

УДК 581.1

## РОЛЬ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ И АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ИНДУЦИРОВАНИИ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ И ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТИ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК ДОНОРОМ ОКСИДА АЗОТА

© 2017 г. Ю. В. Карпец

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

С использованием ингибиторного метода исследовали участие ионов кальция и активных форм кислорода (АФК) в индуцировании донором оксида азота нитропруссидом натрия (НПН) ферментативной антиоксидантной системы колеоптилей пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и их устойчивости к повреждающему прогреву. Обработка колеоптилей НПН в концентрациях 0,1 и 0,2 мМ в наибольшей степени индуцировала их устойчивость к гипертермии. Под влиянием НПН происходило повышение активности супероксиддисмутазы, каталазы, гваяколпероксидазы и аскорбатпероксидазы в колеоптилях. Антиоксидант бутилгидрокситолуол, ингибитор НАДФН-оксидазы имидазол, хелатор внешнего кальция ЭГТА, ингибитор фосфолипазы С неомидин и ингибитор АДФ-рибозилциклазы никотинамид частично устраняли влияние НПН на активность антиоксидантных ферментов. Также эти соединения нивелировали эффект повышения теплоустойчивости колеоптилей пшеницы, вызываемый НПН. Сделано заключение об опосредованном кальцием и АФК влиянии экзогенного оксида азота на антиоксидантную систему и теплоустойчивость колеоптилей пшеницы.

**Ключевые слова:** *Triticum aestivum*, оксид азота, антиоксидантные ферменты, активные формы кислорода, кальций, НАДФН-оксидаза, теплоустойчивость

Оксид азота (NO) принимает участие в формировании адаптивных реакций растений на действие многих неблагоприятных факторов, в том числе абиотических стрессоров (Corpas et al., 2011; Mur et al., 2012; Vajguz 2014; Oz et al., 2015). В ряде исследований, выполненных на клеточных культурах и других модельных объектах, а также на интактных растениях, показана возможность индуцирования их устойчивости к стресс-факторам действием экзогенных доноров NO (Song et al., 2006; Vital et al., 2008; Zhang et al., 2009; Карпец и др., 2011).

Одной из универсальных протекторных систем растений является антиоксидантная система (Gill, Tuteja, 2010). Во многих работах показана связь между состоянием антиоксидантной системы и устойчивостью растений различных таксономических групп к стрессо-

рам различной природы (Gaber et al., 2006; Колупаев, 2016; Named et al., 2017).

Оксид азота оказывает на антиоксидантную систему сложное влияние, механизмы которого исследованы далеко не полностью (Vital et al., 2008; Lin et al., 2011; Khan et al., 2015). Так, известно, что NO обладает способностью модифицировать многие антиоксидантные ферменты как *in vivo*, так и *in vitro*. Среди них аскорбатпероксидаза (АПО), гваяколпероксидаза (ГПО), различные формы супероксиддисмутазы (СОД), каталаза, глутатион-S-трансфераза, глутатионредуктаза (Chaki et al., 2009; Fares et al., 2011; Lozano-Juste et al., 2011; Begara-Morales et al., 2013; Карпец, Колупаев, 2017). При этом тип посттрансляционной модификации белков действием оксида азота может по-разному влиять на их функциональную активность. Например, в экспериментах *in vitro* показано, что нитрование пероксинитритом цитозольной АПО по некоторым остаткам тирозина вызывает ее ингибирование, в то время как S-нитрозилирование под действием GSNO повышает активность фермента (Begara-

Morales et al., 2013). Предполагается, что обратимое нитрозилирование может быть одним из механизмов регуляции активности Cu/Zn-СОД (Marozkina et al., 2012). В целом, по-видимому, прямое влияние NO на функционирование белков зависит от его локального содержания в клетках, концентрации в клеточной среде АФК и антиоксидантов, а также других факторов.

В экспериментах *in vivo* зарегистрировано как повышение, так и снижение активности антиоксидантных ферментов в растениях различных видов под влиянием доноров оксида азота (Vital et al., 2008; Lin et al., 2011). Показано усиление экспрессии генов и повышение активности СОД, цитозольной АПО, каталазы и глутиноредуктазы в листьях кукурузы под влиянием донора NO нитропруссид натрия (НПН) (Zhang et al., 2007).

Ранее нами было показано, что активирующее влияние НПН на каталазу и ГПО колеоптилей пшеницы проявлялось в достаточно узком концентрационном диапазоне и сменялось ингибирующим при его превышении (Карпец, Колупаев, 2017). Также выявлено, что вызываемому действием НПН индуцированию теплоустойчивости колеоптилей пшеницы и повышению в них активности антиоксидантных ферментов предшествовало усиление генерации супероксидного анион-радикала, которое подавлялось ингибитором НАДФН-оксидазы имидазолом (Карпец и др., 2011). Кроме того, эффект усиления генерации АФК, вызываемый донором оксида азота, в значительной степени угнетался различными антагонистами кальция: хелатором внеклеточного кальция ЭГТА, ингибитором фосфолипазы С неомицином, ингибитором АДФ-рибозилциклазы никотинамидом (Карпец и др., 2015). Можно полагать, что активация НАДФН-оксидазы под влиянием NO связана с его способностью оказывать влияние на состояние кальциевых каналов разных типов и повышать содержание внутриклеточного кальция (Jeandroz et al., 2013; Карпец и др., 2015; Khan et al., 2015).

