

УДК 581.198:546.215

І. І. Панчук, канд. біол. наук, доц.

Чернівецький національний університет, біологічний факультет,
кафедра молекулярної генетики та біотехнології
вул. Кошубинського, 2, 58000, м. Чернівці; тел. 0372-584793,
e-mail: panchuki@chv.ukrpack.net

ПРОДУКЦІЯ ТА РОЗЩЕПЛЕННЯ ПЕРОКСИДУ ВОДНЮ СУСПЕНЗІЙНОЮ КУЛЬТУРОЮ *ARABIDOPSIS THALIANA*

Суспензійна культура клітин *Arabidopsis thaliana* здатна ефективно розщеплювати екзогенно доданий пероксид водню в концентрації до 5 мМ. Вища концентрація пероксиду (50 мМ) викликає залежну від часу інактивацію антиоксидантних ферментів. Запропонована експериментальна модель може бути використана для вивчення довготривалого впливу пероксиду водню.

Ключові слова: антиоксидантні ферменти, *Arabidopsis thaliana* суспензійна культура клітин, пероксид водню

Постійна продукція пероксиду водню та інших активних форм кисню (АФК), таких як супероксид- та гідроксидрадикали та синглетний кисень є невід'ємними складовими метаболізму всіх аеробних організмів. За нормальних умов у клітині існує баланс між продукцією та розпадом АФК. Проте за дії абіотичних та біотичних стресових факторів цей баланс порушується, зокрема внаслідок надлишкової продукції АФК у електрон-транспортних ланцюгах хлоропластів та мітохондрій. Надмірне зростання концентрації АФК призводить до ушкодження клітинних компонентів внаслідок окиснення білків, ДНК та мембранних ліпідів [1, 2, 3]. Водночас АФК, зокрема пероксид водню, є сигнальними молекулами, що необхідні для активації антистресових генів [4–7].

Вивчення ролі пероксиду водню у рослинній клітині ускладнюється тим, що екзогенний пероксид важко проникає у інтактні рослини. Тому деякі автори використовують для досліджень суспензійну культуру клітин [8, 9, 10]. Проте залежність ефектів, які викликає пероксид водню при додаванні до культури клітин від концентрації, часу обробки, фази росту культури та інших параметрів вивчені недостатньо, що ускладнює порівняння результатів, отриманих у різних лабораторіях. У зв'язку з цим у даній роботі вивчається здатність суспензійної культури клітин *Arabidopsis thaliana* до розщеплення пероксиду водню залежно від його концентрації у поживному середовищі.

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження була суспензійна культура *A. thaliana* (екотип Landsberg). Суспензійну культуру вирощували у стерильних умовах на поживному середовищі Мурасіге і Скуга [11] із додаванням 3% цукрози, 0,5 мкг/мл нафтилоцтової кислоти, 0,05 мкг/мл кінетину, рН 5,7. Три мл семиденної суспензійної культури додавали до 97 мл свіжого середовища та культивували при 20 °С за постійного освітлення (3000 люмен/м²) на роторній качалці (60 обертів/хв). Для досліджень використовували культуру, яка знаходилась у експоненційній фазі росту (3–4 день від початку культивування). Перед почат-

ком досліду культуру розводили свіжим середовищем до густини клітин близько 0,02 г сирої ваги/мл суспензії. Після преінкубації протягом 90 хв за стандартних умов культивування відбирали аліквоти суспензійної культури об'ємом по 20 мл, які використовували у подальших дослідах. Культивування клітин у присутності пероксиду водню здійснювали в умовах темряви. Концентрацію пероксиду водню у культуральній рідині визначали колориметрично, застосовуючи набір PeroxiDetect Kit (Sigma). Експерименти проводили у чотирьох біологічних повторностях. Отримані результати обробляли методом варіаційної статистики з використанням t-критерію Стьюдента.

Результати та їх обговорення

Через 2 години після початку досліду у поживному середовищі спостерігається поява пероксиду водню у концентрації 1,7 мкМ (рис. 1). Ця концентрація залишається практично незмінною після 4-х - годинного культивування при 20 °С. Це свідчить про те, що клітини *A. thaliana* здатні виділяти пероксид водню у поживне середовище. За умов теплового стресу (37 °С) у порівнянні з кімнатною температурою виділення клітинами пероксиду водню у середовище зростає у 1,3 та 2,7 раз відповідно після 2 та 4 годин культивування. Поясненням цього може бути те, що тепловий стрес призводить до підвищення рівня пероксиду водню в клітині.

