

ФІЗІОЛОГІЯ І БІОХІМІЯ РОСЛИН

УДК 581.1

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС И СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТОЙ СИСТЕМЫ В КОЛЕОПТИЛЯХ ПШЕНИЦЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА И НАГРЕВА

© 2008 г. Ю. Е. Колупаев¹, Ю. В. Карпец^{1,2}

¹Харьковский национальный аграрный университет им. В.В.Докучаева
(Харьков, Украина)

²Украинский научно-исследовательский институт лесного хозяйства
и агролесомелиорации им. Г.М.Высоцкого
(Харьков, Украина)

Исследовали влияние обработки отрезков coleoptилей пшеницы (*Triticum aestivum* L.) пероксидом водорода на их теплоустойчивость и показатели прооксидантно-антиоксидантного равновесия. Двухчасовая обработка 1 мМ H₂O₂ вызывала снижение активности гваяколпероксидазы и уменьшение генерации coleoptилями O₂⁻. При этом активность супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы возрастала. Воздействие экзогенного H₂O₂ незначительно увеличивало содержание в тканях пероксидов и продукта пероксидного окисления липидов - малонового диальдегида (МДА). Последующий повреждающий нагрев (43°C, 10 мин) вызывал повышение активности гваяколпероксидазы, генерации O₂⁻ и содержания МДА как в контрольных, так и в опытных отрезках. Однако в coleoptилях, обработанных перед нагревом пероксидом водорода, подобные изменения проявлялись в меньшей степени. Нагрев вызывал незначительное повышение активности СОД в coleoptилях всех вариантов. При этом в отрезках, обработанных пероксидом водорода, активность СОД и каталазы была выше, чем в контроле. Предобработка пероксидом водорода повышала теплоустойчивость coleoptилей пшеницы, что связано с индуцированием им адаптивных реакций, среди которых, по-видимому, значительную роль играет ферментативная система антиоксидантной защиты.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., окислительный стресс, пероксид водорода, супероксидный радикал, пероксидное окисление липидов, гваяколпероксидаза, супероксиддисмутаза, каталаза, теплоустойчивость

Изменение окислительно-восстановительного баланса является неспецифической составляющей ответа растительных и животных клеток на действие абиотических и биотических стрессоров [17, 26, 36]. Усиление генерации активных форм кислорода (АФК) и/или уменьшение пула антиоксидантов может быть одной из причин развития повреждений живых

организмов при воздействии неблагоприятных факторов различной природы [30]. Лишь в конце XX ст. начались интенсивные исследования возможной физиологической роли генерации АФК клетками и было признано, что АФК «вызывают не только плохие изменения» [2]. В последние годы обосновывается гипотеза о роли некоторых АФК как вторичных мессенджеров и возможных индукторов защитных реакций клеток [20, 22, 39].

Одним из агентов индуцирования окислительного стресса в экспериментальных усло-

Адрес для корреспонденции: Колупаев Юрий Евгеньевич, Харьковский национальный агроуниверситет, п/о «Коммунист-1», Харьков, 62483, Украина;
e-mail: plant_biology@mail.ru

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС

виях является экзогенный пероксид водорода. H_2O_2 - относительно стабильная АФК с продолжительным временем существования [17]. Имеются сведения о способности экзогенного пероксида водорода повышать устойчивость растений к неблагоприятным абиотическим воздействиям, в частности, к засухе [40], низким [32] и высоким [20, 24] температурам. Проводятся параллели между эффектами активации генов протеинфосфатаз под влиянием теплового шока и H_2O_2 [31].

Логично ожидать модификации активности антиоксидантных ферментов в растениях под влиянием экзогенного агента окислительного стресса. В то же время сведения о действии пероксида водорода на активность антиоксидантных ферментов неоднозначны. Известно, что Cu/Zn-СОД – одна из распространенных форм фермента у эукариот - инактивируется H_2O_2 in vitro [14]. При этом данные in vivo о влиянии пероксида водорода на активность СОД и некоторых других антиоксидантных ферментов противоречивы даже для одинаковых объектов. Так, на примере проростков пшеницы показано, что H_2O_2 ингибировал активность супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы в корнях [15]. Однако в листьях растений пшеницы при обработке пероксидом водорода происходило повышение активности СОД [40], каталазы и глутатионредуктазы [35].

В целом же, до настоящего времени недостаточно исследований, демонстрирующих связь между характером изменения про-/антиоксидантного равновесия, вызываемого экзогенным H_2O_2 , временной динамикой содержания АФК и продуктов пероксидного окисления липидов (ПОЛ), индуцированием антиоксидантной ферментативной системы и повышением устойчивости высших растений к действию других стресс-факторов. В связи с изложенным, мы изучали влияние обработки колеоптилей пшеницы (*Triticum aestivum* L.) H_2O_2 на их теплоустойчивость, динамику генерации одной из первичных АФК – супероксидного радикала [21], содержание в тканях пероксидов, конечного продукта ПОЛ малонового диальдегида (МДА) [1] и активности ключевых ферментов, участвующих в метаболизме АФК – гваяколпероксидазы, СОД и каталазы [14, 20, 30].

МЕТОДИКА

Объектом исследования были отрезки колеоптилей озимой пшеницы сорта Донецкая 48, находящиеся в фазе растяжения [8]. Подго-

товка растительного материала описана нами ранее [4]. Колеоптилю выдерживали 14 ч на 2%-ном растворе сахарозы, после чего к образцам опытных вариантов добавляли H_2O_2 в конечной концентрации 0,5 - 20 мМ и выдерживали отрезки на этих растворах в течение 2 ч. После соответствующей обработки одну часть растительного материала снова переносили на раствор сахарозы, а другую – подвергали повреждающему нагреву в водном ультратермостате при температуре $43,0 \pm 0,1^\circ C$ в течение 10 мин. После прогрева колеоптилю всех вариантов переносили на 2%-ный раствор сахарозы.

Биохимические анализы проводили до и после двухчасовой обработки колеоптилей H_2O_2 , а также через 1, 3 и 24 ч после переноса образцов на раствор сахарозы или через соответствующие временные отрезки после повреждающего нагрева. Как показали предварительные эксперименты, в этих временных интервалах в образцах, подвергнутых прогреву, происходили заметные изменения исследуемых показателей, но еще не наблюдалось видимых повреждений тканей. Перед всеми анализами колеоптилю промывали проточной дистиллированной водой.

