

УДК 581.1

## **АНТИОКСИДАНТНА ДІЯ ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДУ НА ПРОРОСТКИ ПШЕНИЦІ ЗА ТЕПЛОВОГО СТРЕСУ**

© 2007 р. Ю. Є. Колупаєв, Ю. В. Карпець

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

Вивчали вплив диметилсульфоксиду (ДМСО) на теплостійкість проростків озимої пшениці (*Triticum aestivum* L.) і деякі показники про-/антиоксидантної рівноваги. Обробка проростків ДМСО в концентрації 90 мкМ протягом 24 год або 10 мМ протягом 3 год підвищувала їх виживання після ушкоджуючого нагрівання (44,5°C, 10 хв). При цьому під впливом ДМСО зменшувався вміст пероксидів і зростала активність каталази в коренях і пагонах проростків. Активність пероксидази під впливом ДМСО істотно не змінювалася. Висловлюється припущення, що одним з механізмів захисної дії ДМСО на рослини за стресових умов є активація окремих компонентів антиоксидантної системи.

**Ключові слова:** *Triticum aestivum* L., диметилсульфоксид (ДМСО), антиоксидантний ефект, пероксиди, каталаза, пероксидаза, теплостійкість

Диметилсульфоксид (ДМСО) широко використовується як протектор при криоконсервації рослинних об'єктів [15, 18]. Добре відома його здатність підвищувати стійкість рослин до морозів і заморозків [5]. Даних щодо впливу ДМСО на стійкість рослин до інших стресорів в літературі значно менше. Показана можливість підвищення стійкості рослин до сірчистого ангідриду [12], високих температур [6] та радіації [17] під дією ДМСО.

Механізми модифікації резистентності рослин за дії ДМСО пов'язують з його впливом на стан біомембран [1, 5, 14]. Так, показано підвищення під впливом ДМСО вмісту ненасичених жирних кислот в ліпідах листків томату [5], що сприяє підтриманню їх рідкокристалічної структури за низьких температур. Показано також підвищення текучості мембран і зниження температури фазового переходу за рахунок взаємодії ДМСО з функціональними групами фосфоліпідів [14]. Проте такими ефектами напевно чи можна пояснити здатність ДМСО підвищувати стійкість рослин до високотемпературного стресу та несприятливих чинників, дія яких не пов'язана з виникненням фазових переходів мембран.

Ефектом, важливим для підвищення неспецифічної стійкості рослин, може бути антиоксидантна дія ДМСО, адже зростання вмісту активних форм кисню і посилення пероксидації ліпідів супроводжують дію стресорів практично будь-якої природи [19]. Як непряме свідчення антиоксидантної складової у дії ДМСО на рослини можна розглядати ефект підвищення їх стійкості до фумігації озоном за передобробки ДМСО [22]. Проте в цілому дані про антиоксидантний вплив ДМСО досить суперечливі [5, с. 107], а його механізми з'ясовані не повністю. На тваринних об'єктах показаний різноспрямований вплив ДМСО на активність антиоксидантних ферментів в різних органах [2]. В системі *in vitro* антиоксидантні ефекти ДМСО були неістотними [3].

Метою даної роботи було з'ясувати, наскільки пов'язане зареєстроване нами раніше підвищення теплостійкості проростків пшениці під впливом ДМСО [6] з його прямою антиоксидантною дією та можливим впливом на ферменти, що регулюють баланс активних форм кисню. Для цього оцінювали вплив ДМСО на вміст пероксидів в проростках пшениці та активність двох основних ферментів, що використовують пероксид водню як субстрат – пероксидази (гваяколпероксидаза) і каталази - за фізіологічно нормальних умов та після ушкоджуючого нагрівання.

---

Адреса для кореспонденції: Колупаєв Юрій Євгенович, Харківський національний агроуніверситет, п/в «Комуніст-1», Харків, 62483, Україна;  
e-mail: plant\_biology@mail.ru

## МЕТОДИКА

Об'єктом дослідження були етіоловані 4-добові проростки озимої пшениці сорту Донецька 48. Використовували два режими обробки проростків ДМСО. Кореневу систему проростків витримували на розчині ДМСО в концентрації 90 мкМ протягом 24 год або на 10 мМ розчині протягом 3 год [6]. У другому випадку перші 21 год проростки тримали на воді. Проростки контрольного варіанта увесь час інкубувалися на воді.