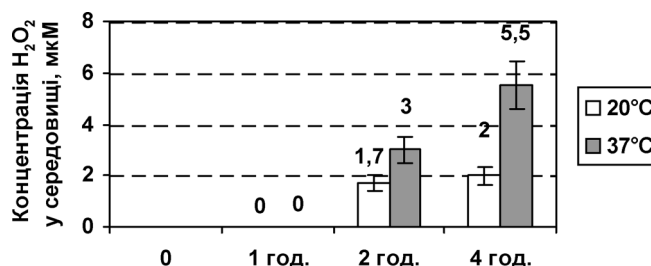
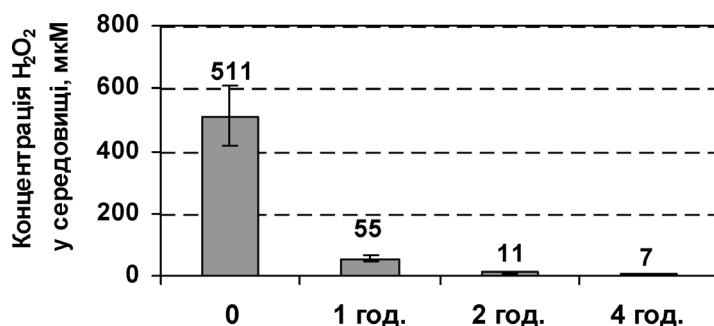


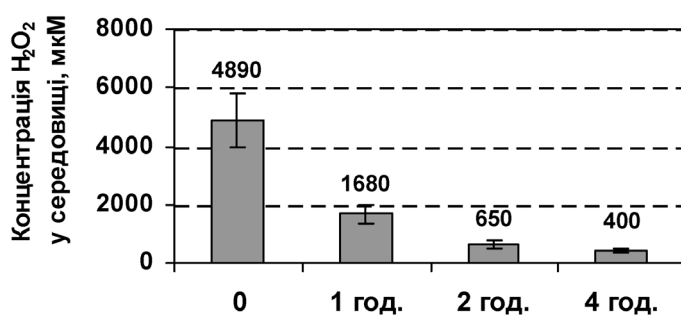
Рис. 1. Секреція пероксиду водню у культуральну рідину клітинами суспензійної культури *Arabidopsis thaliana* при кімнатній температурі та за умов теплового стресу (37 °С)

Для визначення здатності клітини розщеплювати пероксид водню до суспензійної культури додавали пероксид водню до кінцевої концентрації 0,5; 5 та 50 мМ (рис. 2). При застосуванні низької концентрації (0,5 мМ) вже через 1 годину спостерігалось зменшення кількості пероксиду водню приблизно у 9 разів. Отже, період напіврозпаду пероксиду водню протягом першої години становив близько 20 хв. Протягом другої години вміст пероксиду водню у середовищі падав ще у 5 разів, а через чотири години концентрація пероксиду водню знижувалась у 73 рази порівняно з початковою і лише в 3 рази перевищувала рівень, зафіксований за культивування клітин без додавання пероксиду водню (рис. 1). В контрольних зразках без клітин *A. thaliana* саморозклад пероксиду водню складав 5–10% через 4 години.

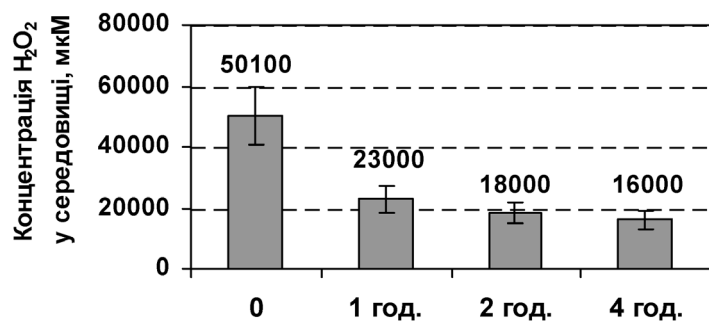
При використанні в досліді середньої концентрації пероксиду водню (5 мМ) абсолютна швидкість його розщеплення була більшою, ніж у попередніх досліді, але період напіврозпаду протягом 1–2 годин збільшувався до 40 хв. При подальшому культивуванні розщеплення пероксиду водню суттєво сповільнювалось, що може вказувати на інактивацію антиоксидантних ферментів надлишком цієї сполуки.