Для оценки генерации колеоптилями «внешнего» супероксидного анион-радикала (O_2^-) по 8 колеоптилей помещали в пробирки с 5 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,6), содержащего 0,05% нитротетразолия синего («Serva», США), 10 мкМ ЭДТА и 0,1% тритона X-100. Пробы инкубировали на шейкере «Elpan 358S» (Польша) в течение 1 ч (120 качаний/мин), после чего колеоптилю извлекали из инкубационного раствора и определяли его оптическую плотность при 530 нм [13]. Для проверки специфичности регистрации O_2^- в специальных опытах в пробы добавляли СОД (50 ед./мл среды) («Serva», США). СОД ингибировала генерацию супероксида не менее чем на 90%. В связи с этим считали, что количество восстановленного нитротетразолия синего определяется содержанием O_2^- [13].

Параллельно определяли и способность гомогенатов колеоптилей восстанавливать нитротетразолий синий. Для этого навеску растительного материала гомогенизировали на холоду в 5 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,6), содержащего 1 мМ ингибитора СОД диэтилдитиокарбамата натрия [37] и центрифугировали 10 мин при 7000g, к 3 мл супернатанта добавляли 1 мл 0,05%-ного нитротетразолия синего, смесь инкубировали в течение 30 мин в темноте при комнатной температуре и определяли

A₅₃₀. Результаты выражали в относительных единицах.

Содержание пероксидов в тканях колеоптилей определяли ферроотиоцианатным методом [34]. Навеску растирали на холоду в 5%-ной ТХУ, центрифугировали 10 мин при 7000g, к 3 мл супернатанта добавляли по 0,5 мл 50%-ной ТХУ, 2,5 М NH₄SCN и 10 мМ (NH₄)₂Fe(SO₄)₂ и определяли оптическую плотность раствора при длине волны 480 нм. Концентрацию пероксидов рассчитывали по калибровочному графику, построенному на основе H₂O₂ с последующим пересчетом на 1 г сухой массы.

Интенсивность ПОЛ оценивали по содержанию соединений, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (в основном МДА), используя для анализа гомогенат, приготовленный на 0.1 М Трис-НСl буфере (рН 7,6) [9].

Определение активности растворимой пероксидазы и ионносвязанной пероксидазы клеточных стенок (ЕС 1.11.1.7) проводили по методу [33] с некоторыми модификациями [4]. В качестве экстрагента использовали 0,06 М К₂Na-фосфатный буфер Серенсена (рН 6,2). Активность растворимой формы фермента определяли в супернатанте после центрифугирования гомогената при 1000 g в течение 15 мин. Ионносвязанную пероксидазу определяли в осадке фракции клеточных стенок, извлекая ее с помощью 0,06 М буфера Серенсена с добавлением 0,5 М NaCl. В качестве субстратов использовали H₂O₂ и гваякол («Merck», ФРГ) как донор водорода.

Для определения активности СОД (ЕС 1.15.1.1) и каталазы (ЕС 1.11.1.6) ткани колеоптилей гомогенизировали в 0,15 М фосфатном буфере (рН 7,8) с добавлением детергента тритона Х-100 (конечная концентрация – 0,2 %). Для анализа использовали супернатант после центрифугирования гомогената (7000g, 15 мин). Общую активность СОД измеряли используя метод, основанный на способности фермента конкурировать с нитросиним тетразолием за супероксидные анионы, образующиеся в результате аэробного взаимодействия НАДН и феназинметасульфата [10]. Активность каталазы определяли по количеству разложившейся H₂O₂ [4].

Количество колеоптилей, выживших после нагрева, определяли визуально через 48 ч после теплового стресса.

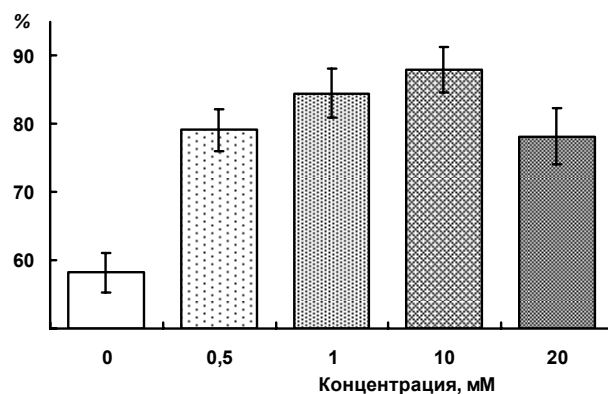


Рис. 1. Влияние пероксида водорода на выживание (%) колеоптилей пшеницы после повреждающего нагрева (43° С, 10 мин).

Во избежание артефактов, которые могут быть связаны с действием раневого стресса и старением (гибелью) отделенных колеоптилей, во всех экспериментах параллельно оценивали выживание отрезков, не подвергнутых нагреву, но испытавших влияние всех процедур эксперимента. Мертвые колеоптили теряли тургор и приобретали специфический белесоватый оттенок [8]. Выживание колеоптилей без прогрева во всех вариантах (независимо от наличия добавок) составляло не менее 95-97%. В связи с этим погрешностью, связанной с раневым стрессом и/или естественным старением колеоптилей, пренебрегали.

Каждый опыт воспроизводили независимо 3-5 раз при трехкратной биологической повторности. На рисунках приведены результаты типичных опытов и их квадратические отклонения. Кроме случаев, оговоренных отдельно, обсуждаются эффекты, достоверные при P ≤ 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Предобработка колеоптилей 1 и 10 мМ H₂O₂ повышала их выживание после повреждающего нагрева на 16-20% (рис. 1). 20 мМ H₂O₂ проявлял токсический эффект (вызывал у колеоптилей торцевые некрозы), хотя и незначительно повышал их выживание после нагрева. Следует отметить, что пероксид водорода в концентрации 0,5-10 мМ не влиял на жизнеспособность отрезков колеоптилей, которые не подвергались тепловому стрессу. Через 48 ч после обработки H₂O₂ выживание составляло не менее 95%. Пероксид водорода в концентрации 20 мМ вызывал появление торцевых некрозов и некоторое сжатие отрезков. В целом же, ткани оставались неповрежденными.

