

## УЧАСТЬ КАЛЬЦІЄВОЇ СИГНАЛЬНОЇ СИСТЕМИ У СТРЕСОВИХ РЕАКЦІЯХ МОХІВ

ОКСАНА ВАСИЛІВНА ЛОБАЧЕВСЬКА

ІРИНА ВАСИЛІВНА МЕЛЬНИК

Лобачевська О. В., Мельник І. В. Участь кальцієвої сигнальної системи у стресових реакціях мохів // Наукові основи збереження біотичної різноманітності. – 2010. – Том 1 (8), № 1. – С. 293-306. – ISSN 2220-3087.

Досліджено вплив екзогенного хлориду кальцію на формування адаптивних реакцій гаметофіту мохів *Funaria hygrometrica* Hedw. і *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid. у стресових умовах: високих концентрацій важких металів, температурного і осмотичного шоку. Установлений взаємозв'язок між змінами кальцієвого статусу клітин і утворенням активних форм кисню (АФК) у клітинах мохів.  $\text{Ca}^{2+}$ -залежне утворення АФК індукувало захисні реакції клітин з участю антиоксидантних ферментів: супероксиддисмутази (СОД), каталази та пероксидази. Показано, що блокатор кальцієвих каналів  $\text{LaCl}_3$  знижував вплив екзогенного кальцію. Зроблено припущення, що  $\text{Ca}^{2+}$  і АФК об'єднують сигнальні системи клітин мохів, які ініціюють розвиток толерантності.

**Ключові слова:** екзогенний кальцій, блокатор кальцієвих каналів, стресові реакції, антиоксидантний захист, мохоподібні

Кальцій, як універсальний внутрішньоклітинний месенджер, бере участь у регуляції різноманітних стресових реакцій рослинних клітин, у тому числі, зміні про/антиоксидантної рівноваги. Іони кальцію не лише діють через різні сигнальні системи, а й безпосередньо впливають на активність ферментів.  $\text{Ca}^{2+}$ -залежними вважають як прооксидантні ферменти (НАДФ·Н-оксидаза, фенолпероксидаза), так і антиоксидантні (СОД, каталаза, аскорбатпероксидаза). Літературні дані свідчать про взаємозв'язок між стійкістю рослин до стресових чинників і високою активністю антиоксидантної системи захисту, тобто підвищеною здатністю клітин і тканин знешкоджувати активні форми кисню (АФК) (Бараненко, 2006). Окрім того, відомо, що сигнальна система кальцію індукує захисні реакції, тобто в певних умовах посилює генерацію АФК, зокрема супероксидного радикалу й пероксидів, і надалі активує інші антиоксидантні сигнальні системи (Карпець, Колупаєв, 2008).

У дослідженнях застосовували передстресову обробку рослин розчином хлориду кальцію, який індукує процеси перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) утворення АФК. Відомо, що кальцій взаємодіє з полярними групами фосфоліпідів, підвищуючи стабільність білків і мембранних комплексів, в інших випадках він посилює пероксидацію ліпідів та активує АФК-елімінуючі ферменти. Для того, щоб переконатися, що вплив екзогенного кальцію зумовлений проникненням його клітини через кальцієві канали, використовували блокатор кальцієвих каналів усіх типів – хлорид лантану, у розчині якого рослини інкубували до перенесення у середовище з  $\text{Ca}^{2+}$ .

Метою досліджень було проаналізувати вплив екзогенного кальцію на формування адаптивних реакцій до стресових чинників – іонів важких мета-

лів (свинцю, кадмію, нікелю), осмотичного й температурного шоку гаметофіту *Funaria hygrometrica* Hedw. і *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid. у зв'язку зі змінами прооксидантно-антиоксидантного статусу їхніх клітин.

### Матеріали та методика досліджень

У роботі використовували стерильну культуру мохів *Funaria hygrometrica* та *Ceratodon purpureus*, яку вирощували зі спор на агаризованому середовищі Кнопа в контрольованих умовах освітлення (2,5-3,0 тис. лк), температури (+20-+22 °С) та вологості (85-90%).

Аналізували вплив екзогенного кальцію (16 мкМ) та іонів важких металів (4,0 мкМ  $Pb^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  та 0,4 мкМ  $Cd^{2+}$ ) на ріст і розвиток протонеми мохів: темпи поділу апікальних клітин, довжину протонемних ниток і швидкість їх росту. Для визначення впливу екзогенного кальцію застосовували 18-годинну перед- та післястресову обробку пагонів моху розчином хлориду кальцію. У дослідах використовували блокатор кальцієвих каналів – 0,5 мМ розчин хлориду лантану, в якому рослини інкубували 1 год до перенесення в середовище з  $Ca^{2+}$ .

Вплив екзогенного кальцію на активність антиоксидантного захисту *F. hygrometrica* аналізували в умовах осмотичного шоку, який індукували 10% і 30% розчином поліетиленгліколю (ПЕГ-6000) протягом 2, 4 та 6 год. Холодовий та тепловий шок створювали, витримуючи рослини у ванні термостату за +4 і +42 °С. У контролі пагони витримували в дистильованій воді (за +23 °С) без додавання солей важких металів та ПЕГ.

Вплив екзогенного пероксиду водню (10,0 і 100,0 мМ, 2 год) на активність СОД *F. hygrometrica* аналізували за стресової дії іонів кадмію (0,4 мкМ, 48 год). Для з'ясування можливості індукції  $Ca^{2+}$ -залежних сигнальних систем пероксидом водню застосовували екзогенний  $H_2O_2$  у поєднанні з модифікатором кальцієвого статусу – 0,5 мМ розчином хлориду лантану. Утворення супероксидного радикалу визначали двома методами: за відновленням нітротетразолію синього (НТС) в середовищі інкубації інтактних гаметофорів (*in vivo*) та за відновленням НТС гомогенатами тканин (*in vitro*) (Колупаєв, Карпец, 2005).

Для визначення активності СОД гаметофори моху гомогенізували в 0,15 М фосфатному буфері (рН 7,8) і після 30 хв інкубації за кімнатної температури центрифугували. До супернатанту додавали інкубаційну суміш (ЕДТА, нітросиній тетразолій, феназинметасульфат, НАДФН). Активність ферменту визначали спектрофотометрично за довжини хвилі 540 нм та виражали в умовних одиницях на мг білка за хвилину (Чевари, Андял, Штрэнгер, 1991). Концентрацію білка визначали за методом Бредфорда (Bredford, 1976).