Після закінчення часу інкубації проростків на розчинах частину з них переносили на воду, іншу частину піддавали ушкоджуючому нагріванню (прогрів при  $44,5 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$  протягом 10 хв у водному термостаті), а далі також переносили на воду. Через три доби оцінювали відносну кількість проростків, що вижили.

Біохімічні аналізи проводили перед обробкою проростків досліджуваними сполуками, через 24 год після неї, а також через 1 і 24 год після ушкоджуючого нагрівання або перенесення проростків на дистильовану воду.

Вміст пероксидів (в основному  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) визначали феротіоціанатним методом Sagisaka [20], вилучаючи їх за допомогою 5%-ної трихлороцтової кислоти.

Сумарну активність гваяколпероксидази визначали за методом Ridge и Osborne [21]. Фермент вилучали з рослинного матеріалу за допомогою 0,06 М К, Na-фосфатного буферу Серенсена (рН 6,2) з додаванням 0,5 М NaCl. Активність каталази визначали за методом, описаним Королюком і співавт. [9]. Середовищем для екстрагування ферменту слугував 0,1 М трис-НСІ буфер (рН 7,4). При оцінці впливу ДМСО на активність каталази *in vitro* до супернатанту, що містив екстракт ферменту, додавали ДМСО у відповідних концентраціях, інкубували 40 хв і визначали активність ферменту, як описано вище.

Кожен дослід відтворювали незалежно тричі. На рисунках наведені середні величини та їх стандартні відхилення.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Раніше [7] ми показали, що антиоксидант іонол (бутилгідрокситолуол) виявляв захисний вплив на проростки пшениці у відносно низькій концентрації (90 мкМ). Еквімолярна концентрація ДМСО також підвищувала виживання проростків пшениці після нагрівання (рис. 1).

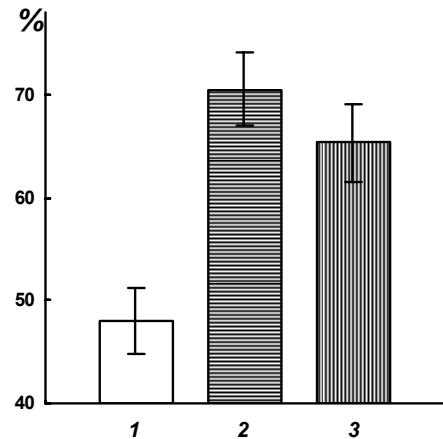


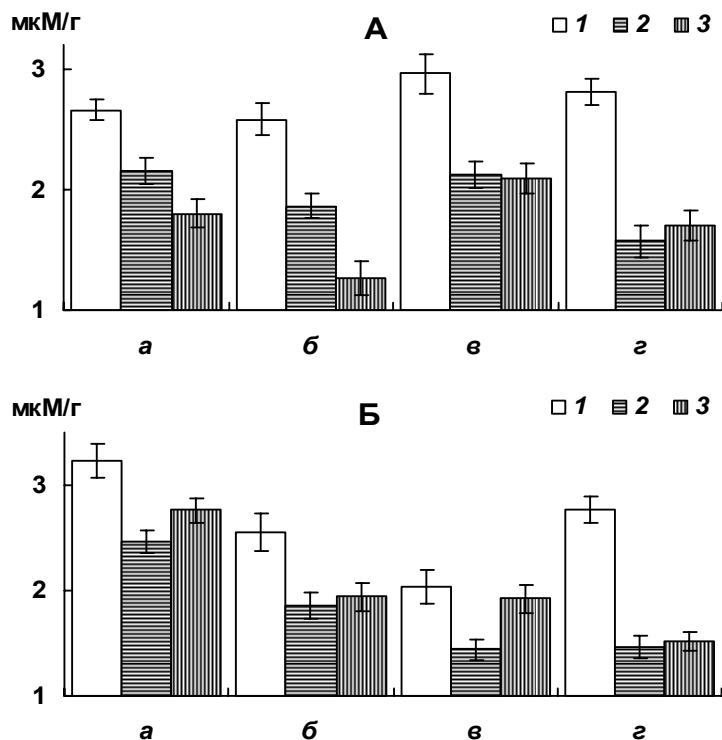
Рис. 1. Вплив ДМСО на виживання (%) проростків пшениці після ушкоджуючого нагрівання. 1 – контроль, 2 і 3 – відповідно обробка 90 мкМ (24 год) і 10 мМ (3 год) ДМСО.

