

УДК 581.1: 57.044: 582.683.2

РАННЕЕ УВЕЛИЧЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И АКТИВНОСТИ АСКОРБАТПЕРОКСИДАЗЫ И КАТАЛАЗЫ В ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ *ARABIDOPSIS THALIANA* ПРИ ОСМОТИЧЕСКОМ И ОКСИДАТИВНОМ СТРЕССАХ

© 2012 г. С. И. Жадько

*Институт ботаники им. Н.Г. Холодного
Национальной академии наук Украины
(Киев, Украина)*

Исследовали ранние изменения в содержании активных форм кислорода (АФК) и активности аскорбат пероксидазы (АП) и каталазы (Кат) в листьях растений *Arabidopsis thaliana* при осмотическом и оксидативном воздействиях. Установлено, что при действии данных стрессоров в первые минуты происходит увеличение содержания АФК в процессе развития стрессорной оксидативной вспышки (СОВ). Затем эти АФК СОВ, в качестве вторичных мессенджеров, вызывают увеличение активности АП и Кат.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, активные формы кислорода, аскорбат пероксидаза, каталаза, осмотический и оксидативный стресс

Активные формы кислорода (АФК) – супероксидный анион-радикал, пероксид водорода и гидроксильный радикал могут вызывать оксидативно-деструктивные эффекты в клетках растений, а пероксид водорода (H_2O_2) также выполняет сигнальные функции. В физиологически нормальных условиях АФК постоянно образуются в клетках в процессах пероксидации (ПО) и находятся под контролем антиоксидантной (АО) системы (Mittler et al., 2004; Dietz, 2008; Miller et al., 2008).

Однако при различных стрессах резко возрастает содержание АФК в процессе развития стрессорной оксидативной вспышки (СОВ) с последующей угрозой развития оксидативной деструкции (Mittler et al., 2004). Поэтому, в ответ на стрессорное увеличение АФК происходит активация АО системы клетки, особенно быстро увеличивается активность АО ферментов, в частности супероксиддисмутазы (СОД), аскорбатпероксидазы (АП), каталазы (Кат), пероксиредоксина (ПР) и др. (Dietz et al., 2006; Dietz, 2008). Для изучения сигнальной роли АФК, в частности H_2O_2 , и механизма развития

ответной стресс-реакции особый интерес представляет выявление ранней АФК-зависимой активации АП и Кат, обеспечивающих АО ответ клетки. Имеющиеся в литературе данные в основном касаются увеличения активности АП и Кат при более длительных воздействиях (Maksymiec, Krupa, 2006; Колупаев, Карпец, 2010).

Целью данной работы было выявление раннего увеличения содержания АФК посредством метода регистрации спонтанной хемилюминесценции (СХЛ) от живых клеток, а также изучение АФК-зависимого увеличения активности АП и Кат в листьях растений *A. thaliana* при осмотическом и оксидативном стрессах.

МЕТОДИКА

Исследовали листья 20-23 дневных растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, экотип Columbia. Растения выращивали в почве (Грунтова суміш, Квіткова №1, Україна) при освещении 6500-7500 лк и фотопериоде 16 ч освещенности и 8 ч темнота при температуре 20°C.

Осмотический стресс вызывали посредством помещения листьев в 25% раствор полиэтилен гликоля 6000 (ПЭГ), а оксидативный – в

РАННЕЕ УВЕЛИЧЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ

30 мМ H_2O_2 . Через 30, 60 и 90 мин определяли интенсивность СХЛ, активность АП и Кат.

СХЛ определяли на основании методики (Барабой, Жадько, 1992) с некоторой модификацией. Для этого исследуемые листья быстро отрезали от растений острой бритвой и помещали в кювету хемилуминометра ХЛМЦ-01 и через 20 мин, после так называемого «эффекта высвечивания хлорофилла», определяли интенсивность свечения в импульсах в секунду. При этом, согласно данному методу, интенсивность СХЛ коррелировала с содержанием АФК в нативных/живых листьях.