Активність пероксидази визначали після екстракції в 0,2 М ацетатному буфері (рН 5,4). Після центрифугування гомогенату 30 хв за 5000 об./хв активність ферменту визначали спектрофотометрично за  $\lambda = 420$  нм у присутності бензидину та 3%  $H_2O_2$ . Активність ферменту виражали у відносних одиницях на 1 г сирової маси за хвилину (Методы ..., 1987).

Для екстракції каталази зразки гаметофорів гомогенізували в 0,05 М трис-НСІ буфері (рН 7,8). Екстракт центрифугували 15 хв за 5000 г. Активність ферменту визначали спектрофотометрично у супернатанті після 10 хв реакції з 4% розчином молібдату амонію за довжини хвилі 410 нм та виражали в мкат/л (Королюк, Иванова, Майорова, Токарев, 1986).

Усі досліди проводили не менше 3-5 разів, отримані дані опрацьовували методами статистичного аналізу (Плохинский, 1970).

### Результати досліджень та їх обговорення

Досліджено вплив екзогенного кальцію (16 мкМ) та іонів важких металів (4,0 мкМ  $Pb^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  та 0,4 мкМ  $Cd^{2+}$ ) на ріст і розвиток протонеми *C. purpureus* (рис. 1) та *F. hygrometrica* (рис. 2): темпи поділів апікальних клітин, швидкість росту та довжину протонемних столонів. Установлено, що свинець, як і кадмій, пригнічує ріст протонеми унаслідок гальмування поділу клітин і впливає на довжину субапікальних клітин. Якщо кальцій додавали до середовища зі свинцем, тоді відзначали істотні зміни у видовженні та поділі апікальних клітин: у *F. hygrometrica* довжина протонеми й швидкість поділів збільшилася майже в 1,5 рази, а в *C. purpureus* – у 2,5 рази, порівняно з контролем. Під впливом іонів нікелю особливо видовжувалися ризоїдні клітини, але їх кількість не збільшувалася. Показано, що за сумісної дії іонів кальцію та нікелю посилювався розвиток хлоронеми внаслідок видовження клітин та незначного збільшення їх кількості. У дослідах з *C. purpureus* (рис. 1) іони нікелю, порівняно з іншими металами, найбільше пригнічували ріст і поділ клітин протонеми, відповідно протекторна дія кальцію виявилася найслабшою.

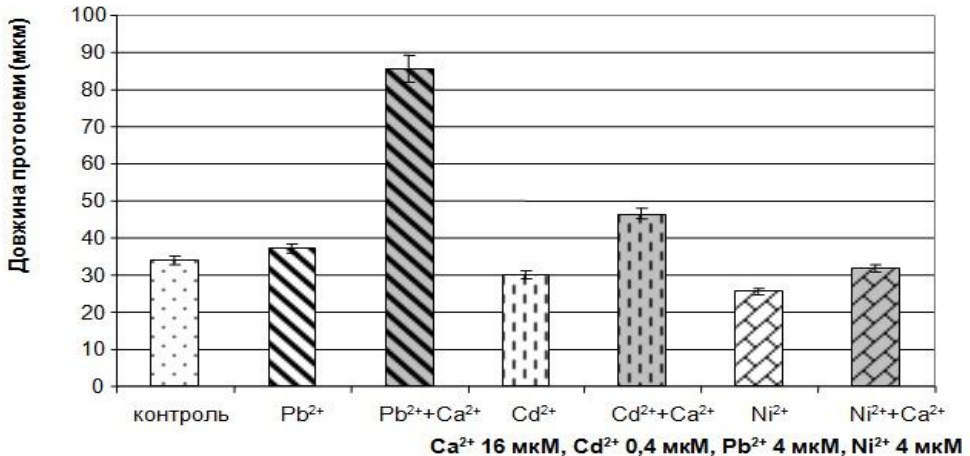


Рис. 1. Вплив іонів кальцію і важких металів на ріст протонеми *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid.

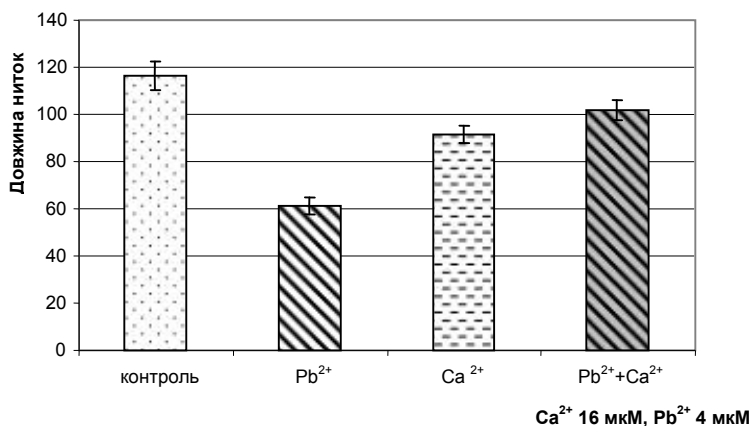


Рис. 2. Вплив свинцю та кальцію на ріст протонеми *Funaria hygrometrica* Hedw.

Проаналізовано вплив екзогенного хлориду кальцію на генерацію супероксидного радикалу в *F. hygrometrica*. Установлено, що важкі метали індукували утворення супероксиду (рис. 3) та розвиток оксидативного стресу. Під впливом екзогенного кальцію рівень АФК, а саме, вміст O<sub>2</sub><sup>-</sup>, підвищувався в 1,4-2,0 рази, ніж за дії лише металів. Можливо, що зміщення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги внаслідок посилення оксидативного стресу відіграє роль сигналу для запуску захисних реакцій рослинних клітин за токсичної дії металів, які модифікують рівень антиоксидантного захисту – активності СОД, пероксидази та каталази.

