



УДК 58.04:546.47/56:581.174:582.661.15

М. В. Водка, О. В. Поліщук, Н. О. Білявська, О. К. Золотарьова

Реакція фотосинтетичного апарату шпинату на дію важких металів, інгібіторів карбоангідрази

(Представлено академіком НАН України К. М. Ситником)

Досліджено вплив важких металів (іонів Cu^{2+} та Zn^{2+}), інгібіторів карбоангідрази, на мембранну систему ізольованих хлоропластів шпинату. Виявлено, що за умов обробки препаратів хлоропластів іонами Zn^{2+} знижується вміст бікарбонату на 20%, збільшується товщина тилакоїдів гран на 35% та міжтилакоїдних проміжків на 34% порівняно з контролем. Під дією іонів Cu^{2+} порівняно з контролем неістотно знижується рівень бікарбонату, тоді як товщина тилакоїдів гран збільшується на 15%, а товщина міжтилакоїдних проміжків — на 10%. Відмічено, що вплив іонів Zn^{2+} на структуру гранальної системи і рівень бікарбонату є більш значущим, ніж іонів Cu^{2+} . Отримані дані можуть вказувати на зниження активності тилакоїдної карбоангідрази, інгібування електронного транспорту та процесу фотосинтезу в цілому в присутності інгібіторів карбоангідрази.

Однією з проблем фотобіології рослин є визначення організації первинних процесів асиміляції CO_2 , до якої належать поглинання, трансмембранне переміщення та внутрішньоклітинне накопичення неорганічного вуглецю (C_H), а також концентрування CO_2 в зонах карбоксилювання. Оскільки провідна роль в первинних процесах асиміляції C_H належить ензиматичним реакціям за участю карбоангідраз, то вищезазвану проблему досліджують, вивчаючи саме цю групу ферментів.

Як відомо, фотосинтез відбувається за участю C_H . Його надходження у фотосинтезуючі клітини активно вивчається протягом останніх 20 років [1].

Вже встановлено форми, в яких C_H надходить у клітини, кінетика його транспорту, залежність транспорту від ряду параметрів навколишнього середовища. Транспорт C_H відбувається проти градієнта концентрації, а отже, потребує енергії для свого здійснення, тобто є активним транспортом.

Призначенням механізмів активного транспорту, які здатні накопичувати в клітинах неорганічний вуглець у концентраціях, що в сотні й тисячі разів перевищують його концентрацію в навколишньому середовищі, є створення оптимальних умов для фотосинтетичної

© М. В. Водка, О. В. Поліщук, Н. О. Білявська, О. К. Золотарьова, 2013

фіксації вуглецю [2]. Такі механізми з урахуванням речовини, що транспортується, називаються CO_2 -концентруючими, або C_n -концентруючими механізмами.

CO_2 -концентруючий механізм є результатом злагодженої роботи карбоангідрази та системи переносників сполук C_n , які створюють в зоні активного сайту рибулозобіфосфаткарбоксилази/оксигенази (РБФК/О) необхідну концентрацію CO_2 . Карбоангідраза (КА, карбонат гідролаза, ЄС 4.2.1.1.) — фермент, який широко розповсюджений у всіх живих організмах від прокариот до людини [3]. КА бере участь у всіх процесах C_n -концентруючого механізму (поглинання C_n , запобігання витоку C_n з клітини, внутрішньоклітинне перетворення форм C_n). C_n , що поглинається клітиною, накопичується у вигляді пулу HCO_3^- . Внаслідок існування різних форм C_n , у яких він накопичується і фіксується в клітині, для перебігу реакцій карбоксилювання є необхідним перетворення HCO_3^- в CO_2 . Це відбувається за участю КА в умовах її тісної кооперації з РБФК/О. Останнє є важливим у зв'язку з тим, що внутрішньоклітинне підвищення вмісту CO_2 неминуче призведе до його відтоку з клітини за градієнтом концентрації [4, 5].

Виявлено, що рослинна КА інгібується деякими важкими металами; ця властивість обумовлена наявністю в її складі великої кількості цистеїнових залишків [6].

На сьогодні велику кількість публікацій присвячено біохімічному вивченню КА, проте залишаються мало дослідженими механізми дії її інгібіторів (зокрема, важких металів) на структурні компоненти рослини, де відбувається фотосинтез, на їх фотосинтетичний апарат, а саме на мембранну систему хлоропластів.

Тому ми ставили за мету дослідження впливу іонів Cu^{2+} та Zn^{2+} на мембранну систему ізольованих хлоропластів шпинату.

Хлоропласти класу "С" виділяли з листків 15-добових проростків шпинату (*Spinacea oleracea* L.) методом диференційного центрифугування [7] в середовищі, що містило 300 мМ сорбітолу, 10 мМ NaCl, 15 мМ аскорбату натрію, 10 мМ *трис*-HCl (pH 7,8). Час інкубації зразків з металами і без них становив 1,5 год за темнових умов.

