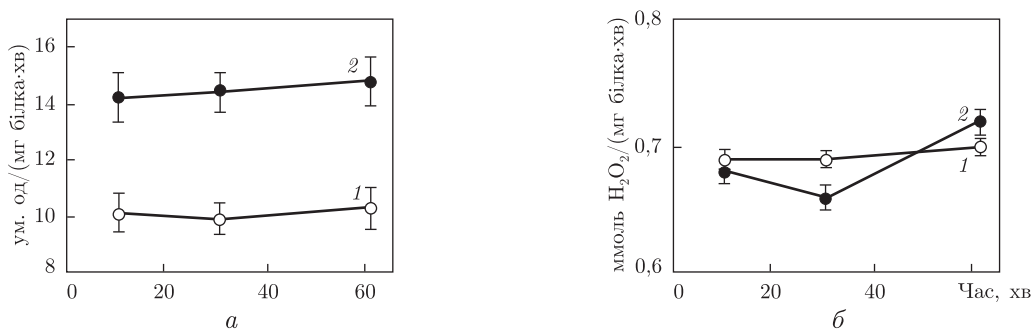


Рис. 2. Активність СОД (а) і каталази (б) у коренях проростків пшениці після 1-хвилинного впливу температури 42 °С: 1 — контроль; 2 — дослід

термію, у подальших експериментах зміни вмісту АФК і активності ферментів детально досліджували саме у цих органах.

Через 5 хв після загартовуючого прогріву відзначалося невелике (на 14%) посилення генерації  $O_2^{\bullet-}$  коренями, вже через 15 хв цей ефект зменшувався, а через 1 год інтенсивність утворення  $O_2^{\bullet-}$  коренями загартованих проростків була навіть трохи нижчою від контролю (див. рис. 1, б).

Одним з основних ферментативних джерел  $O_2^{\bullet-}$  в коренях пшениці можуть бути позаклітинні форми неспецифічних пероксидаз [9]. У наших експериментах вже через 5 хв після загартовуючого прогріву відзначалося більш ніж 1,5-разове підвищення активності пероксидази, що виділялася коренями в екстраклітинний розчин (див. рис. 1, в). Однак через 1 год спостережень цей ефект повністю нівелювався.

Можна припустити, що підвищення вмісту  $H_2O_2$  в коренях, яке відзначалося протягом 5–30 хв після загартовуючого прогріву проростків, зумовлене посиленням генерації  $O_2^{\bullet-}$  (зокрема, в пероксидазних реакціях) і подальшим перетворенням його на  $H_2O_2$ . Збільшення пулу  $H_2O_2$  може бути пов'язане з підвищенням активності СОД та/або зниженням активності ферментів, що його знешкоджують, зокрема каталази.

Дослідження динаміки СОД показало істотне підвищення активності ферменту через 10 хв після загартовуючого прогріву проростків, більш висока порівняно з контролем активність СОД відзначалася протягом всієї години спостережень (рис. 2, а). Водночас активність каталази під впливом нагріву проростків достовірно не змінювалася (див. рис. 2, б).

Для з'ясування внеску СОД у накопичення  $H_2O_2$  після загартування проростків у подальших експериментах використовували інгібіторний аналіз. При цьому досліджувані показники визначали через 10 хв після загартовуючого прогріву проростків. Обробка проростків інгібітором СОД ДДК призводила до зниження активності ферменту в коренях проростків і помітно послаблювала вплив прогріву на ензиматичну активність (рис. 3, а). Інгібітор СОД повністю усував спричинюваний загартуванням ефект підвищення вмісту  $H_2O_2$  в коренях, при цьому ДДК також дещо знижував вміст  $H_2O_2$  в коренях незагартованих проростків (див. рис. 3, б). Водночас ДДК, перешкоджаючи СОД-залежному перетворенню  $O_2^{\bullet-}$ , збільшував показник його генерації коренями пшениці, особливо у варіанті з впливом загартовуючої температури (див. рис. 3, в).

Таким чином, є підстави вважати, що загартовуючий прогрів проростків призводить до підвищення активності ферментів, які генерують  $O_2^{\bullet-}$ , зокрема позаклітинної пероксидази, і подальшого перетворення  $O_2^{\bullet-}$  на  $H_2O_2$  за рахунок збільшення активності СОД. Як