При цьому ефекти ДМСО були більш помітними порівняно з дією іонолу (підвищення виживання у варіанті з ДМСО склало 22,5%, а у випадку з іонолом – 11,3% порівняно з контролем [7]). Короткочасна (3 год) обробка проростків розчином ДМСО у вищій концентрації (10 мМ) також збільшувала виживання проростків після ушкоджуючого нагрівання, хоча її ефект дещо поступався 24-годинній дії 90 мкМ ДМСО (рис. 1).

Вміст пероксидів у коренях проростків контрольного варіанта через 1 год після нагрівання істотно не змінювався, а через 24 год – дещо зростав. У відповідному варіанті без нагрівання зміни вмісту пероксидів у коренях за час дослідження були неістотними. У пагонах контрольного варіанта нагрівання спричиняло деяке зменшення вмісту пероксидів (рис. 2). Незначне зменшення вмісту пероксидів впродовж 24 год інкубації спостерігалось і у пагонах проростків, які не нагрівали.

ДМСО за обох режимів обробки чинив антиоксидантний ефект, що виявлялося у зменшенні вмісту пероксидів у коренях і пагонах проростків пшениці (рис. 2). Через 1 год після нагрівання вміст пероксидів у коренях проростків варіанта з ДМСО в концентрації 90 мкМ істотно не змінювався, а у варіанті з високою концентрацією препарату – зменшувався. Через 24 год після нагрівання вміст пероксидів в коренях проростків двох варіантів з ДМСО ставав практично однаковим за рахунок підвищення цього показника у проростках, оброблених 10 мМ ДМСО. При цьому, однак, на всіх фазах дослідження вміст пероксидів в коренях проростків,

## АНТИОКСИДАНТНА ДІЯ ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДУ



**Рис. 2.** Вміст пероксидів (мкмоль  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{г}$  сухої речовини) в коренях (А) і пагонах (Б) проростків пшениці. Тут і на рис. 3, 4: а – одразу після обробки ДМСО; б, в – відповідно через 1 і 24 год після нагрівання; г – через 24 год після перенесення проростків, які не нагрівали, на дистильовану воду. 1 – контроль; 2 і 3 – відповідно обробка 90 мкМ (24 год) і 10 мМ (3 год) ДМСО.

що прогрівалися, у варіантах з ДМСО був нижчим порівняно з відповідними величинами у контролі. Така ж картина спостерігалася і через 24 год після припинення дії ДМСО у коренях проростків, які не прогрівали (рис. 2).

У пагонах ДМСО також знижував вміст пероксидів на всіх стадіях експерименту. Щоправда, через 24 год після нагрівання вміст пероксидів у пагонах проростків варіанта з 3 год обробкою 10 мМ ДМСО достовірно не відрізнявся від відповідного контролю. У випадку без нагрівання антиоксидантний ефект ДМСО виявлявся в обох варіантах і через 24 год після перенесення проростків на воду (рис. 2).

Припускають, що ДМСО може чинити прямий антиоксидантний ефект, зв'язуючи вільні радикали [10]. Водночас не можна виключити і його впливу на активність антиоксидантних ферментів. У зв'язку з цим у наступних серіях дослідів оцінювали вплив ДМСО на активність ферментів, що беруть участь у метаболізації пероксиду водню – пероксидази і каталази.

У контрольному варіанті активність пероксидази у коренях і пагонах (меншою мірою) підвищувалася після нагрівання (рис. 3). Підвищення активності цього ферменту мало місце

і через 24 год інкубації проростків, які не нагрівали. Останній ефект може бути пов'язаний з природними флуктуаціями активності ферменту у міру росту проростків [4]. ДМСО дещо підвищував активність пероксидази у коренях, при цьому однак підвищення було достовірним лише відразу після обробки рослин ДМСО. У пагонах одразу після обробки ДМСО достовірного його впливу на активність пероксидази виявити не вдалося (рис. 3). Щоправда, через 1 год після нагрівання у пагонах, оброблених 10 мМ ДМСО, спостерігалася тенденція до підвищення активності ферменту. Через 24 год після нагрівання або через 24 год після перенесення проростків з ДМСО на воду достовірних відмінностей між варіантами в основному не відзначалося. Проте через добу після нагрівання у коренях оброблених 10 мМ ДМСО, спостерігалася зниження активності гваяколпероксидази (рис. 3). В цілому ж вплив ДМСО на активність ферменту був відносно незначним і навряд чи міг спричинити виявлені істотні зміни вмісту пероксидів.