Однако не ясно, участвуют ли различные пулы кальция в NO-индуцированной активации антиоксидантных ферментов. В связи с этим целью работы было исследование с использованием ингибиторного анализа возможной роли кальция и АФК в NO-зависимой регуляции активности антиоксидантных ферментов колеоптилей пшеницы и их устойчивости к повреждающему прогреву.

## МЕТОДИКА

Объектом исследования были отрезки колеоптилей, отделенные от этиолированных проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Досконала.

Семена обеззараживали 6% раствором  $H_2O_2$  в течение 20 мин, тщательно промывали стерильной дистиллированной водой и проращивали в темноте на воде в течение 4 суток при температуре 20°C. После этого от проростков отделяли базальные части колеоптилей и помещали их на простерилизованный 2% раствор сахарозы с добавлением пенициллина (Na-соль, 100000 ед./л) (контроль).

В качестве донора оксида азота использовали нитропруссид натрия (НПН) в концентрации 0,05, 0,1, 0,2, 0,5 и 2 мМ. На растворах НПН колеоптили инкубировали в течение 24 ч. Один из вариантов опыта включал обработку колеоптилей неактивным структурным аналогом НПН ферроцианидом калия (ФЦК) (Tewari et al., 2008) в концентрации 0,2 мМ. В случае предобработки антиоксидантом бутилгидрокситолуолом (5 мкМ) (Шорнинг и др., 2000), ингибитором НАДФН-оксидазы имидазолом (1 мкМ) (Hung et al., 2006), хелатором внешнего кальция ЭГТА (50 мкМ) (Lin et al., 2011), ингибитором фосфатидилинозитолспецифичной фосфолипазы С неомицином (40 мкМ) (Liu et al., 2006) или антагонистом синтеза цАДФ-рибозы (ингибитор АДФ-рибозилциклазы) никотинамидом (1 мМ) (Leckie et al., 1998) эти соединения вносили в среду инкубации колеоптилей за 2 ч до добавления в нее НПН. Концентрации указанных соединений, не оказывающие заметного токсического влияния на колеоптили пшеницы, были выбраны на основании результатов предварительных опытов.

Активность антиоксидантных ферментов определяли через 24 ч после окончания инкубации колеоптилей на растворе НПН. Как было показано, ранее, именно через такой промежуток времени воздействия НПН отмечалось максимальное повышение активности антиоксидантных ферментов колеоптилях (Карпец, Колупаев, 2017). В вариантах с обработкой колеоптилей антагонистами кальция или ингибиторами образования АФК время инкубации колеоптилей на соответствующих растворах составляло 26 ч.

Для определения активности цитозольных СОД (КФ 1.15.1.1), каталазы (КФ 1.11.16), аскорбатпероксидазы (КФ 1.11.1.11) и гваяколпероксидазы (КФ 1.11.1.7) колеоптили гомогени-

## РОЛЬ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ И АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА

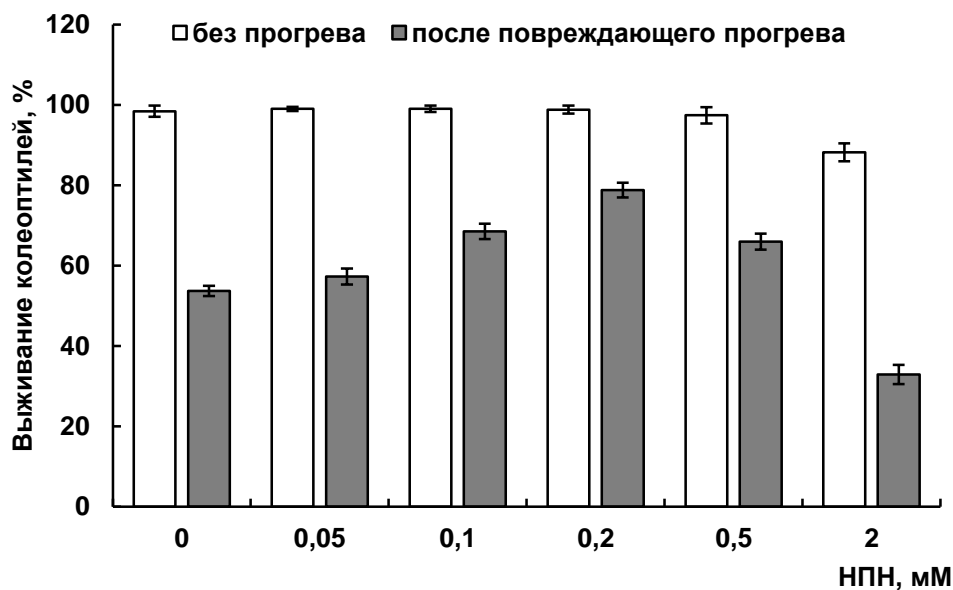


Рис. 1. Концентрационная зависимость влияния НПН на выживание coleоптилей пшеницы (%).

низировали при температуре 2-4°C в 0,06 М К,Na-фосфатном буфере (рН 7,2) с добавлением ЭДТА (0,1 мМ) и дитиотреитола (1 мМ). Гомогенат центрифугировали при 8000 g в течение 10 мин при 4°C. Супернатант использовали для определения активности ферментов (Карпец и др., 2014).

Активность цитозольной СОД, представляющей собой Cu/Zn-СОД (Alscher et al., 2002), определяли, используя метод, основанный на способности фермента конкурировать с нитросиним тетразолием за супероксидные анионы, образующиеся вследствие аэробного взаимодействия НАДН и феназинметосульфата. Оптическую плотность определяли при 540 нм.

Активность каталазы определяли при рН реакционной смеси 7,2 по количеству разложившегося пероксида водорода за единицу времени.