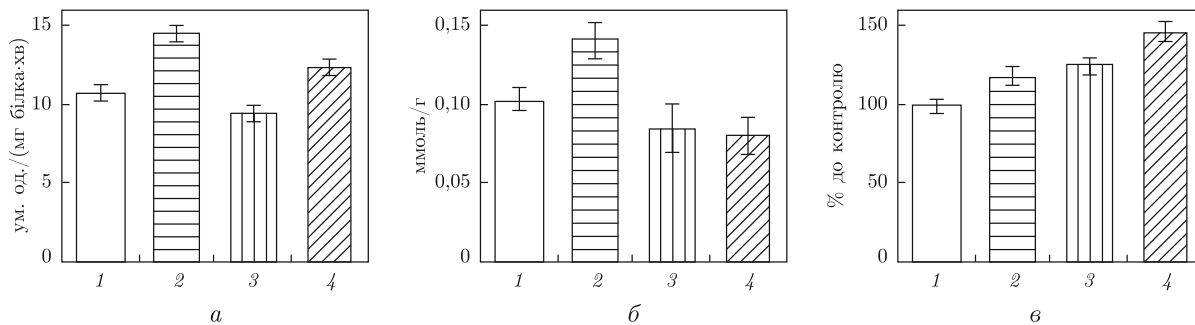


Рис. 3. Вплив ДДК на активність СОД (а), вміст пероксиду водню (б) і генерацію супероксидного аніон-радикала (в) в корнях проростків пшениці через 10 хв після 1-хвилинного прогріву при 42 °С (загартування): 1 – контроль; 2 – загартування; 3 – ДДК (5 мМ); 4 – загартування + ДДК

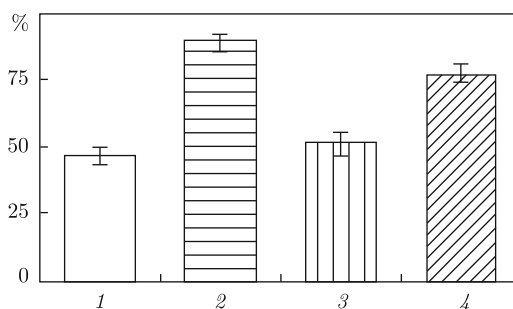


Рис. 4. Вживаність проростків пшениці після ушкоджуючого нагрівання (46 °С, 10 хв): 1 – контроль; 2 – загартування; 3 – ДДК (5 мМ); 4 – загартування + ДДК

було показано нами раніше, обробка проростків пшениці антиоксидантом іонолом [3] або специфічним скавенджером пероксиду водню диметилтіосечовиною [4] нівелювала позитивний вплив загартовуючого прогріву на розвиток їх теплостійкості. Отже, напевно, АФК беруть участь у трансдукції в генетичний апарат клітин сигналу, необхідного для індукції захисних реакцій. Якщо у ролі основної сигнальної молекули розглядати  $H_2O_2$  і вважати, що його утворення залежить від активності СОД, варто очікувати нівелювання спричинюваного загартовуючим прогрівом ефекту підвищення теплостійкості проростків пшениці за умови їх обробки інгібітором СОД. І дійсно, ДДК частково нівелював ефект теплового загартування, сам по собі достовірно не впливаючи на теплостійкість проростків пшениці (рис. 4). Негативний вплив ДДК на розвиток теплостійкості проростків, ймовірно, зумовлений перешкоджанням формуванню  $H_2O_2$  як сигнальної молекули у СОД-залежних реакціях, а не інгібуванням СОД як антиоксидантного ферменту. Так, через 24 год після загартовуючого прогріву активність СОД у корнях проростків, оброблених перед загартуванням інгібітором ферменту, становила  $(12,4 \pm 0,14)$  ум. од./ $(\text{мг білка} \cdot \text{хв})$ , що було навіть дещо вище, ніж у корнях контрольних проростків  $((11,2 \pm 0,11)$  ум. од./ $(\text{мг білка} \cdot \text{хв})$ ). Іншими словами, за обраного нами способу обробки проростків ДДК його вплив на активність СОД був оборотним й істотно не позначався на її величині у корнях в момент ушкоджуючого прогріву.

Відомо, що ферменти, які генерують  $O_2^{\bullet-}$  (пероксидаза, НАДФН-оксидаза), локалізовані переважно в плазматичній мембрані і клітинних стінках [9, 12]. СОД міститься у різних клітинних компартментах, у значній кількості в цитозолі, проте виявлена і в апопла-

сті [13, 14]. Можна припустити, що саме апопластна СОД, перетворюючи супероксидний радикал на  $\text{H}_2\text{O}_2$ , сприяє проникненню молекул АФК в цитоплазму і виконанню ними сигнальних функцій. Водночас не виключається і можливість проникнення  $\text{O}_2^{\bullet-}$  в цитозоль з подальшим його перетворенням на  $\text{H}_2\text{O}_2$  внутрішньоклітинними формами СОД [12].

Отже, отримані експериментальні дані можна розглядати як підтвердження нашого припущення щодо функцій СОД не лише в антиоксидантному захисті клітин, а й у трансдукції сигналу дії високої температури в геном шляхом перетворення супероксидного аніон-радикала на сигнальну молекулу перексиду водню. Сигналінг з участю АФК необхідний для подальшого формування адаптивних реакцій, які зумовлюють підвищення теплостійкості рослин.