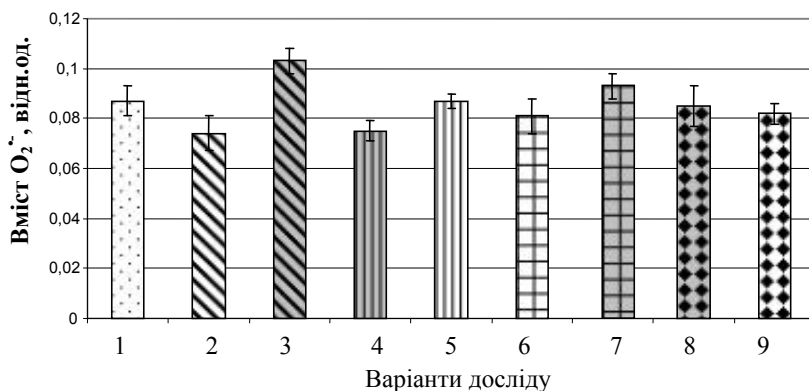


Рис. 3. Вплив хлориду лантану на індуковану Ca<sup>2+</sup> генерацію супероксидного радикалу у *Funaria hygrometrica* Hedw. в умовах стресу: 1 – контроль (дистильована вода); 2, 6 – 0,1 і 1 мкМ Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> відповідно; 3, 7 – 2,5 мМ Ca<sup>2+</sup> + (0,1 і 1 мкМ) Pb<sup>2+</sup>; 4, 8 – 0,5 мМ La<sup>3+</sup> + 2,5 мМ Ca<sup>2+</sup> + (0,1 і 1 мкМ) Pb<sup>2+</sup>; 5, 9 – 0,5 мМ La<sup>3+</sup> + (0,1 і 1 мкМ) Pb<sup>2+</sup>.

Без сумніву, нагромадження АФК є важливим сигналом для реалізації впливу екзогенного кальцію на стійкість рослин. Імовірно, що саме під впли-

вом помірного оксидативного стресу, спричиненого  $\text{Ca}^{2+}$ , рослинні клітини стають компетентними до подальшого стресу, активуючи підвищення активності ферментів-антиоксидантів, синтез білків та нагромадження низькомолекулярних протекторів.

Ефекти підвищення стійкості рослин, спричинені екзогенним  $\text{Ca}^{2+}$ , пов'язують, передусім, з його здатністю індукувати нагромадження в рослинах АФК, які є інтермедіатами, що дифундують у внутрішньоклітинному середовищі, забезпечуючи сигнальний каскад для індукції експресії генів та антиоксидантного захисту (Карпець, Колупаєв, 2008).

Первинною стрес-реакцією на збільшення АФК, насамперед радикалів супероксиду як джерела їх утворення, є активація СОД, що забезпечує захист клітин від окислювальної деструкції. Крім АФК, у регуляції активності СОД беруть участь й іони кальцію. Встановлено, що збільшення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозолі клітин є однією з умов активації ферменту в листках кукурудзи (Бараненко, 2006). Проте відзначено, що обробка рослин райграсу розчином хлориду кальцію на активність СОД не впливала, хоч і призводила до збільшення концентрації внутрішньоклітинного кальцію. Отже, літературні дані про участь кальцію в регуляції СОД є суперечливими й потребують подальшого дослідження.

На підставі результатів дослідження встановлено активуючу дію екзогенного кальцію на активність СОД (рис. 4) у дослідах із перед- та післястресовою інкубацією гаметофорів *F. hygrometrica* в розчині хлориду кальцію. За спільного впливу іонів свинцю та кальцію активність ферменту істотно не змінювалася.

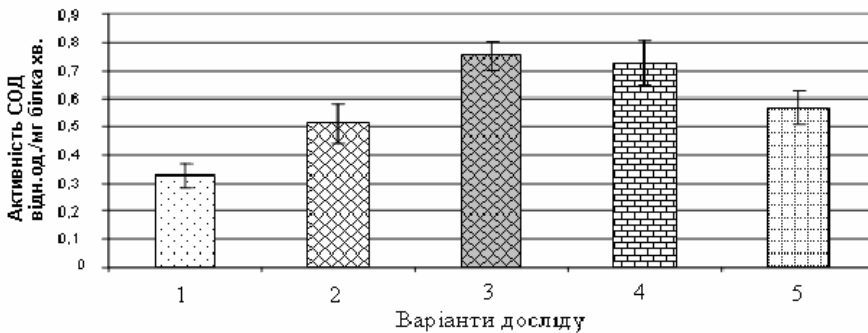


Рис. 4. Вплив перед- та післястресової інкубації у хлориді кальцію на активність СОД *Funaria hygrometrica* Hedw. в умовах стресу іонами свинцю: 1 – контроль (дистильована вода); 2 – 4 мкМ  $\text{Pb}^{2+}$ ; 3, 4 – перед- і післястресова обробка 16 мкМ  $\text{CaCl}_2$ ; 5 – спільний вплив  $\text{Ca}^{2+}$  із  $\text{Pb}^{2+}$ .

Під впливом  $\text{Ca}^{2+}$  відбулася попередня активація активності СОД – “загартування” внаслідок досягнення певного рівня оксидативного стресу, який посилювався під впливом свинцю. Причини зменшення активності СОД за

спільної дії  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{Pb}^{2+}$  можуть бути різноманітними, наприклад, зменшення пулу ферментів унаслідок посиленого їх використання для знешкодження радикалів  $\text{O}_2^-$ . Окрім того, зменшення активності СОД може бути наслідком сповільнення синтезу і/або підвищення деградації ізоформ ферменту. Зв'язані та вільні радикали  $\text{OH}^\cdot$ , спричиняючи окислювальну модифікацію амінокислотних послідовностей в активному центрі ферменту, можуть призводити до його інактивації та фрагментації (Casano, Gomes, Lascano et al., 1997). Отже, подальше збільшення продукції АФК спричиняє зменшення активності ферменту за стресових умов і сприяє розвитку окислювальної деструкції тканин рослин.

Для з'ясування зв'язку між передстресовою інкубацією розчині хлориду кальцію та проникненням  $\text{Ca}^{2+}$  у клітини аналізували спільний вплив блокатора кальцієвих каналів  $\text{LaCl}_3$  та екзогенного кальцію (рис. 5). Установлено, що хлорид лантану зменшував активуючу дію іонів  $\text{Ca}^{2+}$  на активність каталази і пероксидази у дослідях з вищою концентрацією  $\text{Cd}^{2+}$  (рис. 5, 6).