Активность аскорбатпероксидазы оценивали по уменьшению оптической плотности при 290 нм в результате окисления аскорбиновой кислоты ( $E = 2,8 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ) в присутствии  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Реакционная среда содержала 0,06 М К,Na-фосфатный буфер (рН 7,2), 0,25 мМ аскорбиновую кислоту, 0,1 мМ ЭДТА, 1,5 мМ пероксид водорода и ферментный экстракт.

При определении активности гваяколпероксидазы в качестве субстрата использовали пероксид водорода, в качестве восстановителя – гваякол, рН реакционной смеси поддерживали на уровне 6,2 с помощью 0,06 М К,Na-фосфатного буфера.

Содержание белка в пробах определяли по Bradford (1976).

После окончания инкубации coleоптилей на растворах исследуемых соединений часть отрезков каждого варианта подвергали потенциально летальному прогреву в водном ультратермостате в стерильной дистиллированной воде при температуре  $43 \pm 0,1^\circ\text{C}$  в течение 10 мин. Затем отрезки coleоптилей всех вариантов помещали в чашки Петри с простерилизованным 2% раствором сахарозы с добавлением пенициллина (по 30 coleоптилей на одну чашку). Через 3 суток после прогрева оценивали повреждения coleоптилей по признакам инфильтрации ткани и потери тургора, а также определяли состояние coleоптилей, которые не подвергались прогреву.

Эксперименты проводили в 3-4-кратной биологической повторности и воспроизводили независимо не менее трех раз. На рисунках представлены средние значения и их стандартные ошибки. Достоверность различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента. Кроме специально оговоренных случаев обсуждаются различия, достоверные при  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предобработка coleоптилей пшеницы растворами НПН в концентрациях 0,05-0,5 мМ не влияла на их жизнеспособность в физиологически нормальных условиях (рис. 1). В то же время под влиянием 2 мМ НПН отмечалась гибель относительно небольшого количества coleоптилей.

Под влиянием 0,1 и 0,2 мМ донора NO происходило существенное повышение выживания колеоптилей, подвергнутых потенциально летальному прогреву (рис. 1). При обработке 0,05 и 0,5 мМ НПН его положительное влияние на теплоустойчивость колеоптилей почти не проявлялось, а 2 мМ концентрация вызывала значительное снижение выживания колеоптилей после теплового стресса.

Таким образом, максимальный эффект наблюдался при действии НПН в концентрации 0,2 мМ, что несколько ниже, чем в экспериментах, проведенных ранее с сортом пшеницы Элегия (Карпец и др., 2011). По-видимому, эффективные концентрации донора NO зависят от сортовых особенностей растений.

Обработка колеоптилей НПН в концентрации 0,2 мМ вызывала двукратное увеличение активности СОД (рис. 2, А). При этом неактивный аналог донора оксида азота (ФЦК) вызывал лишь небольшое повышение активности фермента.

Антиоксидант бутилгидрокситолуол и ингибитор НАДФН-оксидазы имидазол сами по себе не влияли на активность СОД в колеоптилях пшеницы. Однако обработка колеоптилей этими соединениями снимала проявление повышения активности фермента, вызываемое действием НПН (рис. 2, А). Используемые в качестве антагонистов кальция ЭГТА, неомидин и никотинамид сами по себе не оказывали существенного влияния на активность СОД. В то же время под их влиянием заметно нивелировался вызываемый донором NO эффект увеличения активности СОД в колеоптилях пшеницы.

Обработка колеоптилей ФЦК, в отличие от действия НПН, не вызывала повышения активности каталазы в колеоптилях пшеницы (рис. 2, Б). При обработке отрезков бутилгидрокситолуолом и имидазолом активность фермента существенно не изменялась. В то же время антиоксидант и ингибитор НАДФН-оксидазы полностью снимали эффект увеличения активности каталазы в колеоптилях пшеницы, вызываемый донором NO. В колеоптилях, обработанных антагонистами кальция (ЭГТА, неомидином и никотинамидом), активность фермента не отличалась от значений контроля. Однако эти соединения нивелировали повышение активности каталазы, вызываемое донором оксида азота (рис. 2, Б).

Под действием НПН происходило небольшое повышение активности АПО в колеоптилях пшеницы, в варианте с ФЦК достовер-

ных изменений этого показателя не наблюдали (рис. 2, В). Обработка колеоптилей бутилгидрокситолуолом, имидазолом и антагонистами кальция существенно не влияла на активность фермента. В вариантах с действием НПН в сочетании с бутилгидрокситолуолом, имидазолом, ЭГТА, неомидином и никотинамидом активность АПО в колеоптилях была несколько ниже, чем в варианте с одним НПН. Однако достоверных различий между этими вариантами выявить не удалось из-за небольшого влияния самого НПН на активность фермента.

Обработка колеоптилей НПН вызывала повышение в них активности ГПО, а ФЦК такого влияния практически не проявлял (рис. 2, Г). Антиоксидант бутилгидрокситолуол и ингибитор НАДФН-оксидазы имидазол не оказывали существенного влияния на активность ГПО, в то же время предобработка колеоптилей этими соединениями нивелировала эффект увеличения в них активности фермента, вызываемый НПН. Хелатор внешнего кальция ЭГТА сам по себе не изменял активность ГПО в колеоптилях пшеницы и практически не влиял на проявление эффекта НПН на активность этого фермента (рис. 2, Г). Другие антагонисты кальция – неомидин и никотинамид – сами по себе также не влияли на активность ГПО, однако нивелировали повышение активности фермента, вызываемое действием НПН.