Активность АП и Кат определяли спектрофотометрически по (Maksymiec, Krupa, 2006). Для этого исследуемые листья растений быстро гомогенизировали в охлажденных ступках с охлажденным раствором, содержащим 50 ммоль Na_2HPO_4/KH_2PO_4 (рН 7,0), 0,8% тритон Х-100 и 1% PVP. Затем гомогенат центрифугировали при 17000 g в течение 17 мин и в полученном супернатанте сразу определяли активности АП и Кат. Все операции проводили на холоде при 4°C.

Для изучения АФК-зависимого увеличения активности АП и Кат, листья перед стрессом погружали в раствор 10 мМ раствор аскорбата (А) на 25 мин, после чего их сразу подвергали действию ПЭГ или H_2O_2 (в дальнейшем как А+ПЭГ и А+ H_2O_2). Содержание белка определяли по методу Бредфорда (Bradford, 1976).

Повторность экспериментов 3-4 кратная. Полученные данные обрабатывали статистически (Плохинский, 1970).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для исследуемых листьев контрольных образцов *A. thaliana* в среднем были характерны следующие параметры/показатели: интенсивность СХЛ – 420-470 импульсов в секундах на грамм ткани (сырой вес); активность АП – 0,83-0,96 усл. ед. в мин на мг белка и активность Кат – 2,9-3,2 усл. ед. на 100 мкг белка в мин.

При действии ПЭГ в листьях *A. thaliana* происходило раннее и значительное увеличение интенсивности СХЛ и к 30 мин оно было выше соответствующих контролей. Затем к 60 и 90 мин свечение медленно снижалось (рис. 1 А). Аналогичные изменения, но с большей амплитудой увеличения СХЛ, происходили и при действии H_2O_2 (рис. 2 А).

При предстрессовой обработке листьев аскорбатом с последующим действием ПЭГ или H_2O_2 происходило снижение стрессорного образования АФК (рис. 1 Б, 2 Б).

Достоверное увеличение активности АП происходило только к 60 и 90 мин при действии ПЭГ и H_2O_2 соответственно (рис. 3 А, 4 А). Аналогичные изменения были также характерны и для увеличения активности Кат (рис. 5 А, 6 А).

В следующей серии экспериментов исследовали взаимосвязь между ранним стрессорным увеличением содержания АФК и последующим увеличением активности АП и Кат. При предстрессовой обработке листьев аскорбатом (А) для снижения СОВ и с последующим действием ПЭГ или H_2O_2 увеличение активности АП и Кат было не таким значительным как без обработки А (рис. 3 Б; 4 Б; 5 Б; 6 Б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Раннее увеличение содержания АФК (интенсивности СХЛ) и его последующее снижение в листьях *A. thaliana* при осмотическом и оксидативном стрессах соответствует СОВ (рис. 1 А, 2 А), которая обычно происходит при различных стрессах (Mittler et al., 2004; Жадько, 2010 а, б). Затем АФК, в качестве вторичных мессенджеров, запускают ответную стресс-реакцию, направленную, прежде всего, на повышение АО активности клеток, чтобы блокировать дальнейшее развитие оксидативной деструкции при чрезмерном накоплении АФК. После чего, от 30 до 90 мин наступает стадия снижения СХЛ в результате увеличения АО активности клеток, включая увеличение активности АП и Кат (рис. 3А, 4А, 5А, 6А). При этом амплитуда СОВ зависит от величины (дозы) и вида стресса. В данном случае действие 25% ПЭГ и 30 мМ H_2O_2 , также вызывают СОВ с последующим эффектом АФК-зависимого увеличения активности АП и Кат (рис. 1-6). Ранее нами было установлено, что при действии более высоких концентраций ПЭГ (30%) и H_2O_2 (50 мМ) в клетках культуры ткани *A. thaliana* также происходит развитие ранней СОВ с АФК-зависимым увеличением активности пероксиредоксина и тиоредоксина (Жадько, 2010 а).