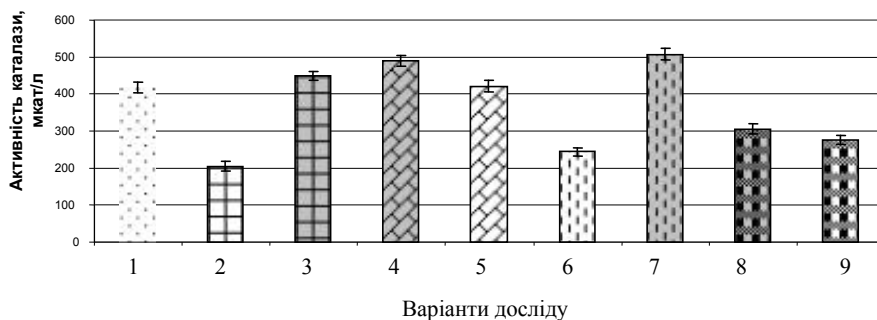


Рис. 5. Вплив блокатора кальцієвих каналів на антиоксидантну активність каталази *Funaria hygrometrica* Hedw. за дії іонів кадмію: 1 – контроль (дистильована вода); 2, 6 – 0,01 і 0,1 мкМ  $\text{Cd}^{2+}$  відповідно; 3, 7 – 2,5 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  + (0,01 і 0,1 мкМ)  $\text{Cd}^{2+}$ ; 4, 8 – 0,5 мМ  $\text{La}^{3+}$  + 2,5 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  + (0,01 і 0,1 мкМ)  $\text{Cd}^{2+}$ ; 5, 9 – 0,5 мМ  $\text{La}^{3+}$  + (0,01 і 0,1 мкМ)  $\text{Cd}^{2+}$ .

Унаслідок інкубації у хлориді кальцію перед внесенням у середовище сублетальної 0,1 мкМ концентрації хлориду кадмію активність каталази збільшувалася на 210%, під впливом хлориду лантану зменшувалася на 54,4%, а за спільної дії кальцію і лантану – на 60,1%, оскільки внаслідок блокування кальцієвих каналів зменшувався потік іонів кальцію у клітини та активність генерації АФК, зокрема пероксиду водню. Під впливом низької концентрації (0,01 мкМ) кадмію спільна дія іонів  $\text{La}^{3+}$  та  $\text{Ca}^{2+}$  навіть збільшувала активність ферментів-антиоксидантів, переважно пероксидази (рис. 6), тоді як під впливом 0,1 мкМ  $\text{Cd}^{2+}$  – значно зменшувала активність каталази (рис. 5). Однаково зберігалася тенденція до зменшення активності ферменту лише під впливом  $\text{La}^{3+}$  за обох концентрацій іонів кадмію. Отже, це підтверджує функ-

цію лантану як блокатора кальцієвих каналів і свідчить про залежність активності антиоксидантних ферментів від іонів  $\text{Ca}^{2+}$ .

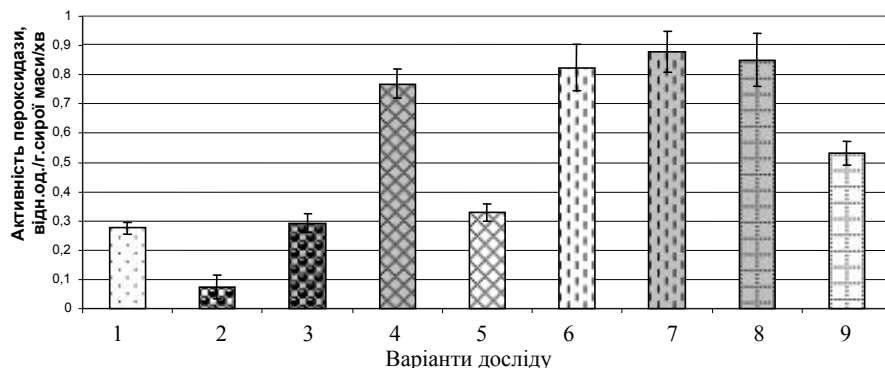


Рис. 6. Вплив іонів кальцію, лантану та кадмію на активність пероксидази *Funaria hygrometrica* Hedw.: 1 – контроль (дистильована вода); 2, 6 – 0,01 і 0,1 мкМ  $\text{Cd}^{2+}$  відповідно; 3, 7 – 2,5 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  + (0,01 і 0,1 мкМ)  $\text{Cd}^{2+}$ ; 4, 8 – 0,5 мМ  $\text{La}^{3+}$  + 2,5 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  + (0,01 і 0,1 мкМ)  $\text{Cd}^{2+}$ ; 5, 9 – 0,5 мМ  $\text{La}^{3+}$  + (0,01 і 0,1 мкМ)  $\text{Cd}^{2+}$ .

Отже, підвищення активності пероксидази пов'язане зі збільшенням умісту пероксиду водню і, мабуть, спричинене впливом іонів кальцію на НАДФН-оксидазу (Corpas, Barroso, del Rio, 2001; Sagi, Fluhr, 2006), яка має два кальційзв'язуючі сайти (Keller, Damude, Verner et al., 1998). Іншою мішенню кальцію могла бути іоннозв'язана пероксидаза клітинної стінки (Bakarjieva, Stefanov, Cristova, 2001; Колупаєв, Акинина, Мокроусов, 2005; Колупаєв, Карпец, 2005), яка значно активує утворення супероксидного радикалу й пероксиду водню (Bolwell, Davies, Gerrish et al., 1998).

Можна припустити, що іони кальцію впливають на активацію каталази (рис. 5) унаслідок збільшення його кількості в цитозолі та індукції АФК, зокрема  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Раніше було показано (Карпец, Колупаєв, 2008), що активності каталази під впливом екзогенного  $\text{Ca}^{2+}$  значною мірою пригнічував іонол – скевенджер АФК. Отже, оксидативний стрес, спричинений кальцієм, пов'язаний з активацією цитозольних ферментативних систем, які генерують АФК, та з впливом на ферменти плазмалеми або клітинної стінки.

Досліджено вплив преінкубації рослин у розчинах інгібіторів синтезу РНК (актиноміцину Д) і білків (циклогексиміду) на активність антиоксидантної системи (АОС) *F. hygrometrica* (рис. 7). Показано, що, порівняно з контролем, блокатори специфічного синтезу за стресової дії кадмію посилювали активність каталази під впливом актиноміцину Д на 133,5% і на 124% – за дії циклогексиміду.