Обработка колеоптилей пшеницы неактивным аналогом НПН ФЦК практически не влияла на их выживание после повреждающего прогрева (рис. 3). Антиоксидант бутилгидрокситолуол вызывал повышение теплоустойчивости колеоптилей, однако его эффект был существенно слабее по сравнению с действием НПН. При комбинированной обработке с НПН антиоксидант в значительной степени нивелировал положительное влияние донора NO на выживание колеоптилей после повреждающего прогрева. Ингибитор НАДФН-оксидазы имидазол заметно не влиял на теплоустойчивость колеоптилей, но при комбинированной обработке с НПН заметно уменьшал его позитивный эффект (рис. 3).

Хелатор внешнего кальция ЭГТА, ингибитор фосфолипазы С неомидин и ингибитор АДФ-рибозилциклазы никотинамид сами по себе существенно не влияли на теплоустойчивость колеоптилей пшеницы. При этом неомидин полностью, а ЭГТА и никотинамид частично нивелировали положительное влияние донора оксида азота на теплоустойчивость колеоптилей пшеницы (рис. 3).

**РОЛЬ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ И АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА**

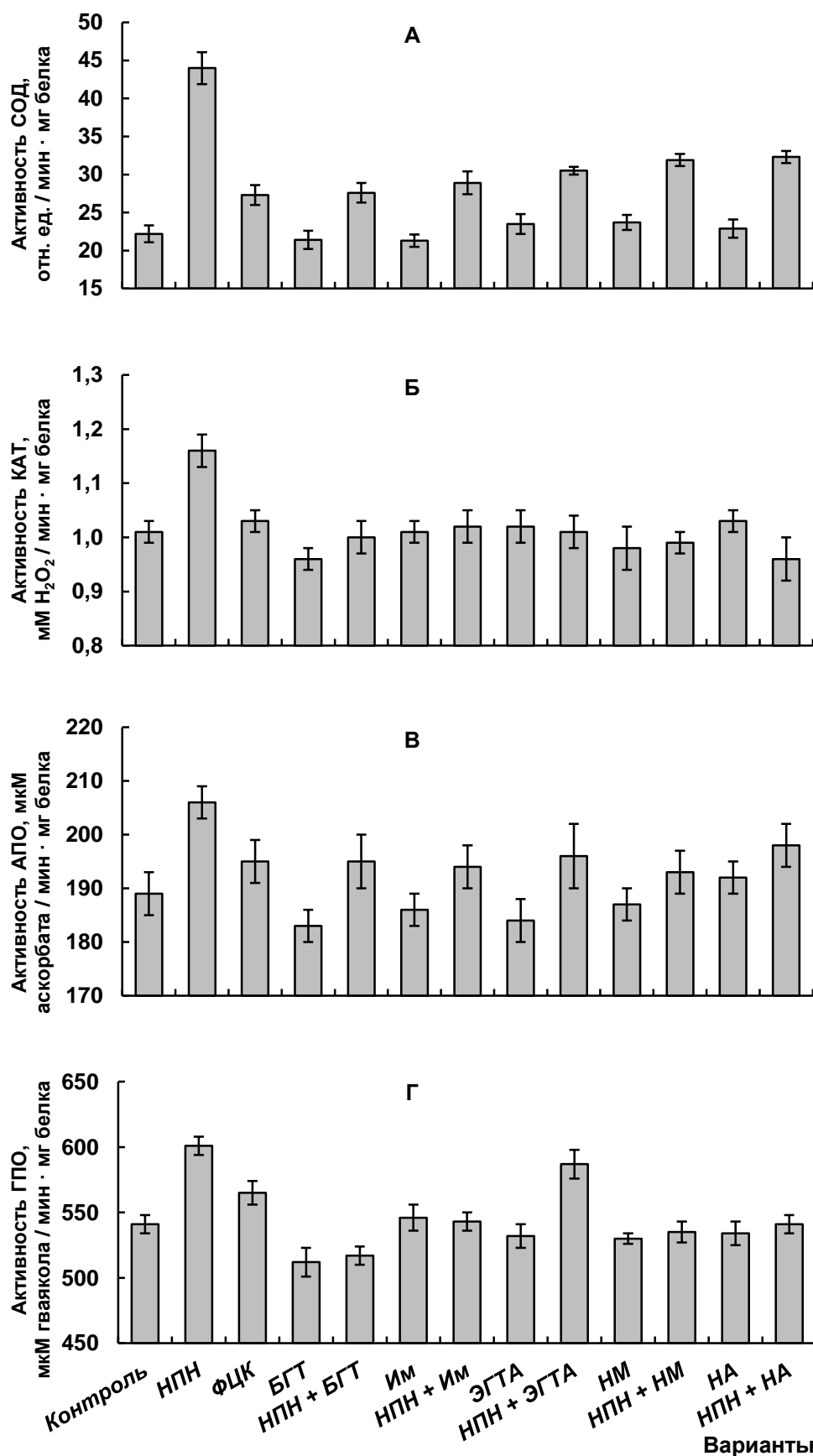
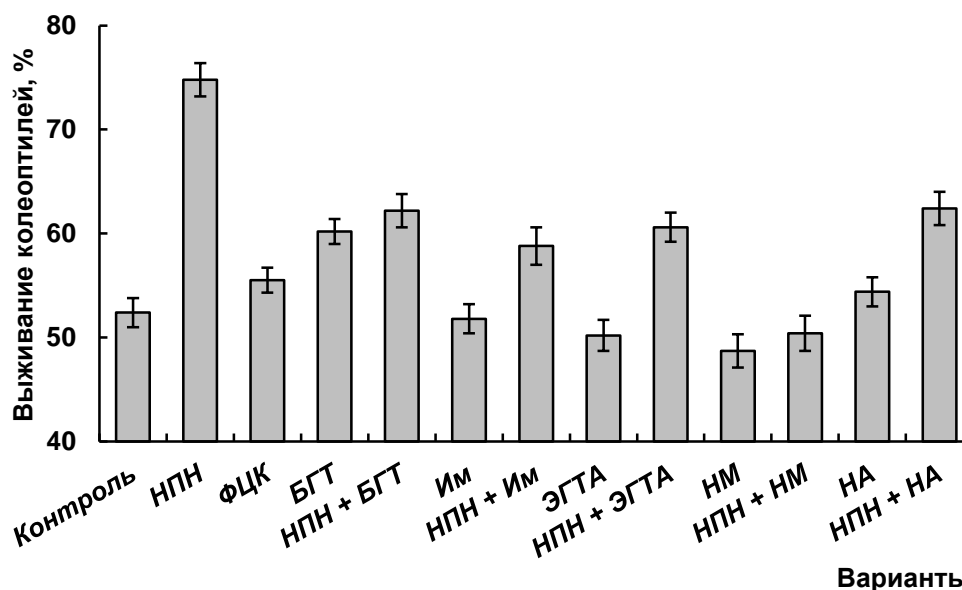