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС

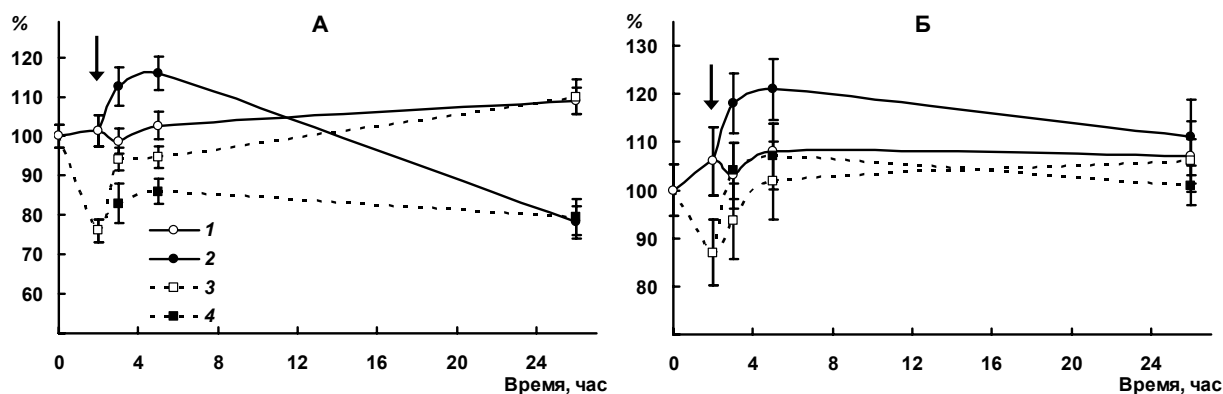


Рис. 2. Генерация «внешнего» супероксида (а) и его содержание в тканях (б) колеоптилей пшеницы (% от контроля без обработки H₂O₂ и нагревания).

Здесь и на рис. 3-7: 1 – 2%-ная сахароза (контроль), без нагревания; 2 – 2%-ная сахароза (контроль), после нагревания при 43 °С, 10 мин; 3 – 2%-ная сахароза + 1 мМ H₂O₂, без нагревания; 4 – 2%-ная сахароза + 1 мМ H₂O₂, после нагревания при 43 °С, 10 мин. Стрелкой указан момент начала 10 мин нагрева.

В дальнейших экспериментах при изучении влияния пероксида водорода на биохимические показатели его использовали в концентрации 1 мМ.

Воздействие пероксида водорода вызвало уменьшение генерации «внешнего» супероксида интактными колеоптилями (рис. 2а, кривые 1, 3). При оценке содержания O₂⁻ в гомогенатах тканей отмечалась лишь тенденция к его снижению под действием H₂O₂ (рис. 2б, кривые 1, 3). Последующий перенос колеоптилей, обработанных 1 мМ пероксидом водорода, на раствор сахарозы без добавок приводил к повышению генерации супероксида до уровня, который наблюдался до воздействия H₂O₂. При этом тенденции, выявленные при анализе «внешнего» O₂⁻ и O₂⁻ гомогенатов тканей существенно не отличались.

Повреждающий нагрев вызывал повышение генерации «внешнего» супероксида колеоптилями всех вариантов (рис. 2а, кривые 2, 4). Однако при этом образование «внешнего» O₂⁻ колеоптилями, обработанными 1 мМ H₂O₂, было ниже значительно, чем соответствующими контрольными. Через 1-3 ч после нагрева содержание O₂⁻ в гомогенатах тканей также повышалось, но различия между вариантами были недостоверными (рис. 2б, кривые 2, 4). Через 24 ч после нагрева полностью нивелировалась разница между всеми вариантами в величинах содержания супероксида в гомогенатах. Однако генерация «внешнего» супероксида колеоптилями, которые подвергались нагреву была ниже, чем соответствующими контрольными, предобработка H₂O₂ на этой фазе опыта не

влияла на показатель выделения O₂⁻ отрезками (см. рис. 2).

Обработка колеоптилей H₂O₂ приводила к увеличению содержания пероксидов в них почти в 3 раза (рис. 3). Оно составило 570 нмоль/г сухого вещества или 45,2 нмоль/г сырого вещества, что на 5-6 порядков меньше концентрации H₂O₂, введенной в среду инкубации колеоптилей. Через 1 ч после прекращения обработки колеоптилей пероксидом водорода и переноса их на раствор сахарозы без добавок содержание эндогенных пероксидов снижалось приблизительно в 1,5 раза. К 26 ч наблюдений отмечалось дальнейшее снижение содержания пероксидов в колеоптилях, обработанных H₂O₂, до уровня контрольного варианта (рис. 3, кривые 1, 3).

Через 1-3 ч после нагрева в контрольных колеоптилях содержание пероксидов практически не изменялось, в то время как в отрезках, обработанных H₂O₂, оно резко снижалось. При этом абсолютные величины в контроле и опыте становились практически одинаковыми (рис. 3, кривые 2, 4). Через 24 ч после воздействия высокой температуры содержание пероксидов в контрольном варианте с нагреванием несколько возрастало и становилось выше, чем в колеоптилях, обработанных перед нагревом пероксидом водорода (рис. 3, сравнить кривые 1, 2 и 4).

На фоне сниженной генерации супероксида и повышенного содержания пероксидов в колеоптилях, обработанных в течение 2 ч H₂O₂, происходило незначительное увеличение интенсивности ПОЛ, регистрируемое по содержанию МДА (рис. 4). Этот эффект был обрати-

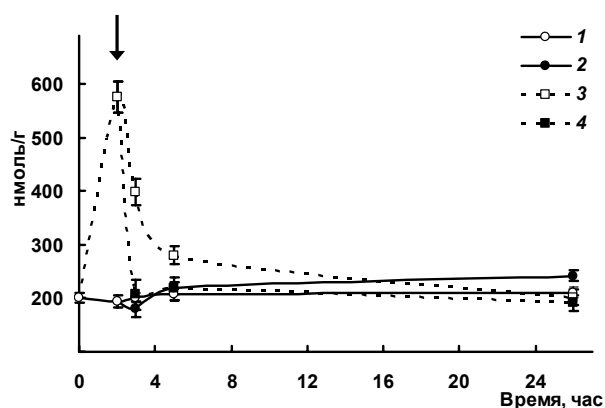


Рис. 3. Содержание пероксидов (нмоль/г сухого вещества) в колеоптилях пшеницы. Обозначения как на рис. 2

мым: после переноса колеоптилей на раствор сахарозы без добавок пероксида водорода содержание МДА в отрезках снижалось и через 24 ч (26 ч от начала наблюдений) было ниже, чем в контроле (сравнить кривые 1, 3 на рис. 4).