Выявленное раннее АФК-зависимое увеличение активности АП и Кат может вначале происходить просто за счет субстрат-зависимого увеличения активности этих ферментов: чем больше содержание H_2O_2 , тем

ЖАДЬКО

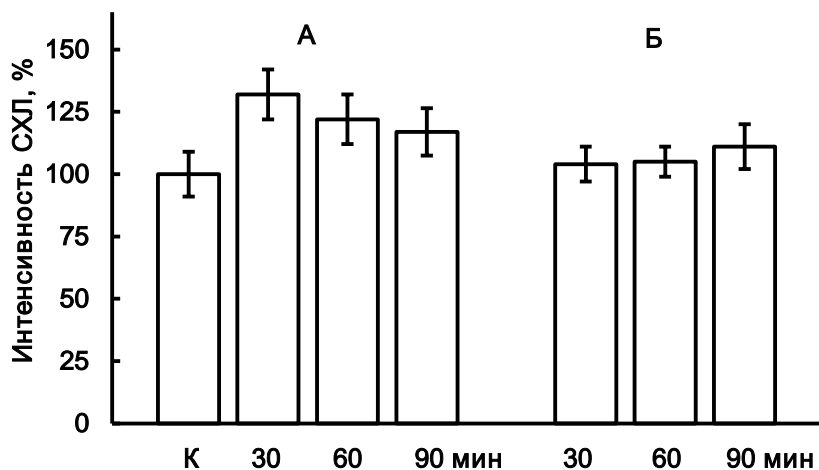


Рис. 1. Интенсивность СХЛ (% к контролю) листьев *Arabidopsis thaliana* при действии ПЭГ (А) и А+ПЭГ (Б).

Здесь и на рис. 2-6: К – контроль.

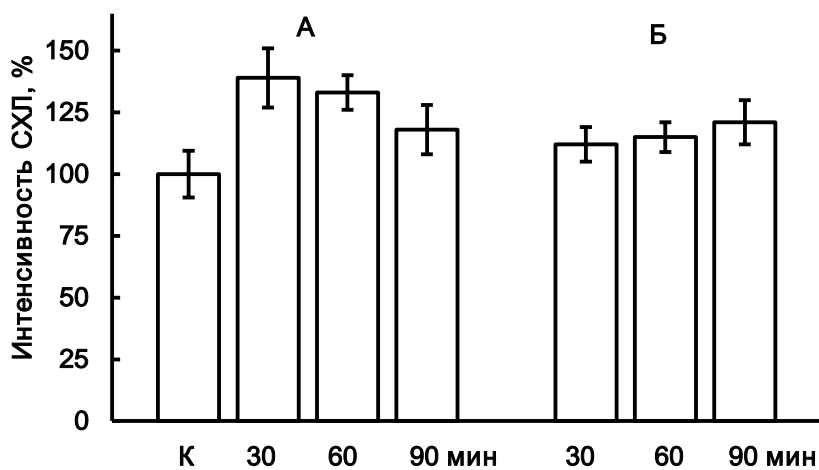


Рис. 2. Интенсивность СХЛ (% к контролю) листьев *Arabidopsis thaliana* при действии H₂O₂ (А) и А+H₂O₂ (Б).