Рис. 2. Активность СОД (А), каталазы (КАТ, Б), АПО (В) и ГПО (Г) в coleoptiliaх пшеницы при действии НПН (0,2 мМ), ФЦК (0,2 мМ), бутилгидрокситолуола (БГТ, 5 мкМ), имидазола (Им, 1 мкМ), ЭГТА (50 мкМ), неомидина (НМ, 40 мкМ) и никотинамида (НА, 1 мМ).



**Рис. 3.** Выживание coleоптилей пшеницы после повреждающего прогресса (43°C, 10 мин) при предварительном действии НПН (0,2 мМ), ФЦК (0,2 мМ), бутилгидрокситолуола (БГТ, 5 мкМ), имидазола (Им, 1 мкМ), ЭГТА (50 мкМ), неомицина (НМ, 40 мкМ) и никотинамида (НА, 1 мМ).

Физиологические эффекты экзогенного оксида азота в наших экспериментах, вероятно, во многом связаны с его влиянием на про-/антиоксидантное равновесие в растительных клетках. Как показано ранее (Карпец и др., 2011; 2015) оно проявлялось в усилении под влиянием НПН генерации супероксидного анион-радикала coleоптилями пшеницы. Данный эффект подавлялся ингибиторами НАДФН-оксидазы имидазолом и  $\alpha$ -нафтолом, но не ингибитором внеклеточной пероксидазы салицилгидроксамовой кислотой (Карпец и др., 2011; Карпец та ін., 2011), которая считается одним из возможных ферментативных источников АФК (Минибаева, Гордон, 2003). Таким образом, основным генератором АФК, индуцируемым действием экзогенного оксида азота, в coleоптилях пшеницы является НАДФН-оксидаза. Этот фермент активируется при участии кальция (Глянько и др., 2009). На участие различных (внеклеточного и внутриклеточных) пулов кальция в активации донором оксида азота НАДФН-оксидазы coleоптилей пшеницы указывают выявленные нами ранее эффекты ингибирования NO-индуцированного усиления генерации АФК действием ЭГТА, неомицина С и никотинамида (Карпец и др., 2015).

Вероятно, активация антиоксидантных ферментов, вызываемая действием экзогенного оксида азота, происходит под влиянием АФК, генерируемых с участием НАДФН-оксидазы. Об этом свидетельствует нивелирование NO-

индуцированной активации всех трех антиоксидантных ферментов бутилгидрокситолуолом (скавенджер супероксидных анион-радикалов) и имидазолом (ингибитор НАДФН-оксидазы) (рис. 2). В свою очередь, активация НАДФН-оксидазы является зависимой от кальция (Карпец и др., 2015). При этом антагонисты кальция, по-видимому, препятствуя зависимому от НАДФН-оксидазы усилению генерации АФК, угнетают и повышение активности антиоксидантных ферментов, вызываемое экзогенным оксидом азота. Так, ЭГТА угнетал вызываемое НПН повышение активности СОД и каталазы в coleоптилях пшеницы (рис. 2), что свидетельствует о роли поступления внешнего кальция в цитозоль в активации этих ферментов. Заметим, что под действием ЭГТА не удалось зафиксировать угнетения повышения активности ГПО, вызываемого действием НПН (рис. 2). Не исключено, что для регуляции активности этого фермента поступление кальция в цитозоль из внешних компартментов не является критически важным.

В то же время угнетение действием неомицина и никотинамида эффекта активации донором оксида азота СОД, каталазы и ГПО позволяет предполагать значение для активации этих ферментов поступления кальция из внутриклеточных компартментов в цитозоль. Неомицин ингибирует фосфатидилинозитол-специфичную фосфолипазу С (Liu et al., 2006) и таким образом может препятствовать накопле-

нию продукта реакции инозитол-1,4,5-фосфата, который влияет на поступление кальция в цитозоль из внутриклеточных компартментов и тем самым активирует многие кальцийзависимые процессы (Lee, Lee, 2008). Несмотря на то, что в растениях до сих пор не обнаружены гомологи мишеней инозитол-1,4,5-фосфата, известно, что неомицин может уменьшать поступление кальция в цитозоль растительных клеток. Например, это соединение снимало эффект повышения концентрации кальция в клетках табака, вызываемый действием элиситора криптогеина (Lecourieux et al., 2002).