Екзогенний кальцій спільно з актиноміцином Д посилював активність каталази на 151,9% і з циклогексимідом – на 141,1%. Установлено, що інгібітори мають захисний ефект за сублетальної концентрації  $\text{CdCl}_2$ , очевидно, унаслідок гальмування анаболітичних процесів метаболізму та попередження

розвитку самопошкодження клітин. Уважають, що гальмування трансляції під час стрес-реакції може зменшувати синтез рибонуклеаз, розплітаючих та інших, які спричиняють розпад мРНК (Chang Su-Chih, Gallie, 1997).

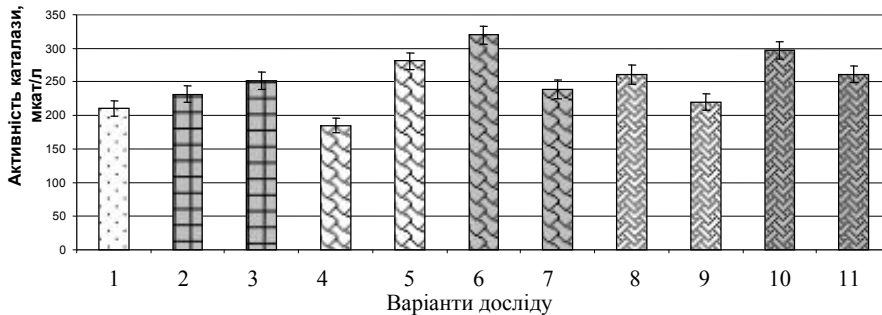


Рис. 7. Вплив преінкубації інгібіторами актиноміцином Д і циклогексимідом та іонами кальцію на активність каталази *Funaria hygrometrica* Hedw. за дії хлориду кадмію: 1 – контроль (дистильована вода); 2, 3 – 2,5 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  + (0,01 і 0,1 мкМ)  $\text{Cd}^{2+}$  відповідно; 4, 5 – 50 мг/л актиноміцину Д + (0,01 і 0,1 мкМ)  $\text{Cd}^{2+}$ ; 6, 7 – актиноміцину Д + 2,5 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  + (0,01 і 0,1 мкМ)  $\text{Cd}^{2+}$ ; 8, 9 – 0,5 мг/л циклогексиміду + (0,01 і 0,1 мкМ)  $\text{Cd}^{2+}$ ; 10, 11 – циклогексимід + 2,5 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  + (0,01 і 0,1 мкМ)  $\text{Cd}^{2+}$ .

Отже, під впливом захисного гальмування метаболізму інгібіторами синтезу нуклеїнових кислот (ДНК, РНК) і білка відбувалося не загальне гальмування обміну, а змінювалося співвідношення між інтенсивністю окремих процесів, можливо активувалися деякі катаболічні реакції внаслідок передстресового впливу хлориду кадмію. Відомо, що внаслідок гідролізу полімерів утворюються низькомолекулярні сполуки – протектори конформаційних змін макромолекул та інтеграції клітинного метаболізму, які й могли сприяти підвищенню антиоксидантного статусу.

Установлено, що в умовах осмотичного шоку відбувається поступове зменшення активності СОД в клітинах гаметофіту *F. hygrometrica* і лише вплив 30% розчину ПЕГ (6 год) спричиняв збільшення активності ферменту в 9,3 рази (рис. 8).

У рослинах, попередньо інкубованих у розчині хлориду кальцію та під час спільного впливу  $\text{Ca}^{2+}$  і ПЕГ, активність СОД збільшувалася пропорційно з тривалістю та інтенсивністю осмотичного стресу, порівняно з рослинами, що зазнали лише осмотичного впливу ПЕГ (рис. 8). Максимальна 12-кратна активація СОД відбувалася після інкубації у розчині  $\text{CaCl}_2$  під час тривалого інтенсивного шоку (6 год 30% ПЕГ). Мабуть, збільшення активності ферменту-антиоксиданту гальмувало нагромадження  $\text{O}_2^-$  і  $\text{H}_2\text{O}_2$ , підтримуючи стабільність клітинних стінок та мембран.

Отримані результати свідчать, що  $\text{Ca}^{2+}$  переважно активний перед утворенням АФК, а й після їх утворення функціональна активність кальцію була високою, що показано раніше у досліді з екзогенним кальцієм (рис. 4).



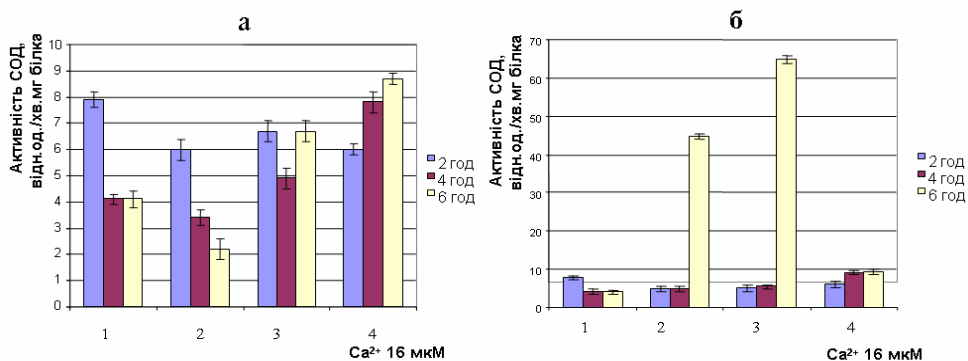


Рис. 8. Вплив осмотичного шоку та іонів кальцію на активність СОД *Funaria hygrometrica* Hedw.: 1 – контроль (дистильована вода); 2 – ПЕГ: 10% (а), 30% (б); 3 – інкубація в розчині CaCl<sub>2</sub>+10% ПЕГ(а), 30% ПЕГ (б); 4 – спільний вплив іонів Ca<sup>2+</sup> і ПЕГ.

Проаналізовано вплив низьких (+4 °С) і високих (+42 °С) температур та іонів кальцію на активність СОД *F. hygrometrica* протягом 2 і 4 год (рис. 9).

Відомо, що дія температурного шоку на рослини, як і вплив інших стресорів, супроводжується зміщенням окисно-відновного балансу – окислювальним стресом (Suzuki, Mittler, 2006). Загартовування рослин під дією різних температур супроводжується збільшенням термостабільності деяких білків, у т. ч. ферментів (Александров, 1985). У дослідженнях впливу гіпертермії на термостабільність ферментів частіше застосовується тривала дія на рослини високих температур.