1. Suzuki N., Mittler R. Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction // *Physiol. Plant.* – 2006. – **126**. – P. 45–51.
2. Zhang A., Zhang J., Ye N. et al. ZmMPK5 is required for the NADPH oxidase-mediated selfpropagation of apoplastic  $\text{H}_2\text{O}_2$  in brassinosteroid-induced antioxidant defence in leaves of maize // *J. Exp. Bot.* – 2010. – **61**. – P. 4399–4411.
3. Kolupaev Yu. Ye., Karpets Yu. V., Kosakivska I. V. The importance of reactive oxygen species in the induction of plants resistance to the heat stress // *Gen. Appl. Plant Physiol.* – 2008. – **34**, No 3–4. – P. 251–266.
4. Колупаев Ю. Е., Обозный А. И., Карпец Ю. В. Супрессия эффекта теплового закаливания растений антиоксидантами и ингибиторами прооксидантных ферментов // *Клеточная сигнализация у растений. III Междунар. симп.* – Казань, 2011. – С. 81–82.
5. Bienert G. P., Møller A. L., Kristiansen K. A. et al. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes // *J. Biol. Chem.* – 2007. – **282**. – P. 1183–1192.
6. Heikkila R. E., Cabbat F. S., Cohen G. *In vivo* inhibition of superoxide dismutase activity by diethdithiocarbamate // *J. Biol. Chem.* – 1976. – **251**. – P. 2182–2185.
7. Sagisaka S. The occurrence of peroxide in a perennial plant, *Populus gelrica* // *Plant Physiol.* – 1976. – **57**. – P. 308–309.
8. Шорнинг Б. Ю., Смирнова Е. Г., Ягужинский Л. С., Ванюшин Б. Ф. Необходимость образования супероксида для развития этилированных проростков пшеницы // *Биохимия.* – 2000. – **65**, вып. 12. – С. 1612–1618.
9. Minibayeva F., Mika A., Luthje S. Salicylic acid changed the properties of extracellular peroxidase activity secreted from wounded wheat (*Triticum aestivum* L.) roots // *Protoplasma.* – 2003. – **221**. – P. 67–72.
10. Колупаев Ю. Е., Акиннина Г. Е., Мокроусов А. В. Индукция теплоустойчивости coleoptилей пшеницы ионами кальция и ее связь с окислительным стрессом // *Физиология растений.* – 2005. – **52**, № 2. – С. 227–232.
11. Bradford M. M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – **72**. – P. 248–254.
12. Sagi M., Fluhr R. Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases // *Plant Physiol.* – 2006. – **141**. – P. 336–340.
13. Ogawa K., Kanematsu S., Asada K. Generation of superoxide anion and localisation of Cu/Zn-superoxide dismutase in vascular tissue of spinach hypocotyls: their association with lignification // *Plant Cell Physiol.* – 1997. – **38**. – P. 1118–1126.
14. Miller R., Suzuki N., Ciftci-Yilmaz S., Mittler R. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses // *Plant Cell Environ.* – 2010. – **33**. – P. 453–467.

Харківський національний аграрний  
університет ім. В. В. Докучаєва  
Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного  
НАН України, Київ

Надійшло до редакції 02.03.2012

**Ю. Е. Колупаев, А. И. Обозный,**  
член-корреспондент НАН Украины **Л. И. Мусатенко**

### **Участие супероксиддисмутазы в клеточном сигналинге при тепловом закаливании проростков пшеницы**

*Показано, что 1-минутное влияние на проростки пшеницы температуры 42 °С вызывало транзиторное усиление генерации супероксидного анион-радикала ( $O_2^{\bullet-}$ ) и повышение содержания пероксида водорода в корнях с максимумами через 5 и 10 мин соответственно. 10-минутный прогрев повышал активность супероксиддисмутазы (СОД). Обработка проростков ингибитором СОД диэтилдитиокарбаматом натрия (ДДК) вызывала снижение активности фермента, усиление генерации  $O_2^{\bullet-}$  корнями и уменьшение в них содержания  $H_2O_2$ . После влияния гипертермии происходило постепенное повышение теплоустойчивости проростков, которое частично нивелировалось предобработкой ДДК. Сделан вывод об участии СОД в передаче сигнала гипертермии в генетический аппарат, что обуславливает развитие теплоустойчивости растений.*

**Yu. Ye. Kolupaev, O. I. Oboznyj,**  
Corresponding Member of the NAS of Ukraine **L. I. Musatenko**

### **Participation of superoxide dismutase in cellular signalling at heat hardening of wheat plantlets**

*It is shown that the 1-min influence of a temperature of 42 °C on wheat plantlets causes the transitional intensifying of the superoxide anion-radical ( $O_2^{\bullet-}$ ) generation and the increase of the hydrogen peroxide content in roots with the maxima in 5 and 10 min, accordingly. Within 10 min after the heating, the increase of the superoxide dismutase (SOD) activity is observed. The treatment of plantlets with the SOD inhibitor sodium diethyldithiocarbamate (DDC) caused the enzyme activity lowering, intensifying the  $O_2^{\bullet-}$  generation by roots, and a reduction of the  $H_2O_2$  contents in them. After the influence of hyperthermia, the gradual increase of the heat resistance of plantlets took place, which was partially levelled by the pretreatment with DDC. The conclusion on the participation of SOD in the signal transduction of hyperthermia in genome that causes the development of the heat resistance of plants is drawn.*