Концентрация цитозольного кальция может повышаться и с участием кальциевых каналов, регулируемых цАДФ-рибозой, которые локализованы преимущественно в вакуолях (Allen et al., 1995). Для изучения их возможного вклада в индуцируемую донором оксида азота активацию антиоксидантных ферментов мы использовали антагонист синтеза цАДФ-рибозы (ингибитор АДФ-рибозилциклазы) никотинамид (Leckie et al., 1998). Обработка колеоптилей пшеницы данным соединением в значительной степени нивелировала повышение активности СОД, каталазы и ГПО, вызываемое действием донора оксида азота (рис. 2).

Таким образом, кальцийзависимое усиление генерации АФК, происходящее под влиянием донора NO, по-видимому, участвует в формировании сигнала, индуцирующего защитные реакции клеток колеоптилей, в частности, активацию антиоксидантных ферментов (рис. 2). Заключение об участии АФК и кальция в NO-стимулируемом формировании адаптивных реакций клеток подтверждает снятие положительного влияния донора NO на интегральный показатель – теплоустойчивость колеоптилей пшеницы – антиоксидантом бутилгидрокситолуолом, ингибитором НАДФН-оксидазы имидазолом и различными антагонистами кальция (рис. 3).

Несомненно, сигнальная цепь, обеспечивающая индуцирование теплоустойчивости растительных клеток, является многокомпонентной. Оксид азота, кальций и АФК могут присутствовать на различных ее участках. При этом ионы  $Ca^{2+}$ , концентрация которых, по-видимому, увеличивается при действии NO на состояние кальциевых каналов, могут как индуцировать ферментные системы, генерирующие  $H_2O_2$  (прежде всего, НАДФН-оксидазу), так и участвовать в трансдукции АФК- и NO-сигналов в генетический аппарат и формировании физиологических реакций, обуславливаю-

щих изменение устойчивости растений к стрессорам. В частности, о роли кальция в трансдукции сигнала АФК в генетический аппарат свидетельствует выявленное ранее в экспериментах с колеоптилями пшеницы нивелирование блокатором потенциалзависимых кальциевых каналов верапамиллом повышения активности СОД, вызываемого действием экзогенного пероксида водорода (Колупаев и др., 2009). В работе, выполненной с использованием листьев кукурузы, происходящее под влиянием пероксида водорода повышение активности СОД, аскорбатпероксидазы и глутатионредуктазы нивелировалось предварительной обработкой антагонистами кальция (ЭГТА и лантана) и кальмодулина (трифторпиразина) (Hu et al. 2007). С другой стороны, в работе Lin et al. (2011) показано, что хелатор внешнего кальция ЭГТА в клетках сладкого картофеля подавлял индуцированное НПН усиление экспрессии гена  $Cu/Zn$ -СОД, но не влиял на активацию экспрессии гена этого фермента при действии пероксида водорода. По-видимому, функционирование механизмов индуцирования экспрессии генов антиоксидантных ферментов у разных объектов может быть различным. Естественно, что для выводов о роли кальция в трансдукции сигнала АФК, образующихся при действии на растительные клетки экзогенного NO, необходимы специальные исследования.

## ЛИТЕРАТУРА

- Глянько А.К., Ищенко А.А., Митанова Н.Б., Васильева Г.Г. НАДФН-оксидаза растений // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2009. – Вип. 2 (17). – С. 6-18.
- Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е., Луговая А.А., Обозный А.И. Влияние экзогенной жасмоновой кислоты на про-/антиоксидантную систему колеоптилей пшеницы в связи с устойчивостью к гипертермии // Физиология растений. – 2014. – Т. 61, № 3. – С. 367-375.
- Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е., Обозный А.И., Ястреб Т.О. Влияние антагонистов кальция на генерацию активных форм кислорода и развитие теплоустойчивости колеоптилей пшеницы, индуцируемые донором NO // Физиология растений и генетика. – 2015. – Т. 47, № 4. – С. 338-346.
- Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е. Функциональное взаимодействие оксида азота с активными формами кислорода и ионами кальция при формировании адаптивных реакций растений // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2017. – Вип. 2 (41). – С. 6-31.
- Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О. Влияние нитропруссиды натрия на теплоустойчивость колеоптилей пшеницы: связь эффектов с образова-