a



б



в

Рис. 2. Розщеплення екзогенного пероксиду водню (a — 0.5 мМ; б — 5 мМ; в — 50 мМ H₂O₂) клітинами суспензійної культури *Arabidopsis thaliana*. Досліди проводили при кімнатній температурі у темряві

Ефект виснаження антиоксидантних систем став більш очевидним при культивуванні клітин у присутності 50 мМ пероксиду водню. Його концентрація протягом першої години зменшувалась лише у 2 рази, а протягом другої години — ще у 1,3 рази. Після цього клітини майже втрачали здатність розщеплювати пероксид водню, і фактично спостерігався лише його саморозпад (рис. 2 в).

Очевидно, що розщеплення пероксиду водню відбувається всередині клітин. Проте а рїогї не можна відкинути можливість, що клітини можуть видїляти у середовище культивування ферменти або низькомолекулярні антиоксиданти, які елімінують пероксид водню. Ця можливість була перевірена експериментально. Для цього клітини *A. thaliana* культивували протягом однієї години в умовах темряви, після чого осаджували центрифугуванням. Пероксид водню додавали у вільний від клітин супернатант і до клітин, ресуспендованих у свіжому поживному середовищі, після чого проби інкубували протягом однієї години. Зменшення концентрації пероксиду водню спостерїгалось тільки в присутності клітин (рис. 3). На відміну від цього, у супернатанті та у контролі розпаду пероксиду водню не спостерїгалось, що свідчить про внутрішньоклітинну природу цього процесу.

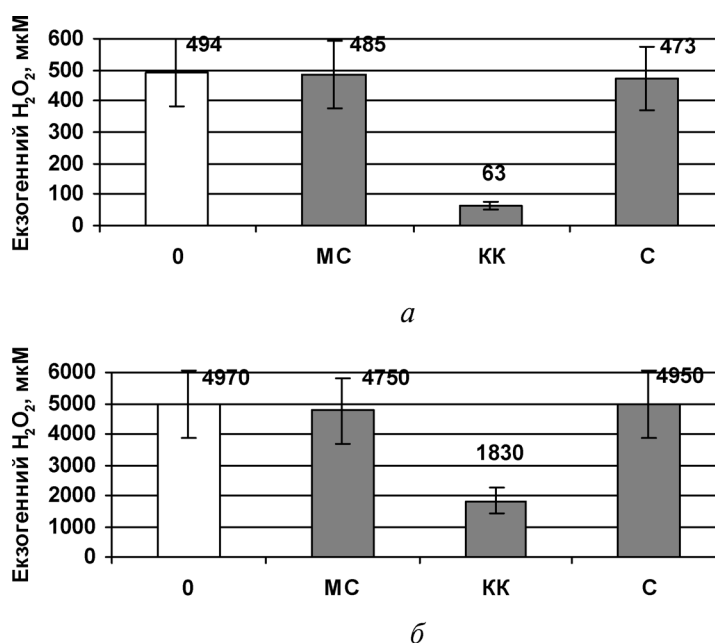


Рис. 3. Зміни концентрації пероксиду водню, доданого до культури клітин *A. thaliana* (КК), до свіжого поживного середовища (МС) та супернатанту (С); інкубацію проводили протягом 1 год. 0 – вміст пероксиду водню безпосередньо після додавання

Раніше було показано, що обробка клітин *A. thaliana* пероксидом водню у концентрації 20 мМ і вище індукує програмовану смерть клітин приблизно через 1 годину [10]. Отримані нами результати узгоджуються з цим спостереженням. При вивченні суспензії культури, яка знаходилась у стаціонарній фазі і мала високу густину клітин (0,2 г/мл), раніше було встановлено [8], що період напіврозпаду пероксиду водню в таких умовах становить лише 2–5 хв, що дозволяє вивчати короткочасні ефекти впливу пероксиду водню на клітини *A. thaliana*. На відміну від цього, у наших дослідженнях було застосовано культуру у експотенційній фазі з приблизно у 10 раз нижчою густиною клітин. Це дозволило досягти більших значень періоду напіврозпаду пероксиду водню, що є необхідним для вивчення більш довготривалих фізіологічних ефектів.