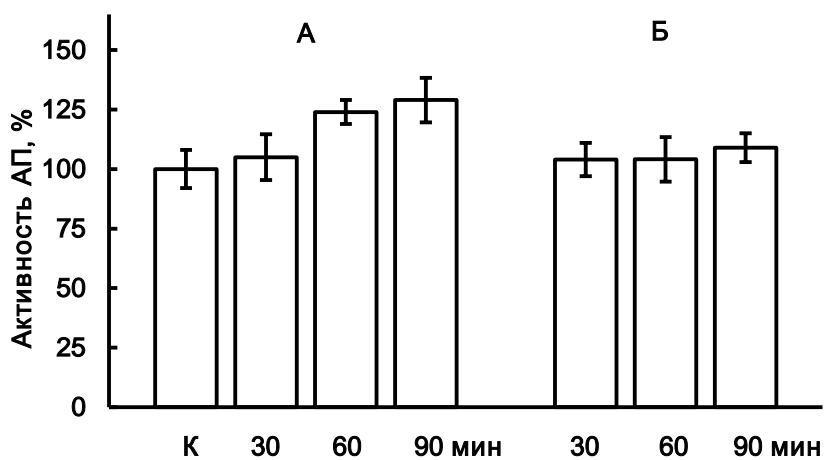


Рис. 3. Активность АП (% к контролю) в листьях *Arabidopsis thaliana* при действии ПЭГ (А) и А+ПЭГ (Б).

РАННЕЕ УВЕЛИЧЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ

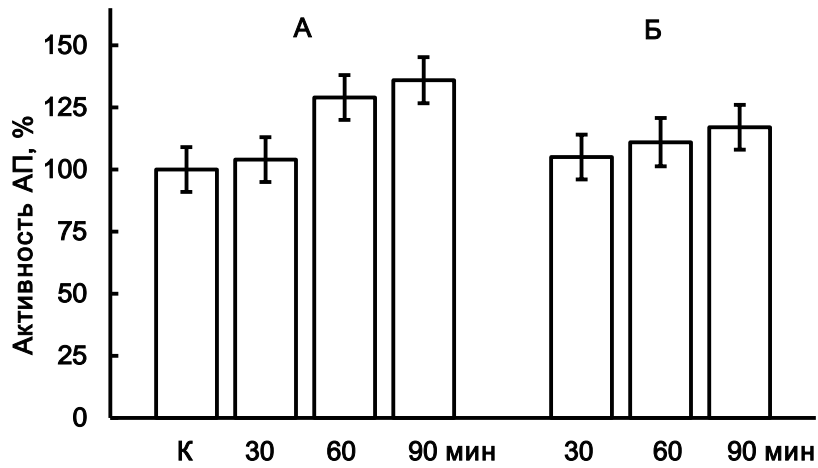


Рис. 4. Активность АП (% к контролю) в листьях *Arabidopsis thaliana* при действии H₂O₂ (А) и А+H₂O₂ (Б).

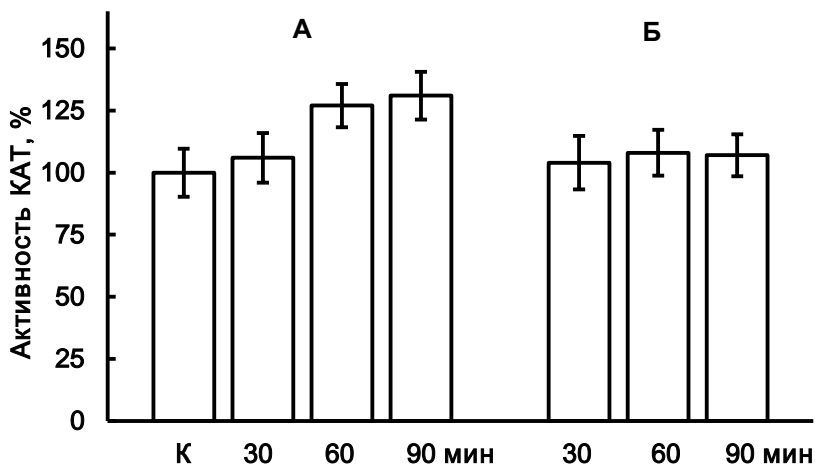


Рис. 5. Активность Кат (% к контролю) в листьях *Arabidopsis thaliana* при действии ПЭГ (А) и А+ПЭГ (Б).