Через 1 ч после воздействия температуры 43⁰С содержание МДА повышалось в колеоптилях всех вариантов (рис. 4). В дальнейшем в колеоптилях, не обработанных пероксидом водорода, содержание МДА увеличивалось в течение всего периода наблюдений, а в отрезках, подвергнутых действию H₂O₂, уже через 3 ч после нагрева происходило снижение содержания продукта ПОЛ, невысоким оно было и через 24 ч после повреждающего теплового стресса (рис. 4, сравнить кривые 2, 4).

Обработка колеоптилей 1 мМ раствором пероксида водорода снижала активность растворимой гваяколпероксидазы (рис. 5а). Такое угнетение активности фермента было обратимым: при последующем переносе колеоптилей на раствор сахарозы без добавления пероксида водорода активность постепенно восстанавли-

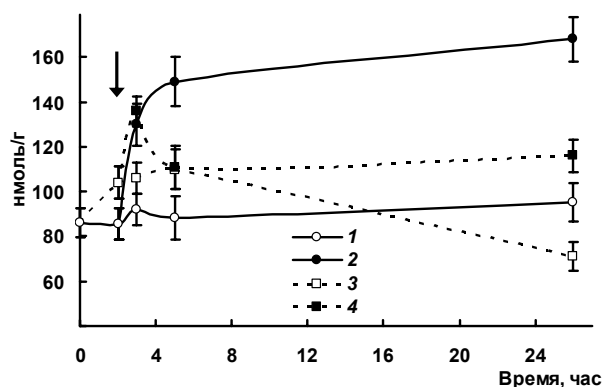


Рис. 4. Содержание МДА (нмоль/г сухого вещества) в колеоптилях пшеницы. Обозначения как на рис. 2

валось почти до уровня контроля (рис. 5а, сравнить кривые 1, 3).

Через 1 ч после нагрева (3 ч от начала наблюдений) происходило увеличение активности растворимой гваяколпероксидазы во всех вариантах опыта. Однако абсолютные величины активности в колеоптилях, обработанных H₂O₂, были значительно ниже, чем в соответствующем контроле (рис. 5а, сравнить кривые 2, 4). В последующие часы после нагрева разница в активности фермента в контрольных колеоптилях и обработанных 1 мМ H₂O₂ нивелировалась.

Активность ионносвязанной гваяколпероксидазы сразу после 2 ч обработки колеоптилей H₂O₂ не изменялась (рис. 5б). Не наблюдалось существенных изменений активности этой формы фермента и при последующем переносе колеоптилей на раствор сахарозы без добавления пероксида водорода, хотя через 26 ч от начала наблюдений она была несколько ниже, чем в контроле.

Нагрев вызывал незначительное повыше-

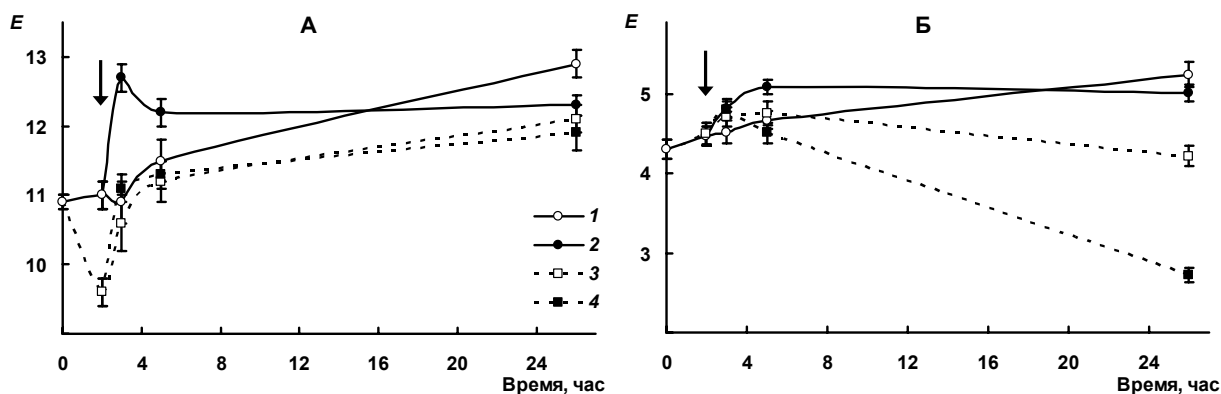


Рис. 5. Активность растворимой (а) и ионносвязанной (б) пероксидазы (*E*, усл. ед/(мин·г сухого вещества)) в колеоптилях пшеницы. Обозначения как на рис. 2.

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС

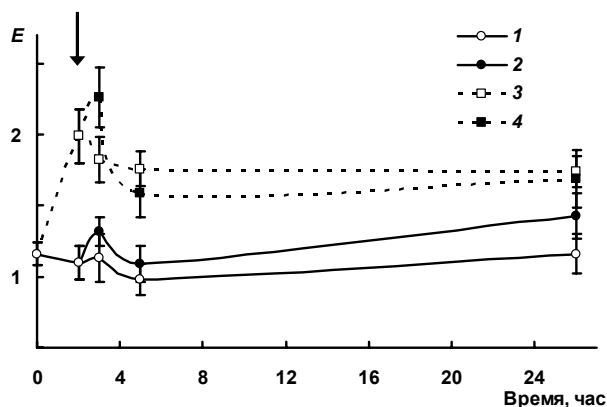


Рис. 6. Активность СОД (E , усл. ед./мин·г сухого вещества) в колеоптилях пшеницы. Обозначения как на рис. 2.

ние активности ионносвязанной гваяколпероксидазы в контрольных колеоптилях и постепенное (к 26 ч наблюдений) ее снижение в отрезках, обработанных пероксидом водорода (рис. 5б, кривые 2, 4).

Воздействие на колеоптили пероксида водорода существенно повышало активность СОД (рис. 6). В процессе последующей инкубации колеоптилей на растворе сахарозы без добавления H_2O_2 происходило снижение активности СОД, хотя активность фермента в варианте колеоптилях, ранее обработанных H_2O_2 , все равно оставалась выше, чем в контроле (рис. 6, сравнить кривые 1, 3).