Висновки

Суспензійна культура клітин *A. thaliana*, яка знаходиться у експоненційній фазі росту володіє здатністю ефективно розщеплювати екзогенний пероксид водню у діапазоні концентрацій до 5 мМ, тоді як при концентрації 50 мМ спостерігається швидка інактивація антиоксидантних систем клітин. Запропонований експериментальний дизайн є оптимальним для вивчення довготривалих впливів пероксиду водню на клітини *A. thaliana*.

Література

1. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // Trends Plant Sci. 2002. – Vol. 7. – P. 405–410.
2. Moller I. M. Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species // Annual Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 2001. – Vol. 52. – P. 561–591.
3. Panchuk I., Pyrizhok R., Volkov R. Engineering of new plant cultivars with improved abiotic stress tolerance // Ann. Suceava Univ. – 2007. – Vol. 6, N 1. – P. 25–35.
4. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses / J. Dat, S. Vandenbeebe, E. Vranova et al. // Cell. Mol. Life Sci. – 2000. – Vol. 57. – P. 779–795.
5. Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants / Y. Kovtun, W.-L. Chiu, G. Tena et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA – 2000. – Vol. 97. – P. 2940–2945.
6. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants / S. Neill, R. Desikan, A. Clarke et al. // J. Exp. Bot. – 2002. – Vol. 53. – P. 1237–1247.
7. Noctor G., Valijovic-Jovanovic S., Foyer C. H. Peroxide processing in photosynthesis: antioxidant coupling and redox signaling // Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. – 2000. – Vol. 355. – P. 1465–1475.
8. Generation of active oxygen in elicited cells of *Arabidopsis thaliana* is mediated by a NADPH oxidase-like enzyme / R. Desikan, J. T. Hancock, M. J. Coffey et al. // FEBS Lett. 1996. – Vol. 382. – P. 213–217.
9. Harpin and hydrogen peroxide induce the expression of a homologue of gp91-phox in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures / R. Desikan, E. C. Burnett, J. T. Hancock et al. // J. Exp. Bot. – 1998. – Vol. 49. – P. 1767–1771.
10. Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have different effects on gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures / R. Desikan, A. Reynolds, J. T. Hancock et al. // Biochem. J. – 1998. – Vol. 330. – P. 115–120.
11. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15. – P. 437–497.

И. И. Панчук

Черновицкий национальный университет им. Ю. Федьковича,
биологический факультет, кафедра молекулярной генетики и биотехнологии,
ул. Коцюбинского, 2, 58000, г. Черновцы; тел. (0372)-584793,
e-mail: panchuki@chv.ukrpack.net

ПРОДУКЦИЯ И РАСЩЕПЛЕНИЕ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА В СУСПЕНЗИОННОЙ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЕ *ARABIDOPSIS THALIANA*

Резюме

Суспензионная клеточная культура *Arabidopsis thaliana* обладает способностью эффективно расщеплять экзогенно добавленную перекись водорода в концентрации до 5 мМ. Более высокие концентрации (50 мМ) вызывают зависимую от времени инактивацию антиоксидантных ферментов. Предложенная экспериментальная модель может быть

использована для изучения длительного воздействия перекиси водорода на растительные клетки.

Ключевые слова: антиоксидантные ферменты, *Arabidopsis thaliana*, суспензионная клеточная культура, перекись водорода.

I. I. Panchuk

University of Chernivtsy, Dept. of Molecular Genetics and Biotechnology
Kotsubinsky str. 2, 58000 Chernivtsy, Ukraine; Tel. (0372)-584793,
e-mail: panchuki@chv.ukrpack.net

HYDROGEN PEROXIDE PRODUCTION AND SCAVENGING IN SUSPENSION CELL CULTURE OF *ARABIDOPSIS THALIANA*

Summary

Arabidopsis thaliana suspension cell culture is able to effectively split exogenously added hydrogen peroxide at concentrations up to 5 mM. However, higher concentration (50 mM) results in time-dependent inactivation of antioxidative enzymes. Proposed experimental design can be used for investigation of the long-term effects of hydrogen peroxide.

Key words: antioxidative enzymes, suspension cell culture, hydrogen peroxide.