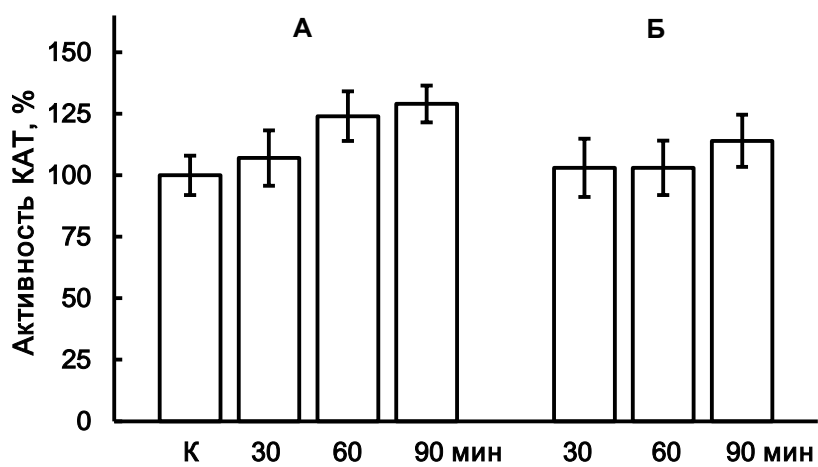


Рис. 6. Активность Кат (% к контролю) в листьях *Arabidopsis thaliana* при действии H₂O₂ (А) и А+H₂O₂ (Б).

выше активность АП и Кат. Однако, в дальнейшем, могут быть вовлечены более сложные и специфические процессы связанные с рецепцией и трансдукцией АФК сигналов, в частности H_2O_2 , приводящие в дальнейшем к увеличению экспрессии генов АП и Кат. Известно, что при различных стрессах у растений происходит увеличение как активности АП и Кат, так и экспрессии их генов (Mittler et al., 2004; Maksymiec, Krupa, 2006). Наряду с этим, также возможно, что зарегистрированное нами стрессорное усиления активности АП и Кат происходит за счет увеличения их активности посредством усиления их взаимодействия с тиоредоксином (ТР), так как АП и Кат являются мишенями ТР, при взаимодействии с которым увеличивается их активность (Santos, Rey, 2006). В пользу предположения о таком механизме свидетельствуют данные о раннем увеличении активности ТР в клетках культуры ткани *A. thaliana* при осмотическом и оксидативном стрессах (Жадько, 2010 а).

Основными компартментами образования АФК в освещаемых фотосинтетических клетках растений являются хлоропласты, митохондрии и пероксисомы (Foyer, Noctor, 2003). Поэтому зарегистрированную в наших исследованиях СОВ (рис. 1, 2), которая может возникать в различных компартментах клетки в зависимости от механизма действия стресса, следует рассматривать как сложную, многокомпонентную систему, в состав которой могут входить различные комбинации редокс-сигналов из различных органелл и сайтов клетки. При этом АФК сигналы, образовавшиеся в различных сайтах и в различных метаболических реакциях, могут суммироваться, образовывать новый сигнал или один из сигналов может доминировать над другими, проявляя эпистатический эффект (Miller et al., 2008).

Основными компонентами сигнальной системы с участием АФК являются АФК-продукция, АФК-восприятие и АО, АФК-устраняющая система (Mittler et al., 2004). Амплитуда и продолжительность СОВ в первую очередь зависят от АО активности клеток и их физиологического состояния. Регуляция уровня содержания АФК СОВ (рис. 1, 2) может также включать в себя позитивную и отрицательную обратную взаимосвязь, направленную как на стрессорное образование АФК с участием НАДФН-оксидазы и других систем, так и на устранение АФК с помощью АО системы клетки, как это происходит при других видах стрессов у *A. thaliana*.

Салициловая кислота и оксид азота также могут быть вовлечены в амплификацию АФК (Колупаев, Карпец, 2010). АФК, через генерацию Ca^{2+} сигналов, могут активировать редокс-чувствительный белок ОХП и митоген-активированный протеинкиназный каскад, что приводит к активации различных транскрипционных факторов, которые регулируют продукцию или устранение АФК. В клетках АФК воспринимаются/акцептируются различными редокс-чувствительными сенсорами. Предполагается, что существует по меньшей мере три механизма восприятия АФК: с помощью АФК-рецепторов; редокс-чувствительных транскрипционных факторов и фосфатаз (Mittler et al., 2004). Однако в целом механизмы восприятия АФК еще мало изучены.