Через 1 ч после нагрева проявлялась тенденция к незначительному повышению активности СОД во всех вариантах опыта (рис. 6, кривые 2, 4). При этом абсолютные значения активности СОД в варианте с обработкой колеоптилей пероксидом водорода были выше, чем в контроле. Повышенный по сравнению с соответствующим контролем уровень активности фермента сохранялся в этом варианте и через 3 ч после нагрева (5 ч от начала наблюдений). Через 24 ч после нагрева разница между вариантами нивелировалась.

Предобработка колеоптилей пероксидом водорода повышала и активность каталазы в них (рис. 7). Последующий перенос отрезков на раствор сахарозы без добавления H_2O_2 приводил к постепенному снижению активности фермента практически до уровня контроля (рис. 7, сравнить кривые 1, 3).

Через 1 ч после нагрева активность каталазы существенно не изменялась, а через 3 ч после воздействия температуры $43^{\circ}C$ происходило повышение активности фермента в обоих вариантах опыта (рис. 7, кривые 2, 4). При этом

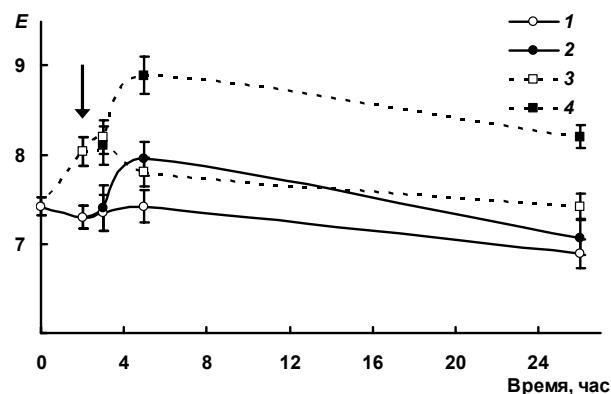


Рис. 7. Активность каталазы (E , мМ H_2O_2 /мин·г сухого вещества) в колеоптилях пшеницы. Обозначения как на рис. 2.

абсолютные значения активности каталазы в вариантах с обработкой H_2O_2 превышали величину соответствующего контроля. К концу наблюдений (через 24 ч после нагрева) активность фермента во всех вариантах несколько снижалась, однако в колеоптилях, обработанных H_2O_2 , была выше, чем в контроле.

ОБСУЖДЕНИЕ

Обсуждая полученные результаты, следует сразу отметить, что, несмотря на то, что обработка колеоптилей экзогенной H_2O_2 и повышала эндогенное содержание пероксидов, оно было приблизительно на 5 порядков ниже концентрации H_2O_2 в инкубационной среде, т.е., по-видимому, находилось в пределах физиологических концентраций. Можно предполагать, что проникновение экзогенного пероксида водорода довольно строго регулируется клетками колеоптилей. Кроме того, вероятно, значительная часть H_2O_2 может разрушаться каталазой и различными формами пероксидаз, локализованными в цитозоле и многих компартментах клетки [21, 30]. Имеются сведения, что обработка изолированных органов растений экзогенным пероксидом водорода в миллимолярных концентрациях фактически эквивалентна действию эндогенных микромолярных концентраций [3].

Наблюдаемое нами повышение содержания пероксидов в колеоптилях под действием экзогенного H_2O_2 было обратимым и при переносе отрезков на среду без добавления H_2O_2 в течение нескольких часов снижалось (см. рис. 3). Еще более существенное снижение содержания пероксидов в колеоптилях, обработанных H_2O_2 , вызывал нагрев. Однозначно объяснить этот эффект сложно. Нельзя исклю-

чить методические причины: нагрев отрезков в водном термостате мог приводить к вымыванию пероксида водорода через мембраны, проницаемость которых, вероятно, увеличивалась в ответ на стрессовое воздействие [8]. В то же время вполне возможно, что в снижение содержания пероксидов внесло вклад повышение активности каталазы и других ферментов, утилизирующих H_2O_2 , например, аскорбатпероксидазы, которая может индуцироваться пероксидом водорода [20]. Примечательно, что в наших опытах заметное повышение активности каталазы в колеоптилях, обработанных H_2O_2 , наблюдалось именно после нагрева, на фоне снижения содержания пероксидов в отрезках (сравнить рис. 3 и 7). При этом в момент окончания наблюдений (через 24 ч после нагрева) содержание пероксидов в контроле несколько возросло и достоверно превышало величины, наблюдаемые в опытных вариантах (см. рис. 3).

В целом, обработка колеоптилей пероксидом водорода вызывала весьма существенные изменения в их про-/антиоксидантном статусе и реакции на последующий повреждающий нагрев.

Обращает на себя внимание снижение образования супероксида колеоптилями после обработки их H_2O_2 (см. рис. 2). Оно четко выявлялось при определении «внешнего» O_2^- , выделяемого интактными колеоптилями и было менее выраженным при анализе гомогенатов тканей. Одной из причин различий в величинах генерации супероксида, полученных для интактных тканей и гомогенатов, может быть локализация значительной части ферментов, генерирующих O_2^- (НАДФН-оксидаза, пероксидаза), в плазмалемме и внеклеточном пространстве [25, 28, 41]. Кроме того, такие отличия могли быть следствием образования под влиянием пероксида водорода дополнительных связей между фенольными группами в клеточных стенках и изменением их проницаемости для супероксида и(или) экзоферментов, которые его продуцируют [11].

В целом же, наблюдаемый нами эффект уменьшения генерации «внешнего» супероксида колеоптилями и его содержания в гомогенатах тканей под действием пероксида водорода может быть связан как с угнетением O_2^- -генерирующих ферментативных систем, так и с активацией СОД. Результаты наших экспериментов позволяют допускать вклад обоих явлений.