Так, показано збільшення термостабільності нітратредуктази пшениці (Лютова, Каменцева, 2001) і кислої фосфатази гороху (Леонтьева, Левченкова, 1999) після впливу на рослини температур +41 °С-+43 °С протягом 2-3 год. Установлено, що теплостійкість тісно корелює з термостабільністю певних ферментів (Ивакин, Грушин, 1990). З деяких рослин вдалося виділити надзвичайно термостійкі форми СОД (Miszalski, Slesak, Niewiadomska et al., 1998; Khanna-Chopra, Sabarinath, 2004). Уважають, що підвищення термостабільності ферменту може регулюватися механізмами, не пов'язаними з біосинтезом білка, зокрема, унаслідок приєднання іонів кальцію (Bakarjieva, Stefanov, Cristova, 2001).

На підставі аналізу отриманих результатів встановлено, що за дії низьких і високих температур істотніший вплив на активність СОД проявляла передстресова інкубація з екзогенним кальцієм, ніж наявність Ca<sup>2+</sup> у середовищі під час стресу (рис. 9).

Кальцій, очевидно, відіграє важливу роль у стійкості до температурного стресу завдяки регуляції мембранного транспорту. Так, *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch et Schimp. реагувала на холодний шок (0-10 °С) збільшенням умісту Ca<sup>2+</sup> у клітинах (Russell, Knight, Cove et al., 1996). Мабуть, вплив кальцію на проникливість мембран та інші процеси в клітині забезпечує власне

активний захист. Для сланевого печіночника *Conocephalum conicum* (L.) Underw. встановлено, що раптове зниження температури спричиняє зміну мембранного потенціалу, зумовлену входженням екзогенного та цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  (Krol, Dziubinska, Trebacz, 2003). Крім того, показано, що активність і термочутливість СОД залежить від іонів  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{Zn}^{2+}$  (Christov, Bakardjieva, 1999). Для моху *Plagiomnium affine* (Blandow ex Funok) T. J. Кор. кальцій є важливішим для I цитозольної і мітохондріальної СОД, тоді як  $\text{Zn}^{2+}$  – для хлоропластної і II цитозольної СОД.

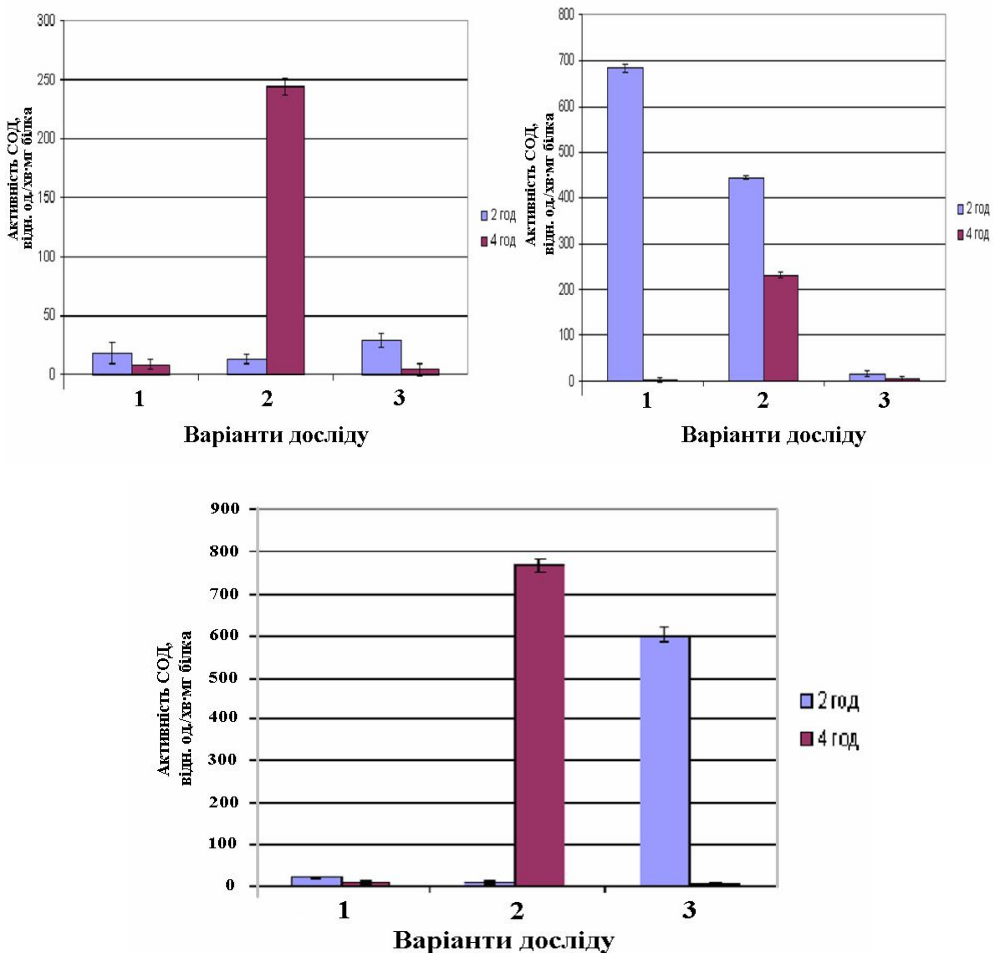


Рис. 9. Вплив температурного стресу та іонів кальцію на активність СОД у пагонах *Funaria hygrometrica* Hedw.: 1 – контроль; 2 – передстресова інкубація в розчині  $\text{CaCl}_2$ ; 3 – спільний вплив екзогенного кальцію і температури.

Природа рецептора, за допомогою якого рослинна клітина сприймає температурні зміни, досі залишається невідомою. Уважають, що на низькотемпературний стрес реакція сенсорних білків спочатку пов'язана зі зміною властивостей ліпідів, насамперед з їхньою в'язкістю, що спричиняє відкривання

кальцієвих каналів та активацію кальційзалежних шляхів трансдукції сигналу в геном (Гималов, Чемерис, Вахитов, 2004). Стан мембранних ліпідів і, очевидно, мембранозв'язаних білків змінюється й у відповідь на дію високих температур. Проте ці питання залишаються мало дослідженими.