Активність каталази в коренях і пагонах контрольних проростків після нагрівання знижувалася (рис. 4). У зразках контрольного варіанта, які не нагрівали, за 24 год дослідів змін активності каталази не виявлялося. ДМСО в обох концентраціях підвищував активність

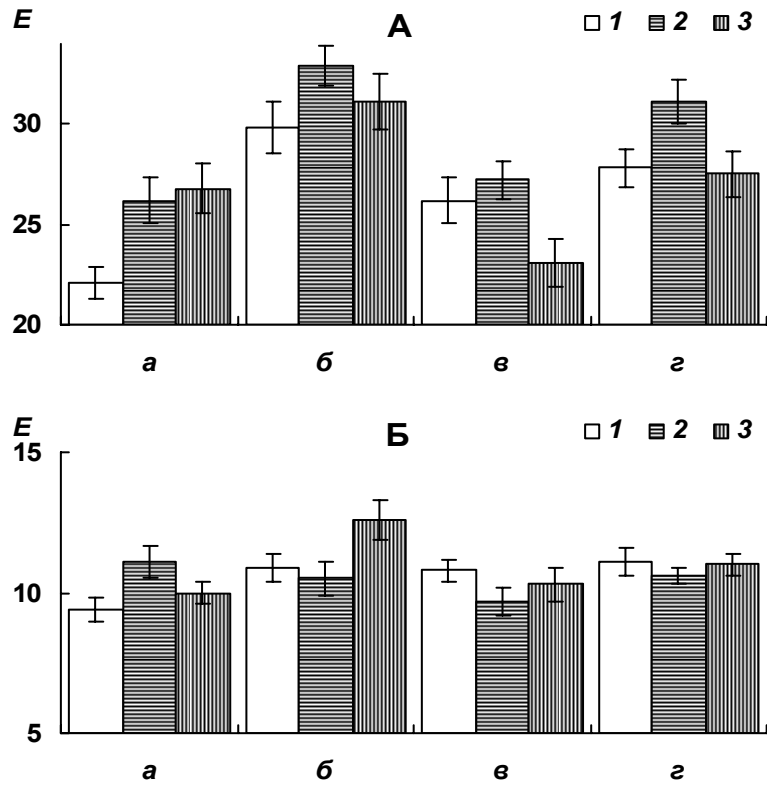


Рис. 3. Активність гваякопероксидази ( $E$ , умовн. од/(хв·г сухої маси)) в коренях (А) і пагонах (Б) проростків пшениці. Позначення як на рис. 2.