Необходимо отметить, что снижение генерации супероксида колеоптилями происходило на фоне уменьшения активности гваяколпероксидазы (см. рис. 2 и 5а). Имеются сведения о возможной причастности разных форм этого фермента к генерации супероксида [38]. Угнетение активности пероксидазы ее же субстратом – пероксидом водорода – может показаться трудно объяснимым феноменом. Однако такое явление зарегистрировано на примере колеоптилей злаков и другими авторами [11]. Правда, в этой работе ингибирующее влияние оказывал 40 мМ пероксид водорода. Эффект угнетения основного изофермента пероксидазы в присутствии пероксида водорода *in situ* и *in vitro* зарегистрирован на примере гипокотилей *Lupinus albus* [23]. Одной из причин угнетения пероксидазной активности под действием пероксида водорода может быть ее переключение на каталазную. Такое явление, в частности, зарегистрировано для нескольких форм апопластных пероксидаз, которые при высоких концентрациях пероксида водорода проявляли каталазную активность [29]. Возможно, что оно имеет защитное значение, направленное на предотвращение образования избытка АФК. Важно, что в наших экспериментах уменьшение активности пероксидазы происходило параллельно со снижением генерации супероксидного радикала, который может быть продуктом пероксидазных реакций. Вполне естественно, что нельзя исключить и модификации активности других ферментов, которые могут быть источниками образования супероксида – НАДФН-оксидазы [28], оксалатоксидазы [18] и пр.

Одновременно обработка колеоптилей H_2O_2 вызывала и повышение активности СОД (см. рис. 6), которая элиминирует супероксид, превращая его в пероксид водорода. Как уже отмечалось, литературные данные о влиянии H_2O_2 на активность СОД весьма противоречивы: зарегистрированы как эффекты угнетения фермента, так и его активации [15, 35]. Несмотря на однозначно показанную инактивацию Cu/Zn-СОД под действием пероксида *in vitro* [14], возможно индуцирование его синтеза *in vivo*. Кроме того, известно, что у злаков присутствует определенный пул устойчивой к H_2O_2 Mn-СОД [20]. Примечательно, что на такой же растительной модели (колеоптиль пшеницы) нами был показан эффект повышения активности СОД под влиянием экзогенной салициловой кислоты [6]. При этом увеличенная активность СОД проявлялась на фоне су-

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС

ществленного повышения содержания в тканях пероксидов. Данный эффект может быть результатом разнонаправленного влияния салициловой кислоты на активность СОД (активирующий эффект) и каталазы (ингибирующий эффект).

В настоящей работе при обработке колеоптилей экзогенным пероксидом водорода повышение активности СОД регистрировалось на фоне умеренного увеличения внутриклеточного содержания пероксидов и сохранялось некоторое время после нагрева и/или переноса колеоптилей на среду без добавления H_2O_2 . Можно полагать, что увеличение внутриклеточного содержания пероксидов, происшедшее под действием экзогенной H_2O_2 , служило сигналом для активации экспрессии генов антиоксидантных ферментов. Не исключено также, что сигнальными посредниками в процессе повышения активности антиоксидантных ферментов могли быть и продукты ПОЛ [7]. Естественно, что для более определенных выводов необходимы прямые исследования экспрессии генов СОД и каталазы.

В целом, выявленные нами эффекты снижения генерации супероксида колеоптилями, повышения активности СОД и каталазы на фоне угнетения гваяколпероксидазы, происходящие под влиянием экзогенного пероксида водорода, по-видимому, следует рассматривать как защитную реакцию, направленную на предотвращение развития неуправляемого окислительного стресса.

Можно полагать, что кратковременный окислительный стресс и происходящая практически одновременно с ним активация антиоксидантных систем делала растительные клетки «компетентными» к последующему более сильному стрессовому воздействию – повреждающему нагреву. Это воздействие высокой температуры приводило к развитию глубокого окислительного стресса в контрольных колеоптилях, что выражалось в монотонном увеличении в них содержания продукта ПОЛ (МДА) после нагрева (см. рис. 4). В таких же условиях в колеоптилях, предобработанных H_2O_2 , в период после нагрева отмечалась более низкая активность растворимой и особенно ионносвязанной гваяколпероксидазы, которая может быть причастна к генерации АФК. В то же время в этих отрезках проявлялась повышенная активность АФК-элиминирующих ферментов – СОД и каталазы (см. рис. 6, 7), а

содержание МДА было ниже, чем в контроле (см. рис. 4).