Можна припустити, що вплив температури призводить до зміни активності стартових ферментів сигнальних систем, більшість з яких локалізована в плазмалемі (Гарчевский, 2002), і появи відповідних сигнальних інтермедіатів ( $\text{Ca}^{2+}$ , АФК та стресові фітогормони) або безпосередньо змінюється стан кальцієвих каналів. Таким чином, передбачається, що кальцій є одним із посередників трансдукції температурного сигналу в геном.

### Висновки

Отримані результати дають підстави стверджувати, що підвищення термостабільності СОД у гаметофорах моху після температурного впливу відбувалося набагато повільніше (після 4 год) за низьких  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  і  $+23\text{ }^{\circ}\text{C}$  температур унаслідок сповільнення синтезу і/або збільшення деградації молекул ферменту-антиоксиданту. Стресовий вплив високої температури ( $+42\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) спочатку спричиняв значне збільшення активності СОД майже в 30 разів, а через 4 год різке її зменшення в 3,5 рази, порівняно з ферментативною активністю у контролі за  $+23\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Показано, що в умовах гіпертермії передстресова обробка іонами кальцію призводила до стабілізації проникливості мембран та підвищення антиоксидантного захисту. Зміни активності СОД, мабуть, відбувалися внаслідок конформаційних змін існуючих молекул ферменту або індукованого синтезу його термостабільніших форм. Можна припустити, що посередниками у синтезі термостабільних форм СОД є АФК, що узгоджується з повідомленням про можливість змін ізоферментного спектра СОД у рослин гороху за гіпертермії (Брилкіна, Веселов, Курганова и др., 2003). Методом інгібіторного аналізу з антиоксидантом іонолом доведено (Карпець, Колупаєв, 2008), що ці ефекти пов'язані з новоутворенням термостабільніших форм ферментів.

На підставі отриманих результатів встановлено, що вплив екзогенного  $\text{Ca}^{2+}$  зумовлював ефект “загартовування” рослин до стресових чинників: важких металів, водного та температурного шоку. Підвищення активності ферментів-антиоксидантів (СОД, каталази та пероксидази) під впливом кальцію запобігало нагромадженню АФК, зменшувало їх шкідливий вплив на клітинні мембрани і, таким чином, гальмувало оксидативний стрес. Оскільки блокатор  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів хлорид лантану, змінюючи концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозолі клітин мохів, послаблював протекторний вплив екзогенного кальцію, можна стверджувати, що кальцій збільшував стійкість мохів до стресу не лише внаслідок регуляції метаболізму антиоксидантів, а й функціонування кальцієвих каналів: зміни водного статусу клітин та активності проникнення важких металів.

Отримані результати свідчать, що кальцієвий сигнал передавався за різних умов: унаслідок короткотривалої, повторювальної зміни концентрації

Ca<sup>2+</sup> або завдяки постійному його рівню. Ca<sup>2+</sup> спричиняв утворення АФК, функціонував після їх утворення і був активним до і після утворення АФК. Отже, продукти ПОЛ і короткочасний окислювальний сплеск є первинними медіаторами стресу як особливого стану клітини, який ініціює розвиток толерантності.

- АЛЕКСАНДРОВ В. Я. Реактивность клеток и белки. – Л.: Наука, 1985. – 318 с.
- БАРАНЕНКО В. В. Супероксиддисмутаза в клетках растений // Цитология. – 2006. – Т. 48, № 6. – С. 465-474.
- БРИЛКИНА А. А., ВЕСЕЛОВ А. П., КУРГАНОВА Л. Н. и др. Влияние гипертермии на изоферментный состав супероксиддисмутазы листьев гороха // Физиология растений и экология на рубеже веков. – М., 2003. – С. 70-71.
- ГИМАЛОВ Ф. Р., ЧЕМЕРИС А. В., ВАХИТОВ В. А. О восприятии растением холодового сигнала // Успехи соврем. биологии. – 2004. – Т. 124, № 2. – С. 185-196.
- ИВАКИН А. П., ГРУШИН А. А. Термостабильность пероксидазы в связи с жаростойкостью капусты и томатов // Физиология и биохимия культ. растений. – 1990. – Т. 22, № 5. – С. 463-468.
- КАРПЕЦЬ Ю. В., КОЛУПАЕВ Ю. Є. Значення окиснювального стресу в індукованні теплостійкості проростків пшениці короткочасною дією супероптимальної температури // Физиология и биохимия культ. растений. – 2008. – Т. 40, № 3. – С. 245-252.
- КОЛУПАЕВ Ю. Е., АКИНИНА Г. Е., МОКРОУСОВ А. В. Индукция теплоустойчивости coleoptiles пшеницы ионами кальция и ее связь с окислительным стрессом // Физиология растений. – 2005. – Т. 52, № 2. – С. 227-232.
- КОЛУПАЕВ Ю. Е., КАРПЕЦЬ Ю. В. Генерация активных форм кислорода coleoptилями пшеницы при индуцировании их теплоустойчивости ионами кальция и салициловой кислотой // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2005. – Вип. 2 (7). – С. 22-28.
- КОРОЛЮК М. А., ИВАНОВА Л. И., МАЙОРОВА И. Г., ТОКАРЕВ В. Е. Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. – 1986. – № 1. – С. 16-20.
- ЛЕОНТЬЕВА А. Н., ЛЕВЧЕНКОВА Н. В. Влияние теплового шока на термостабильность кислых фосфатаз // 4-й Съезд О-ва физиологов раст. России. Междунар. конф. “Физиология растений – наука 3-го тысячелетия”, Москва, 4-9 окт., 1999. – М., 1999. – С. 407.
- ЛЮТОВА М. И., КАМЕНЦЕВА И. Е. Термоиндуцированное увеличение устойчивости нитратредуктазы из листьев пшеницы к инактивирующим воздействиям // Физиология растений. – 2001. – Т. 48, № 1. – С. 100-105.
- МЕТОДЫ биохимического исследования растений. – Под ред. А. И. Ермакова. 3-е изд. – Л.: Агропромиздат, 1987. – 325 с.
- ПЛОХИНСКИЙ Н. А. Биометрия. – М.: Изд-во МГУ, 1970. – 367 с.
- ТАРЧЕВСКИЙ И. А. Сигнальные системы клеток растений при стрессе. – М.: Наука, 2002. – 296 с.
- ЧЕВАРИ С., АНДЯЛ Т., ШТРЕНГЕР Я. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте // Лабораторное дело. – 1991. – № 3. – С. 95-99.
- BAKARJEVA N., STEFANOV B., CRISTOVA N. Effect of calcium ions and 4-PU-30 cytokinin on the protein quantity and the activities of peroxidase, superoxide dismutase and catalase in etiolated maize coleoptiles // Докл. Бълг. АН – 2001. – Vol. 54, № 4. – P. 85-88.
- BOLWELL G. P., DAVIES D. R., GERRISH C. et al. Comparative biochemistry of the oxidative burst produced by rose and French bean cell reveals two distinct mechanisms //