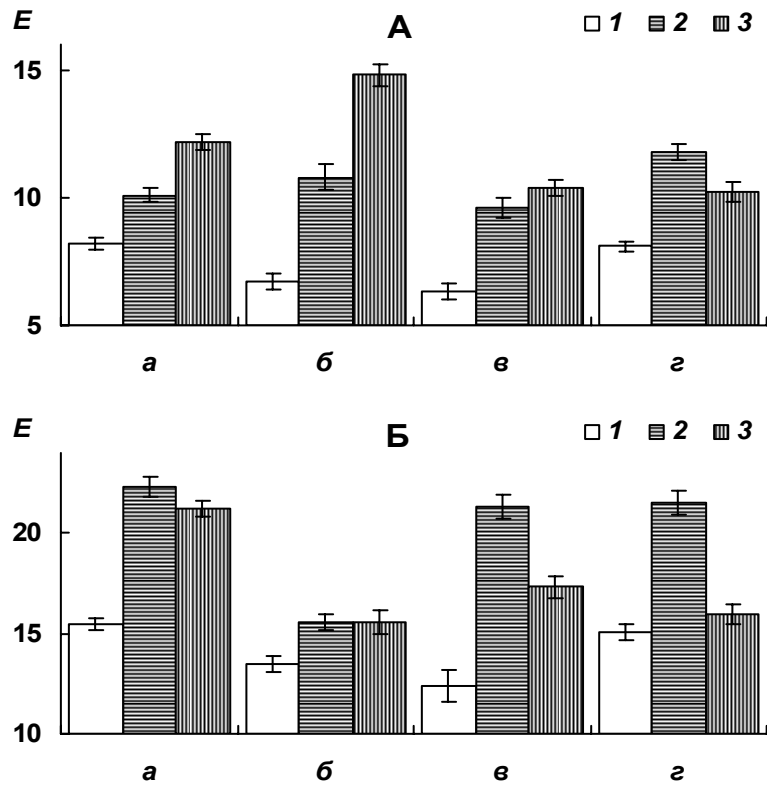


Рис. 4. Активність каталази ( $E$ , ммоль  $H_2O_2$ /(хв·г сухої маси)) в коренях (А) і пагонах (Б) проростків пшениці. Позначення як на рис. 2.

## АНТИОКСИДАНТНА ДІЯ ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДУ

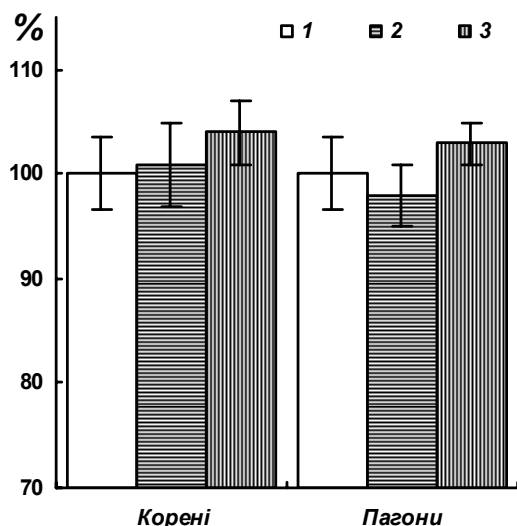


Рис. 5. Вплив ДМСО на активність каталази коренів (А) і пагонів (Б) проростків пшениці *in vitro* (% до контролю без добавки ДМСО).

каталази в коренях та пагонах. При цьому у коренях зразків, оброблених ДМСО, після нагрівання, на відміну від контрольних, не відбувалося зниження активності каталази. У пагонах через 1 год після нагрівання у варіантах з ДМСО мало місце деяке зниження активності ферменту, але абсолютні значення активності каталази істотно перевищували відповідні величини контролю. Через 24 год після нагрівання у варіанті з ДМСО активність ферменту у пагонах підвищувалася, майже досягаючи до-стресових значень. У зразках, оброблених ДМСО, у варіанті без нагрівання ефект підвищення активності каталази зберігався і через 24 год після їх перенесення на дистильовану воду, за винятком активності у пагонах, що зазнали дії 10 мМ ДМСО. Отже, ДМСО істотно підвищував активність каталази в коренях і пагонах проростків пшениці.

В окремі серії дослідів оцінювали можливість підвищення активності каталази в умовах *in vitro*, додаючи відповідну кількість ДМСО до екстракту ферменту в кінцевих концентраціях 90 мкМ і 10 мМ. В системі *in vitro* ДМСО достовірно не змінював активність каталази (рис. 5). На підставі одержаних даних можна припускати, що ДМСО впливає на процес синтезу каталази, а не модифікує існуючі молекули ферменту.

На прикладі тваринних об'єктів показана здатність багатьох тіольних сполук активувати так званий антиоксидант-респонсивний елемент (ARE – antioxidant responsive element) ге-

нів [11]. За його участю відбувається регуляція систем підтримання гомеостазу за стресових умов. Серед активаторів ARE, під контролем якого перебуває експресія генів антиоксидантних ферментів, можуть бути і сполуки з тіольними (сульфоксидними) групами [11]. Безумовно, проведення паралелей між ефектами ДМСО на рослинні об'єкти і дією ряду тіольних сполук на тваринні організми, в яких доведена наявність ARE, досить уможливлене. Однак, не виключено, що подібний механізм, пов'язаний з індукуванням антиоксидантних систем за участю тіольних сполук, існує і в рослинних організмах. Прикметно, що інший антиоксидант, який має фенольну природу і не має тіольних груп – іонол (бутилгідрокситолуол), не впливав на активність каталази проростків пшениці [7].

Звичайно, можливі й інші механізми активації адаптивних реакцій за дії ДМСО. Відомо, що ДМСО викликає широкий спектр змін в мембранах [14]. Не виключено, що при цьому можуть відбуватися зміни конформації мембраноз'язаних ферментів, які є стартовими компонентами сигнальних систем [13]. Їх активація і передача відповідного сигналу на геном може призводити до посилення експресії генів, причетних до розвитку різноманітних захисних реакцій, зокрема, активації антиоксидантної системи.