СОВ не всегда легко зарегистрировать, так как АФК являются неустойчивыми, короткоживущими и высокореакционными молекулами (радикалами), поэтому существуют многие методические ограничения при определении содержания и типа АФК (Halliwell, Whiteman, 2004). В наших исследованиях раннее стрессорное увеличение содержания АФК достоверно определялось посредством метода регистрации СХЛ от интактных клеток (рис. 1, 2).

АФК также вызывают посттрансляционную модификацию белков, особенно посредством окисления сульфгидрильных групп, что приводит к изменению их структуры и функции. Взаимодействие между содержанием АФК, редокс потенциалом клетки и структурой и функцией редокс-чувствительных белков может осуществляться посредством так называемых «тиоловых переключателей» (sulfur switches), которые участвуют во многих процессах регуляции метаболизма клетки (Kemp et al., 2008).

Следует отметить, что раннее увеличение содержания АФК СОВ, включая H_2O_2 , хорошо регистрируется методом СХЛ от живых клеток, даже в первые минуты стресса (рис. 1, 2), в то время как увеличение содержания одного из конечных продуктов ПО, тиобарбитуровой кислоты активных продуктов (ТБКАП), выявляется только на более поздних стадиях оксидативного стресса. При высоких дозах воздействий увеличение СХЛ обычно происходит одновременно с накоплением ТБКАП, однако при более умеренных воздействиях вначале происходит увеличение интенсивности СХЛ, а затем через некоторое время и ТБКАП, что наверное

РАННЕЕ УВЕЛИЧЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ

позволяет относительно условно отличить так называемую «сигнальную компоненту СОВ» от окислительно-деструктивных процессов ПО (Жадько, 2010 а, б).

Выявленные нами изменения при обоих видах стрессов имеют, в общем, схожие закономерности в динамике образования АФК и АФК-зависимом увеличении активности АП и Кат, однако их молекулярные механизмы должны иметь свою стресс-специфичность. В частности, при действии осмотика ПЭГ и окислителя H_2O_2 , в механизм развития СОВ и образования АФК могут вовлекаться различные процессы и субстраты ПО в различных компартментах клетки и эти АФК, соответственно, могут индуцировать различные специфические стресс-ответы.

Таким образом, в листьях *A. thaliana* при ПЭГ-индуцируемом осмотическом и окислительном стрессах в первые минуты происходит раннее стрессорное увеличение содержания АФК в процессе развития СОВ, и затем эти АФК, в частности H_2O_2 , как вторичный мессенджер, вызывает АФК-зависимое увеличение активности АП и Кат, что имеет важное значение в повышении общей АО активности клеток для предотвращения дальнейшего развития в них окислительной деструкции.