- Plant Physiol. – 1998. – Vol. 116. – P. 1379-1385.
- BREDFORD W. A simple method for protein test // Annal. Biochem. – 1976. – № 72. – P. 248-252.
- CASANO L. M., GOMES L. D., LASCANO H. R., GONZALES C. A., TRIPPI V. S. Inactivation and degradation of CuZn-SOD by active oxygen species in wheat chloroplasts exposed to photooxidative stress // Plant Cell Physiol. – 1997. – 38. – P. 433-440.
- CHANG SU-CHIH, GALLIE D. R. Nase activity decreases following a heat shock in wheat leaves and correlates with its posttranslational modification // 1997. – Vol. 113, № 4. – P. 97.
- CHRISTOV K., BAKARDJEVA N. T. Effect of calcium and zinc on subcellular distribution, activity and thermosensitivity of superoxide dismutase in Mnium affine // Biol. Plant. (Praha). – 1999. – 42. – P. 57-63.
- CORPAS F. J., BARROSO J. B., DEL RIO L. A. Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells // Trends Plant Sci. – 2001. – Vol. 8, № 4. – P. 145-150.
- KHANNA-CHOPRA R., SABARINATH S. Heat-stable chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase in *Chenopodium murale* // Biochem. and Biophys. Res. Commun. – 2004. – Vol. 320, № 4. – P. 1187-1192.
- KELLER T., DAMUDE H. G., VERNER D. et al. A plant homologue of the neutropil NADPH oxidase gp91 phox subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca<sup>++</sup> binding motifs // Plant Cell. – 1998. – Vol. 10, № 2. – P. 255-266.
- KROL E., DZIUBINSKA H., TREBACZ K. Lowtemperature induced transmembrane potential changes in the liverwort *Conocephalum conicum* // Plant Cell Physiol. – 2003. – 44. – P. 527-533.
- MISZALSKI Z., SLESAK I., NIEWIADOMSKA E. et al. Subcellular localization and stress responses of superoxide dismutase isoforms from leaves in the C3-CAM intermediate halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* L. // Plant, Cell and Envirom. – 1998. – Vol. 21, № 2. – P. 169-179.
- RUSSELL A. J., KNIGHT M. R., COVE D. J., KNIGHT C. D., TREWAVAS A. J., WANG T. L. The moss, *Physcomitrella patens*, transformed with apoaquorin cDNA responds to cold shock, mechanical perturbation and pH with transient increases in cytoplasmic calcium // Transgen. Res. – 1996. – 5(3). – P. 167-170.
- SAGI M., FLUHR R. Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases // Plant Physiol. – 2006. – Vol. 141. – P. 336-340.
- SUZUKI N., MITTLER R. Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction // Physiol. Plant. – 2006. – Vol. 126. – P. 45-51.

## УЧАСТИЕ КАЛЬЦИЕВОЙ СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ В СТРЕССОВЫХ РЕАКЦИЯХ МХОВ

О. В. ЛОБАЧЕВСКАЯ, И. В. МЕЛЬНИК

Исследовано влияние экзогенного хлорида кальция на формирование адаптивных реакций гаметофита мхов *Funaria hygrometrica* Hedw. и *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid. в стрессовых условиях: высоких концентраций тяжёлых металлов, температурного и осмотического шока. Установлена взаимосвязь между изменениями кальциевого статуса клеток и образованием активных форм кислорода (АФК) в клетках мхов. Ca<sup>2+</sup>-зависимое образование АФК индуцировало защитные реакции клеток с участием антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы (СОД), каталазы и пероксидазы. Показано, что блокатор кальциевых каналов LaCl<sub>3</sub> снижал влияние экзогенного кальция. Предполагается, что Ca<sup>2+</sup> и АФК объединяют сигнальные систе-

мы клеток мхов, которые инициируют развитие толерантности.

**Ключевые слова:** экзогенный кальций, блокатор кальциевых каналов, стрессовые реакции, антиоксидантная защита, мохообразные

## THE PARTICIPATION OF THE CALCIUM SIGNALING SYSTEM IN STRESS REACTIONS OF MOSSES

O. V. LOBACHEVSKA, I. V. MELNYK

It was investigated the influence of exogenous calcium chloride on the formation of adaptive reactions of gametophyte of mosses *Funaria hygrometrica* Hedw. and *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid. in response on heat or osmotic shock or high levels of heavy metals. It was stated the interrelation between the changes of calcium status and reactive oxygen species (ROS) production in the mosses cells. The  $\text{Ca}^{2+}$ -depended intensification of ROS generation caused the induction of defence reactions concerning antioxidant enzymes: superoxide dismutase, catalase and peroxidase. It was shown that the blocker of calcium channels  $\text{LaCl}_3$  decreased the effects of exogenous  $\text{Ca}^{2+}$ . It supposed that  $\text{Ca}^{2+}$  and ROS unite signaling systems of the mosses cells.

**Key words:** exogenous calcium, blocker of calcium channels, stress reactions, antioxidant protection, bryophytes

Надійшла 25.06.2010

Прийнята до друку 09.11.2010

ЛОБАЧЕВСЬКА О. В. Інститут екології Карпат НАН України, вул. Стефаника, 11, м. Львів, 79000, Україна; e-mail: morphogenesis@mail.lviv.ua

LOBACHEVSKA O. V. Institute of Ecology of the Carpathians NAS of Ukraine, 11 Stefanyk St., Lviv, 79000, Ukraine; e-mail: morphogenesis@mail.lviv.ua

МЕЛЬНИК І. В. Інститут екології Карпат НАН України, вул. Стефаника, 11, м. Львів, 79000, Україна; e-mail: ircya22@rambler.ru

MELNYK I. V. Institute of Ecology of the Carpathians NAS of Ukraine, 11 Stefanyk St., Lviv, 79000, Ukraine; e-mail: ircya22@rambler.ru