Як уже відзначалося, ефекти еквімолярного іонолу і ДМСО на проростки пшениці за умов теплового стресу відрізнялися: за однакових експериментальних умов підвищення теплостійкості за дії ДМСО було більш істотним. Можна припускати, що це пов'язане зі здатністю ДМСО індукувати активність антиоксидантних ферментів, зокрема, каталази, а не лише безпосередньо елімінувати АФК. В цьому плані дія ДМСО як індуктора антиоксидантних ферментів може бути порівняна з ефектами деяких агентів окиснювального стресу, які в фізіологічних концентраціях здатні індукувати синтез антиоксидантних ферментів. Так, саліцилова кислота, інгібуючи каталазу *in vitro*, викликала підвищення її активності в проростках пшениці *in vivo* [8]. При цьому стимулом для індукування синтезу каталази могло бути тимчасове підвищення вмісту перексиду водню в рослинах під впливом саліцилової кислоти.

Безумовно, позитивний вплив ДМСО на стійкість рослин до різних стресорів може бути досить складним і пов'язаним не лише з індукуванням антиоксидантних систем, а й з пря-

мим антиденатураційним впливом на білки [14, 16], стабілізацією мембранних структур [1]. Водночас стабілізація мембран може бути наслідком зменшення пероксидації ліпідів. У даній роботі показано, що ДМСО значно зменшував вміст пероксидів в коренях і пагонах проростків пшениці (див. рис. 2), а раніше нами було виявлено зменшення під впливом ДМСО виходу електролітів з тканин коренів пшениці після теплового стресу [6]. Проте в будь-якому разі є підстави вважати, що антиоксидантний вплив ДМСО може бути однією з причин його протекторних ефектів на рослинні об'єкти за дії стресорів різної природи.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Асафова Е.В., Хохлова Л.П., Олиневич О.В. и др. Влияние модификаторов цитоскелета на проницаемость мембран и устойчивость растений // Проблемы ботаники на рубеже 20-21 веков: Тез. докл., представленных 2(10) Съезду Рус. Ботан. О-ва, Санкт-Петербург, 26-29 мая 1998. – СПб, 1998. – Т. 1. – С. 146.
2. Калитка В.В., Савранська О.В., Калугіна І.П. Вплив іонолу і диметилсульфоксиду на активність ферментів антиоксидантової системи захисту у курчат // Укр. біохім. журн. – 1994. – Т. 66, № 5. – С. 27-31.
3. Калитка В.В., Донченко Г.В. Вивчення антиоксидантової активності препарату дистинол за умов *in vitro* // Там само. – 1995. – Т. 67, № 4. – С. 87-92.
4. Карташова Е.Р., Руденская Г.Н., Юрина Е.В. Полифункциональность растительных пероксидаз и их практическое использование // С.-х. биология. – 2000. – № 5. – С. 63-70.
5. Колоша О.И., Рябокляч В.А., Великожон Л.Г. Устойчивость томатов к низким температурам. – Киев: Наук. думка, 1993. – 136 с.
6. Колупаєв Ю.Є., Карпець Ю.В., Діденко С.Ю. Возможні механізми протекторної дії диметилсульфоксиду на рослинні тканини при жорсткому високотемпературному стресі // Биол. вестник. – 2000. – Т. 4, № 1-2. – С. 54-57.
7. Колупаєв Ю.Є., Карпець Ю.В. Супрессия антиоксидантом ионолом повышения теплоустойчивости проростков пшеницы, индуцируемого ионами кальция // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2006. – Вип. 2 (9). – С. 21-30.
8. Колупаєв Ю.Є., Карпець Ю.В., Акініна Г.С. Вплив саліцилової кислоти на активність каталази і гваяколпероксидази колеоптилів пшениці за умов теплового стресу // Физиология и биохимия культ. растений. – 2006. – Т. 38, № 4. – С. 317-323.
9. Королюк М. А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.
10. Левшина И.П., Гуляева Н.В., Обидин А.Б., Курочкина Е.В. Антистрессовый эффект диметилсульфоксида у крыс // Журн. высш. нервн. деятельности. – 1987. – Т. 37, вып. 2. – С. 350-355.
11. Ляхович В.В., Вавилин В.А., Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б. Активная защита при окислительном стрессе. Антиоксидант-респонсивный элемент // Биохимия. – 2006. – Т. 71, вып. 9. – С. 1183-1197.
12. Поповичева Л.А., Гродзинский Д.М. Характер воздействия диметилсульфоксида на устойчивость растений к сернистому газу // Физиология и биохимия культ. растений. – 1985. – Т. 17, № 6. – С. 601-605.
13. Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений. – М.: Наука, 2002. – 294 с.
14. Чуйко В.А. Механизм криозащитной эффективности и фармакологические свойства ДМСО // Криобиология. – 1989. – № 1. – С. 3-10.
15. Abdelnour-Esguivel A., Engelmann F. Cryopreservation of chayote (*Sechium edule* JACQ. SW.) zygotic embryos and shoot-tips from *in vitro* plantlets // Crio-Lett. – 2002. – V. 23, N 5. – P. 299-308.
16. Fujita I., Noda Y. Effect of dimethylsulphoxide and its homologous on the thermal denaturation of lysosome as measured by differential scanning calorimetry // Intern. J. Peptide and Protein Res. – 1982. – V. 19, N 1. – P. 25-31.
17. Kaul B.L. Use of mixture of chemical protectors against X-ray damage in plants // Indian J. Exp. Biol. – 1971. – V. 9, N 1. – P. 69-71.
18. Kim S.-I., Choi H.-K., Son J.-S. et al. Cryopreservation of *Taxus chinensis* suspension cell cultures // Crio-Lett. – 2001. – V. 22, N 1. – P. 43-50.
19. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // Trends Plant Sci. – 2002. – V. 7. – P. 405-410.
20. 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.