Таким образом, в настоящей работе нам удалось показать возможность индуцирования теплоустойчивости растительных тканей с помощью экзогенного пероксида водорода, что сопровождалось кратковременными проявлениями окислительного стресса и последующей активацией ферментативной антиоксидантной системы. Следует заметить, что регистрируемые нами изменения в функционировании про-/антиоксидантной системы, происходящие под влиянием пероксида водорода, были обратимыми и практически не проявлялись уже через несколько часов после переноса колеоптилей на среду без пероксида водорода. При этом, однако, в случае последующего теплового стресса в колеоптилях, предварительно обработанных H_2O_2 , происходило существенное повышение активности антиоксидантных ферментов. В связи с этим следует упомянуть работу Lopez-Delgado et al. [24], в которой показано, что у микрорастений картофеля, выращенных из эксплантов, предобработанных пероксидом водорода, повышенная теплоустойчивость сохранялась даже через месяц после обработки экзогенным агентом окислительного стресса. Выяснение возможности сохранения индуцированной агентами окислительного стресса способности растений к «компетентному» ответу на стрессор и биохимических механизмов такого явления может иметь большое значение не только для познания феномена формирования адаптивных реакций, но и для практики защиты растений от неблагоприятных факторов среды. Вполне естественно предполагать, что индуцирование пероксидом водорода активности ключевых антиоксидантных ферментов важная, но не единственная реакция, благодаря которой формируется устойчивость к стрессорам. Нами на примере колеоптилей пшеницы показана способность экзогенного H_2O_2 вызывать увеличение содержания в них пролина [5], который является антиоксидантом и полифункциональным низкомолекулярным протектором. Известно, что пероксид водорода может вызывать не только усиление экспрессии генов PR-белков [19], но и активацию синтеза белков теплового и холодного шока [16, 27]. При этом, однако, остается открытым вопрос о том, насколько специфично в таких реакциях действие H_2O_2 как компонента сложной сигнальной сети.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Барабой В.А., Жадько С.И., Кордюм Е.Л., Сидоренко П.Г.* Перекисное окисление липидов растений различного уровня организации при микрогравитационном стрессе // Изв. АН СССР. Сер. биол. - 1991. - № 3. - С. 368-375.
2. *Гольдштейн Н.* Активные формы кислорода как жизненно необходимые компоненты воздушной среды // Биохимия. - 2002. - Т. 67, вып. 2. - 194-204.
3. *Дубовская Л.В., Колеснева Е.В., Князев Д.М., Вологовский И.Д.* Защитная роль оксида азота при окислительном стрессе, индуцированном в растениях табака пероксидом водорода // Физиология растений. - 2007. - Т. 54, № 6. - С. 847-855.
4. *Колупаев Ю.Е., Акинина Г.Е., Мокроусов А.В.* Индукция теплоустойчивости колеоптилей пшеницы ионами кальция и ее связь с окислительным стрессом // Физиология растений. - 2005. - Т. 52, № 2. - С. 227-232.
5. *Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В., Акинина Г.Е.* Влияние салициловой кислоты и перекиси водорода на содержание пролина в колеоптилях пшеницы при тепловом и солевом стрессах // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. - 2005. - Вип. 1(6). С. 51-56.
6. *Колупаев Ю.С.* Можлива роль супероксиддисмутазы у саліцилатіндукованому нагромадженні пероксидів у колеоптилях *Triticum aestivum* L. // Укр. ботан. журн. - 2007. - Т. 64, № 2. - С. 270-278.
7. *Курганова Л.Н., Веселов А.П., Синицына Ю.В., Еликова Е.А.* Продукты перекисного окисления липидов как возможные посредники между воздействием повышенной температуры и развитием стресс-реакции у растений // Физиология растений. - 1999. - Т. 46, № 2. - С. 218-222.
8. *Мелехов Е.И., Рамазанова Л.Х., Васильева А.В. и др.* Методы количественной оценки повреждений и их модификации // Изв. АН СССР. Сер. биол. - 1983. - №3. - С.785-788.
9. *Мерзляк М.Н. Погосян С.И., Юферова С.Г., Шевырева В.А.* Использование 2-тиобарбитуровой кислоты при исследовании перекисления липидов в тканях растений // Биол. науки. - 1978. - № 9. - С. 86-94.
10. *Чевари С. Чаба И. Секей Й.* Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах // Лаб. дело. - 1985. - № 11. - С. 678-681.
11. *Шарова Е.Н.* Роль пероксида водорода в регуляции растяжимости первичных клеточных стенок // 4-й Съезд О-ва физиологов раст. России. Междунар. конф. «Физиология растений – наука 3-го тысячелетия», Москва, 4-9 октября, 1999: Тез. докл. – М., 1999. - Т. 2. - С. 738-739.
12. *Шарова Е.И.* Клеточная стенка растений. - СПб.: Изд-во С.-Петербург. ун-та, 2004. 156 с.
13. *Шоринг Б.Ю., Смирнова Е.Г., Ягужинский Л.С., Ванюшин Б.Ф.* Необходимость образования супероксида для развития этиолированных проростков пшеницы // Биохимия. - 2000. - Т. 65, № 12. - С. 1612-1618.
14. *Alscher R.G., Erturk N., Heath L.S.* Role of superoxide dismutases (sods) in controlling oxidative stress in plants // J. Exp. Bot. - 2002. - V. 53. - P. 1331-1341.
15. *Bakalova S., Nedeva D., Nikolova A.* Isoenzyme profiles of peroxidase, catalase and superoxide dismutase as affected by dehydration stress and ABA // Bulg. J. Plant Physiol. 2003. - Spec Issue. - P. 386.
16. *Banzet N., Richaud C., Deveaux Y. et al.* Accumulation of small heat shock proteins, including mitochondrial HSP22, induced by oxidative stress and adaptive response in tomato cell // Plant J. - 1998. - V. 13. - P. 519-527.
17. *Bhattacharjee S.* Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress, senescence and signal transduction in plants // Current Sci. - 2005. - V. 89. - P. 1113-1121.
18. *Bolwell G.P.* Role of active oxygen species and NO in plant defense response // Curr. Opin. Plant Biol. - 1999. - V. 2. - P. 287-294.
19. *Chamngpol S., Willekens H., Moeder W et al.* Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H₂O₂ in transgenic plants // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1998. - V. 95. - P. 5818-5823.
20. *Dat J., Vandenaabeele S., Vranova E., Montagu M.V., Inze D., Breusegem F.V.* Dual action of the active oxygen species during plant stress responses // Cell. Mol. Life Sci. - 2000. - V. 57. - P. 779-795.
21. *Halliwell B.* Reactive species and antioxidants. redox biology is a fundamental theme of aerobic life // Plant Physiol. 2006. - V. 141. - P. 312-322.
22. *Heiser I., Elstner E.F.* Biochemical mechanisms of plant defense a central role for reactive oxygen species // Plant Prot. Sci. - 2002. - V. 38. - Spec. Issue 1. - P. 76-86.
23. *Hernandez-Ruiz J., Rodriguez-Lopez J.N., Garcia-Canovas F. et al.* Characterization of isoperoxidase-B2 inactivation in etiolated *Lupinus albus* hypocotyls // Biochem. et Biophys. Acta Protein Struct. and Mol. Enzymol. - 2000. - V. 1478, N 1. - P. 78-88.