- нием и обезвреживанием активных форм кислорода // Физиология растений. – 2011. – Т. 58, № 6. – С. 883–890.
- Карпець Ю.В., Колупаєв Ю.Є., Швиденко М.В., Дмитрієв О.П. Вплив екзогенного оксиду азоту (NO) на генерацію супероксидного аніон-радикала та теплостійкість колеоптилів пшениці // Доповіді НАН України. – 2011 – № 9. – С. 147-152.
- Колупаєв Ю.Є., Карпець Ю.В., Мусатенко Л.І. Кальційзалежний вплив саліцилової кислоти і пероксида водню на активність супероксиддисмутази колеоптилів пшениці // Доповіді НАН України. – 2009. – № 9. – С. 165-169.
- Колупаєв Ю.Є. Антиоксиданти растительной клетки, их роль в АФК-сигналинге и устойчивости растений // Успехи соврем. биологии. – 2016. – Т. 136, № 2. – С. 181-198.
- Минибаева Ф.В., Гордон Л.Х. Продукция супероксида и активность внеклеточной пероксидазы в растительных тканях при стрессе // Физиология растений. – 2003. – Т. 50, № 3. – С. 459-464.
- Шорнинг Б.Ю., Смирнова Е.Г., Ягужинский Л.С., Ванюшин Б.Ф. Необходимость образования супероксида для развития этилированных проростков пшеницы // Биохимия. – 2000. – Т. 65, № 12. – С. 1612-1618.
- Allen G.J., Muir S.R., Sanders D. Release of Ca<sup>2+</sup> from individual plant vacuoles by both InsP<sub>3</sub> and cyclic ADP-ribose // Science. – 1995. – V. 268. – P. 735-737.
- 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.
- Bajguz A. Nitric Oxide: role in plants under abiotic stress // Physiological Mechanisms and Adaptation Strategies in Plants Under Changing Environment / Eds. P. Ahmad, M.R. Wani. – New York: Springer Science+Business Media, 2014. – V. 2. – P. 137-159.
- Begara-Morales J.C., Chaki M., Sanchez-Calvo B., Mata-Pérez C., Leterrier M., Palma J.M., Barroso J.B., Corpas F.J. Protein tyrosine nitration in pea roots during development and senescence // J. Exp. Bot. – 2013. – V. 64. – P. 1121-1142.
- 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. – V. 72. – P. 248-254.
- Chaki M., Valderrama R., Fernandez-Ocana A.M., Carreras A., Lopez-Jaramillo J., Luque F., Palma J.M., Pedrajas J.R., Begara-Morales J.C., Sanchez-Calvo B., Gomez-Rodriguez M.V., Corpas F.J., Barroso J.B. // Protein targets of tyrosine nitration in sunflower (*Helianthus annuus* L.) hypocotyls // J. Exp. Bot. – 2009. – V. 60. – P. 4221-4236.
- Corpas F.J., Leterrier M., Valderrama R., Airaki M., Chaki M., Palma J.M., Barroso J.B. Nitric oxide imbalance provokes a nitrosative response in plants under abiotic stress // Plant Sci. – 2011. – V. 181. – P. 604-611.
- Fares A., Rossignol M., Peltier J.B. Proteomics investigation of endogenous S-nitrosylation in Arabidopsis // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2011. – V. 416. – P. 331-338.
- Gaber A., Yoshimura K., Yamamoto T., Yabuta Y., Takeda T., Miyasaka H., Nakano Y., Shigeoka S. Glutathione peroxidase-like protein of Synechocystis PCC 6803 confers tolerance to oxidative and environmental stresses in transgenic Arabidopsis // Physiol Plant. – 2006. – V. 128. – P. 251-262.
- Gill S.S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants // Plant Physiol. Biochem. – 2010. – V. 48. – P. 909-930.
- Hamed S.M., Zinta G., Klöck G., Asard H., Selim S., AbdElgawad H. Zinc-induced differential oxidative stress and antioxidant responses in *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus acuminatus* // Ecotoxic. Environ. Saf. – 2017. – V. 140. – P. 256-263.
- Hu X., Jiang M., Zhang J., Zhang A., Lin F., Tan M. Calcium-calmodulin is required for abscisic acid-induced antioxidant defense and functions both upstream and downstream of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in leaves of maize (*Zea mays*) plants // New Phytol. – 2007. – V. 173. – P. 27-38.
- Hung K.T., Hsu Y.T., Kao C.H. Hydrogen peroxide is involved in methyl jasmonate-induced senescence of rice leaves // Physiol. Plant. – 2006. – V. 127. – P. 293-303.
- Jeandroz S., Lamotte O., Astier J., Rasul S., Trapet P., Besson-Bard A., Bourque S. Nicolas-Frances V., Berkowitz G.A., Wendehenne D. There's more to the picture than meets the eye: nitric oxide cross talk with Ca<sup>2+</sup> signaling // Plant Physiol. – 2013. – V. 163. – P. 459-470.
- Khan M.N., Mobin M., Abbas Z.K. Nitric oxide and high temperature stress: a physiological perspective // Nitric oxide action in abiotic stress responses in plants/ Eds. M.N. Khan, M. Mobin, F. Mohammad, F.J. Corpas. – Heidelberg, New York, Dordrecht, London, 2015. – P. 77-94.
- Leckie C.P., Mcainsh M.R., Allen G.J., Sanders D., Hetherington A.M. Abscisic acid-induced stomatal closure mediated by cyclic ADP-ribose // Proc Natl Acad Sci USA – 1998. – V. 95. – P. 15837-15842.
- Lecourieux D., Mazars C., Pauly N., Ranjeva R., Pugin A. Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells // Plant Cell. – 2002. – V. 14. – P. 2627-2641
- Lee Y., Lee Y. Roles of phosphoinositides in regulation of stomatal movements. Plant Signal. Behav. – 2008. – V. 3. – P. 211-213.