## АНТИОКСИДАНТНА ДІЯ ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДУ

21. *Sagisaka S.* The Occurrence of Peroxide in a Perennial Plant, *Populus gelrica* // *Plant Physiol.* - 1976. - V. 57. - P. 308-309.
22. *Weidensaul T.* DMSO as a protectant against ozone injury to pinto bean // *Crop. Prot.* - 1982. - V. 1, N 2. - P. 235-242.

Надійшла до редакції  
05.05.2007 р.

## DIMETHYLSULFOXIDE ANTIOXIDATIVE ACTION ON WHEAT PLANTLETS AT HEAT STRESS

Yu. Ye. Kolupaev, Yu. V. Karpets

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

The influence of dimethylsulfoxide (DMSO) on the heat resistance of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) plantlets and some indexes pro/antioxidative balance has been studied. The treatment of plantlets with the DMSO in concentration 90  $\mu$ M within 24 h or 10 mM within 3 h increased their surviving after damaging heating (44,5<sup>0</sup>C, 10 minutes). Thus under the DMSO influence the content of peroxide compounds decreased and activity of catalase in roots and propagules increased. The activity of peroxidase under the DMSO action essentially did not vitiare. It is come out with the assumption, that the activation of separate antioxidative protection components is one of the mechanisms of the DMSO protective action on plants in stress conditions.

**Key words:** *Triticum aestivum* L., dimethylsulfoxide (DMSO), antioxidative effect, peroxide compounds, catalase, peroxidase, heat resistance

## АНТИОКСИДАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДА НА ПРОРОСТКИ ПШЕНИЦЫ ПРИ ТЕПЛОВОМ СТРЕССЕ

Ю. Е. Колупаев, Ю. В. Карпец

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

Изучали влияние диметилсульфоксида (ДМСО) на теплоустойчивость проростков озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и некоторые показатели про-/антиоксидантного равновесия. Обработка проростков ДМСО в концентрации 90 мкМ в течение 24 ч или 10 мМ в течение 3 ч повышала их выживание после повреждающего нагрева (44,5<sup>0</sup>C, 10 мин). При этом под влиянием ДМСО уменьшалось содержание пероксидов и увеличивалась активность каталазы в корнях и побегах. Активность пероксидазы под действием ДМСО существенно не изменялась. Высказано предположение, что одним из механизмов защитного действия ДМСО на растения в стрессовых условиях является активация отдельных компонентов антиоксидантной системы.

**Ключевые слова:** *Triticum aestivum* L., диметилсульфоксид (ДМСО), антиоксидантный эффект, пероксиды, каталаза, пероксидаза, теплоустойчивость