ЛИТЕРАТУРА

- Барабой В.А., Жадько С.И. Ранние изменения интенсивности спонтанной хемилюминесценции корней проростков гороха при гипергравитации // Доповіді АН України. – 1992. – № 7. – С. 156-158.
- Жадько С.И. Стрессорное АФК-зависимое увеличение активности пероксиредоксина, тиоредоксина и тиоредоксин редуктазы в клетках культуры ткани *Arabidopsis thaliana* при действии полиэтиленгликоля и пероксида водорода // Доповіді НАН України. – 2010. – № 1. – С. 159-163.
- Жадько С.И. H_2O_2 -зависимая экспрессия митохондриального пероксиредоксина и его роль в реакции клеток культуры ткани *Arabidopsis thaliana* при действии полиэтиленгликоля и окислительно-го стресса // Доповіді НАН України. – 2010. – № 3. – С. 171-174.
- Колунаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров. – Киев: Основа, 2010. – 350 с.
- Плохинский Н.А. Биометрия. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1970. – 367 с.
- 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.
- Dietz K.-J. Redox signal integration: from stimulus to networks and genes // Physiol. Plant. – 2008. – V. 133. – P. 459-468.
- Dietz K.-J., Jacob S., Oelze M.-L., Laxa M., Tognetti V., Marina S., Miranda N., Baier M., Finkemeier I. The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism // J. Exp. Bot. – 2006. – V. 57, № 8. – P. 1697-1709.
- Foyer C. H., Noctor N. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria // Physiol. Plant. – 2003. – V. 119. – P. 355-364.
- Halliwell B., Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? // Brit. J. Pharmacol. – 2004. – V. 142. – P. 231-255.
- Kemp M., Go Y.-M., Jones D.P. Non-equilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: A perspective on redox systems biology // Free Radical Biol. Med. – 2008. – V. 44. – P. 921-937.
- Maksymiec W., Krupa Z. The effects of short-term exposition to Cd, excess Cu ions and jasmonate on oxidative stress appearing in *Arabidopsis thaliana* // Environ. Exp. Bot. – 2006. – V. 57. – P. 187-194.
- Miller G., Shulaev V., Mittler R. Reactive oxygen signaling and abiotic stress // Physiol. Plant. – 2008. – V. 133. – P. 481-489.
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Breusegem F.V. Reactive oxygen gene network of plants // Trends Plant Sci. – 2004. – V. 9, №10. – P. 490-498.
- Santos C.V., Rey P. Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response // Trends Plant Sci. – 2006. – V. 11, №7. – P. 329-334.

Поступила в редакцию
26.09.2012 г.

ЖАДЬКО

**EARLY INCREASING IN CONTENT OF REACTIVE OXYGEN SPECIES
AND ASCORBAT PEROXIDASE AND CATALASE ACTIVITIES IN LEAVES OF
ARABIDOPSIS THALIANA PLANTS UNDER OSMOTIC AND OXIDATIVE STRESSES**

S. I. Jadko

*M.G. Kholodny Institute of Botany of
National Academy of Sciences of Ukraine
(Kyiv, Ukraine)*

Early changes in content of reactive oxygen species (ROS) and ascorbat peroxidase (AP) and catalase (Cat) activities in leaves of *Arabidopsis thaliana* plants under osmotic and oxidative stresses have been investigated. It was found that under these stresses in first minutes increasing of ROS content in a process of development of stress oxidative burst (SOB) take place. Than, these ROS of SOB, as second messengers, induce of ROS-dependent increasing of ascorbat peroxidase and catalase activities.

Key words: *Arabidopsis thaliana, reactive oxygen species, ascorbat peroxidase, catalase, osmotic and oxidative stress*

**РАННЄ ЗБІЛЬШЕННЯ ВМІСТУ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ
ТА АКТИВНОСТІ АСКОРБАТПЕРОКСИДАЗИ І КАТАЛАЗИ У ЛИСТКАХ
РОСЛИН *ARABIDOPSIS THALIANA* ПРИ ОСМОТИЧНОМУ
ТА ОКСИДАТИВНОМУ СТРЕСАХ**

С. І. Жадько

*Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного
Національної академії наук України
(Київ, Україна)*

Вивчали ранні зміни вмісту активних форм кисню (АФК) та активності аскорбатпероксидази (АП) і каталази (Кат) у листках рослин *Arabidopsis thaliana* при осмотичному та оксидативному впливах. Встановлено, що за дії цих стресорів в перші хвилини відбувається збільшення вмісту АФК в процесі розвитку стресорного оксидативного спалаху (СОС). Далі, ці АФК СОС, як вторинні месенджери, спричиняють збільшення активності АП та Кат.

Ключові слова: *Arabidopsis thaliana, активні форми кисню, аскорбатпероксидаза, каталаза, осмотичний та оксидативний стресс*