## РОЛЬ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ И АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА

- Lin C.C., Jih P.J., Lin H.H., Lin J.S., Chang L.L., Shen Y.H., Jeng S.T. Nitric oxide activates superoxide dismutase and ascorbate peroxidase to repress the cell death induced by wounding // *Plant Mol. Biol.* – 2011. – V. 77. – P. 235-249.
- Liu H.T., Huang W.D., Pan Q.H., Weng F.H., Zhan J.C., Liu Y., Wan S.B., Liu Y.Y. Contributions of PIP<sub>2</sub>-specific-phospholipase C and free salicylic acid to heat acclimation induced thermotolerance in pea leaves // *J. Plant. Physiol.* 2006. – V. 163. – P. 405-416.
- Lozano-Juste J., Leon J. Nitric oxide regulates DELLA content and PIF expression to promote photomorphogenesis in Arabidopsis // *Plant Physiol.* – 2011. – V. 156. – P. 1410-1423.
- Mur L.A.J., Mandon J., Persijn S., Cristescu S.M., Moshkov I.E., Novikova G.V., Hall M.A., Harren F.J.M., Hebelstrup K.H., Gupta K.J. Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge // *AoB Plants.* – 2013. – V. 5. P15052.
- Oz M.T., Eyidogan F., Yucel M., Oktem H.A. Functional role of nitric oxide under abiotic stress conditions // Nitric oxide action in abiotic stress responses in plants / Eds. M.N. Khan, M. Mobin, F. Mohammad, F.J. Corpas. – Heidelberg, New York, Dordrecht, London, 2015. – P. 21-42.
- Song L., Ding W., Zhao M., Sun B., Zhang L. Nitric oxide protects against oxidative stress under heat stress in the calluses from two ecotypes of reed // *Plant Sci.* – 2006. – V. 171. – P. 449-458.
- 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. – V. 27. – P. 563-573.
- Vital S.A., Fowler R.W., Virgen A., Gossett D.R., Banks S.W., Rodriguez J. Opposing roles for superoxide and nitric oxide in the NaCl stress-induced up-regulation of antioxidant enzyme activity in cotton callus tissue // *Environ. Exp. Bot.* – 2008. – V. 62. – P. 60-68.
- Zhang A., Jiang M., Zhang J., Ding H., Xu S., Hu X., Tan M. Nitric oxide induced by hydrogen peroxide mediates abscisic acid-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade involved in antioxidant defense in maize leaf // *New Phytol.* – 2007. – V. 175. – P. 36-50.
- Zhang L., Zhou S., Xuan Y., Sun M., Zhao L. Protective effect of nitric oxide against oxidative damage in Arabidopsis leaves under ultraviolet-B irradiation // *J. Plant Biol.* – 2009. – V. 52. – P. 135-140.

Поступила в редакцию  
10.10.2017 г.

## ROLE OF CALCIUM IONS AND REACTIVE OXYGEN SPECIES IN INDUCTION OF ANTIOXIDANT ENZYMES AND HEAT RESISTANCE OF PLANT CELLS BY NITRIC OXIDE DONOR

Yu. V. Karpets

V.V. Dokuchaev Kharkiv National Agrarian University  
(Kharkiv, Ukraine)  
E-mail: plant.biology.knau@gmail.com

The participation of calcium ions and reactive oxygen species (ROS) in the induction of enzymatic antioxidative system of wheat (*Triticum aestivum L.*) coleoptiles and their resistances to the damaging heating by nitric oxide donor sodium nitroprusside (SNP) with the use of inhibitory method have been investigated. Treatment of coleoptiles with SNP in concentration of 0,1 and 0,2 mM in the greatest measure induced their resistance to the damaging heating. Under the influence of SNP there was the increase in activity of superoxide dismutase, catalase, guaiacol peroxidase and ascorbate peroxidase in coleoptiles. Antioxidant butylhydroxytoluene, inhibitor of NADPH-oxidase imidazole, chelator of external calcium EGTA, inhibitor of phospholipase C neomycin and inhibitor of ADP-ribosyl cyclase nicotinamide partially eliminated the SNP influence on the activity of antioxidant enzymes. Also these compounds levelled the effect of increase in heat resistance of wheat coleoptiles caused by SNP. The conclusion about the influence of exogenous nitric oxide, mediated by calcium and ROS, on the antioxidative system and heat resistance of wheat coleoptiles is made.

**Key words:** *Triticum aestivum*, nitric oxide, antioxidant enzymes, reactive oxygen species, calcium, NADPH-oxidase, heat resistance

**КАРПЕЦ**

**РОЛЬ ІОНІВ КАЛЬЦІЮ ТА АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ В ІНДУКУВАННІ  
АНТИОКСИДАНТНИХ ФЕРМЕНТІВ І ТЕПЛОСТІЙКОСТІ  
РОСЛИННИХ КЛІТИН ДОНОРОМ ОКСИДУ АЗОТУ**

Ю. В. Карпець

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

*E-mail: plant.biology.knau@gmail.com*

З використанням інгібіторного методу досліджували участь іонів кальцію і активних форм кисню (АФК) в індукуванні донором оксиду азоту нітропрусидом натрію (НПН) ферментативної антиоксидантної системи колеоптилів пшениці (*Triticum aestivum* L.) та їх стійкості до ушкоджуючого прогріву. Обробка колеоптилів НПН в концентраціях 0,1 і 0,2 мМ найбільшою мірою індукувала їх стійкість до гіпертермії. Під впливом НПН відбувалося підвищення активності супероксиддисмутази, каталази, гваяколпероксидази і аскорбатпероксидази в колеоптилях. Антиоксидант бутилгідрокситолуол, інгібітор НАДФН-оксидази імідазол, хелатор позаклітинного кальцію ЕГТА, інгібітор фосфоліпази С неоміцин та інгібітор АДФ-рібозилциклази нікотинамід частково усували вплив НПН на активність антиоксидантних ферментів. Також ці сполуки нівелювали ефект підвищення теплостійкості колеоптилів пшениці, спричинюваний НПН. Зроблено висновок про опосередкований кальцієм і АФК вплив екзогенного оксиду азоту на антиоксидантну систему і теплостійкість колеоптилів пшениці.

**Ключові слова:** *Triticum aestivum*, оксид азоту, антиоксидантні ферменти, активні форми кисню, кальцій, НАДФН-оксидаза, теплостійкість