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС

24. Lopez-Delgado H., Dat J.F., Foyer C.H., Scott I.M. Induction of thermotolerance in potato microplants by acetylsalicylic acid and H₂O₂ // J. Exp. Bot. - 1998. - V. 49. - P. 713-720.
25. Luthje S., Bottger M., Doring O. Are plants stacked Neutrophils? Comparison of pathogen-induced oxidative burst in plants and mammals // Progr. Bot. - 2000. - V. 61. - P. 187-222.
26. Mahalingam R., Fedoroff N. Stress Response, Cell death and signaling: the many faces of reactive oxygen species // Physiol. Plant. - 2003. - V. 119. - P. 56-68.
27. Matsuda Y., Okuda T., Sagisaka S. Regulation of protein synthesis by hydrogen peroxide in groans of winter wheat // Biosci. Biotech. Biochem. - 1994. - V. 58. - P. 906-909.
28. McDowell J.M., Dangl J.L. Signal transduction in the plant immunity response // Trends Biochem. Sci. - 2000. - V. 25. - P. 79-82.
29. Mika A., Minibaeva F., Beckett R., Luthjie S. Induced generation and detoxification of active oxygen species // Phytochem. Rev. - 2004. - V. 3, N 1-2. - P. 173-193.
30. Mittler R. Oxidative Stress, Antioxidants and stress tolerance // Trends Plant Sci. - 2002. - V. 7. - P. 405-410.
31. Neill S.T., Desikan R., Clarke A. Hurst R.D., Hancock J.T. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants // J. Exp. Bot. - 2002. - V. 53. - P. 1237-1247.
32. Prasad T.K., Anderson M.D., Martin B., Stewart C.R. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and regulatory role for hydrogen peroxide // Plant Cell. - 1994. - V. 6. - P. 65-74.
33. Ridge I., Osborne D. J. Hydroxyproline and peroxidases in cell wall of *Pisum sativum*: regulation by ethylene // J. Exp. Bot. - 1970. - V. 45. - P. 843 - 856.
34. Sagisaka S. The occurrence of peroxide in a perennial plant, populus gelrica // Plant Physiol. - 1976. - V. 57. - P. 308-309.
35. Sairam R.K., Srivastava G.C. Induction of oxidative stress and antioxidant activity by hydrogen peroxide treatment in tolerant and susceptible wheat genotypes // Biol. Plant. - 2000. - V. 43. - P. 381-386.
36. Scandalios J.G. Oxidative Stress: Molecular Perception and Transduction of Signals Triggering Antioxidant Gene Defenses // Braz. J. Med. and Biol. Res. - 2005. - V. 38. - P. 995-1014.
37. Shah K., Kumar R.G., Verma S., Dubely R.S. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings // Plant Sci. - 2001. - V. 161. - P. 1135-1144.
38. Shannon L.M. Plant isoenzymes // Annu. Rev. Plant Physiol. - 1986. - V. 5. - P. 187-204.
39. Suzuki N, Mittler R. Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction // Physiol. Plant. - 2006. - V. 126. - P. 45-51.
40. Xu Y.-C., Wang J., Shan L. The influence of hardening to stress by H₂O₂ on the drought resistance of wheat plantlets // Acta Bot. Boreali-Occident. Sin. - 2000. - V. 20, N 3. - P. 382-386.
41. Yoshioka H., Sugie K., Park H.J et al. Induction of plant gp91 phosphatase homolog by fungal cell wall, arachidonic acid, and salicylic acid in potato // Mol. Plant-Microb. Interact. - 2001. - V. 14. - P. 725-236.

Поступила в редакцию
08.05.2008 г.

OXIDATIVE STRESS AND THE STATE OF ANTIOXIDATIVE SYSTEM IN WHEAT COLEOPTILES AT THE ACTION OF HYDROGEN PEROXIDE AND HEATING

Yu. Ye. Kolupaev¹, Yu. V. Karpets^{1,2}

¹V.V. Dokuchaev Kharkiv National Agrarian University
(Kharkiv, Ukraine)

²G.M. Vysotskiy Ukrainian Research Institute of Forestry and Forest Melioration
(Kharkiv, Ukraine)

The influence of treatment of pieces of wheat (*Triticum aestivum* L.) coleoptiles with hydrogen peroxide on their heat resistance and parameters of prooxidative-antioxidative balance have been studied. Two-hour treatment with 1 mM H₂O₂ caused decrease of guaiacol peroxidase activity and reduction of O₂⁻ generation by the coleoptiles. Thus activity of the superoxide dismutases (SOD) and catalases increased. At the same time the influence of exogenous H₂O₂ increased the content of per-

oxides and product of lipid peroxidation - malonic dialdehyde (MDA) in tissues. The subsequent damaging heating (43°C, 10 min) caused increase of the guaiacol peroxidase activity, O_2^- generation and MDA content both in control and in experimental pieces. However in the coleoptiles treated before heating with hydrogen peroxide, similar changes were shown to a lesser degree. Heating caused slight increase of SOD activity in coleoptiles of all variants. Thus in the pieces treated with hydrogen peroxide, the SOD and catalase activity was higher, than in the control. Pretreatment with hydrogen peroxide raised heat resistance of wheat coleoptiles that is connected with an induction by it of adaptive reactions among which, apparently, the significant role of the enzymatic system of anti-oxidative defence.

Key words: *Triticum aestivum L., oxidative stress, hydrogen peroxide, superoxide radical, lipid peroxidation, guaiacol peroxidase, superoxide dismutase, catalase, heat resistance*

ОКИСНЮВАЛЬНИЙ СТРЕС І СТАН АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ У КОЛЕОПТИЛЯХ ПШЕНИЦІ ЗА ДІЇ ПЕРОКСИДУ ВОДНЮ ТА НАГРІВАННЯ

Ю. Є. Колупасв¹, Ю. В. Карпець^{1,2}

¹*Харківський національний аграрний університет ім. В.В.Докучаєва
(Харків, Україна)*

²*Український науково-дослідний інститут лісового господарства
і агролісомеліорації ім. Г.М.Висоцького
(Харків, Україна)*

Досліджували вплив обробки відрізків колеоптилів пшениці (*Triticum aestivum L.*) на їх теплостійкість та показники прооксидантно-антиоксидантної рівноваги. Двогодинна обробка 1 мМ H_2O_2 спричинювала зниження активності гваяколпероксидази та зменшення генерації колеоптилями O_2^- . При цьому активність супероксиддисмутази (СОД) і каталази зростала. Вплив екзогенного H_2O_2 незначною мірою збільшував вміст у тканинах пероксидів та продукту пероксидного окиснення ліпідів – малонового діальдегіду (МДА). Наступне ушкоджуюче нагрівання (43°C, 10 хв) викликало підвищення активності гваяколпероксидази, генерації O_2^- і вмісту МДА як у контрольних, так і в дослідних відрізках. Однак у колеоптилях, оброблених перед нагріванням пероксидом водню, подібні зміни виявлялися меншою мірою. Нагрівання викликало незначне підвищення активності СОД в колеоптилях усіх варіантів. При цьому у відрізках, оброблених пероксидом водню, активність СОД і каталази була вищою, ніж у контролі. Передобробка пероксидом водню підвищувала теплостійкість колеоптилів пшениці, що пов'язане з індукуванням ним адаптивних реакцій, серед яких, ймовірно, значну роль відіграє ферментативна система антиоксидантного захисту.

Ключові слова: *Triticum aestivum L., окиснювальний стрес, пероксид водню, супероксидний радикал, пероксидне окиснення ліпідів, гваяколпероксидаза, супероксиддисмутаза, каталаза, теплостійкість*