Структурні характеристики будови гранальних тилакоїдних мембран вивчали методом трансмісійної електронної мікроскопії. Виділені хлоропласти, які були оброблені інгібіторами і не оброблені, поміщали в середину агарових блоків. Проби фіксували 2,5% глутаровим альдегідом. Після промивки здійснювали дофіксацію розчином 1% OsO_4 . Зневоднення і заливку в епон-аралдитну смолу проводили за стандартною методикою. Ультратонкі зрізи виготовляли на ультрамікротомі LKB-V (LKB, Швеція), досліджували і фотографували у трансмісійному електронному мікроскопі JEM-1300 (JEOL, Японія). Розміри тилакоїдної системи гран на зображеннях зрізів визначали за допомогою комп'ютерної програми ImageTool 3.0 (UTHSCSA, США).

Для визначення змін вмісту зв'язаного бікарбонату суспензію хлоропластів шпинату з концентрацією хлорофілу 4 мг/мл інкубували протягом 3 год при 0 °C з інгібіторами КА (80 мкМ Cu^{2+} , 200 мкМ Zn^{2+}). Вміст бікарбонату в тилакоїдах визначали за допомогою інфрачервоного газоаналізатора Q-S151 ("Qubit systems", Канада) за різницею виходу CO_2 із суспензії та відповідного супернатанту після додавання HCl до концентрації 1 М.

Як нами було визначено, в контрольних хлоропластах вміст бікарбонату становив 225 нмоль/мг хлорофілу, що в молярному співвідношенні відповідає одній молекулі бікарбонату на кожні п'ять молекул хлорофілу, а після обробки інгібіторами КА його вміст знижувався (рис. 1). В присутності 80 мкМ Cu^{2+} спостерігалася незначна тенденція до його зниження. Після обробки хлоропластів 200 мкМ Zn^{2+} вміст бікарбонату становив 185 нмоль/мг хлорофілу, або приблизно 80% контрольної величини. З урахуванням отриманих даних бу-

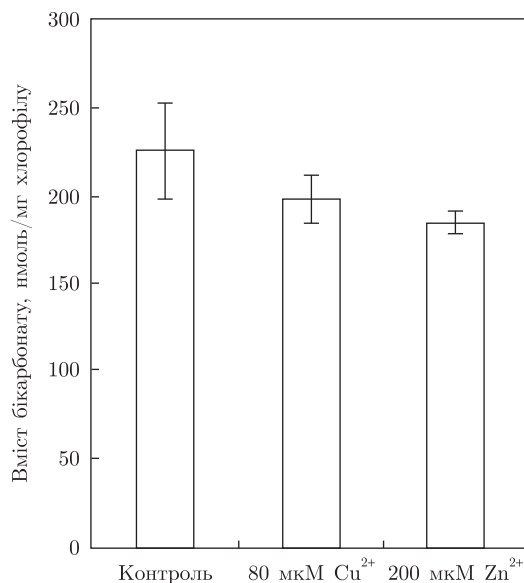


Рис. 1. Вміст бікарбонату в тилакоїдах шпинату в контролі та після обробки інгібіторами КА

ло досліджено структуру гранальної системи хлоропластів шпинату під впливом металів, інгібіторів карбоангідраз.

На рис. 2, а зображено фрагменти хлоропластів з контрольного варіанта, які позбавлені оболонки, де чітко вирізняються окремі грани, пластоглобули, тилакоїди строми. Інтактна грана складається з 42 тилакоїдів, від кінцевих ділянок яких відходять тилакоїди строми (див. рис. 2, б). Підрахунки виявили, що товщина тилакоїдів гран у середньому досягала 9,7 нм, тоді як проміжок між ними становив 12 нм (рис. 3).

Порушення фотосинтетичного апарату, що відбувалися під впливом інгібіторів карбоангідрази, іонів Cu²⁺ або Zn²⁺, чітко виявлялися у вигляді змін ультраструктури гран.

За умов дії іонів Cu²⁺ спостерігалось збереження загальної структури гран, рівномірне пакування тилакоїдів у гранах (див. рис. 2, в). Однак порівняно з контролем змінювалися параметри гран (див. рис. 2, г): товщина тилакоїдів гран збільшувалася на 15%, а ширина міжтилакоїдних проміжків — на 10% (див. рис. 3).

На відміну від впливу іонів Cu²⁺ за умов обробки препаратів хлоропластів іонами Zn²⁺ спостерігалася неоднорідність пакування тилакоїдів гран, змінювався характер будови гран (див. рис. 2, д, е). Це виявлялося в різкому збільшенні порівняно з контролем ширини міжтилакоїдних проміжків на 34%, особливо в центральній частині гран, при цьому зовнішні ділянки тилакоїдів залишалися попарно з'єднаними; товщина тилакоїдів гран також збільшувалася на 35% порівняно з контролем (див. рис. 3).

Слід зазначити, що деякими дослідниками показано зменшення кількості гран і порушення їх структури під дією іонів інших важких металів, зокрема кадмію [8, 9]. Грани мали неправильну форму і містили меншу кількість тилакоїдів. Відбувалася також деградація тилакоїдів строми [10].

Зниження активності карбоангідрази може бути безпосередньою або опосередкованою причиною порушень фотосинтезу. Так негативними проявами впливу Zn²⁺ і Cu²⁺ є пригнічення росту та розвитку листків і коренів, поява у рослин хлорозу, що є наслідком змін на рівні фотосинтезу. Відомо, що фотосинтетичний апарат рослин дуже чутливий до підви-

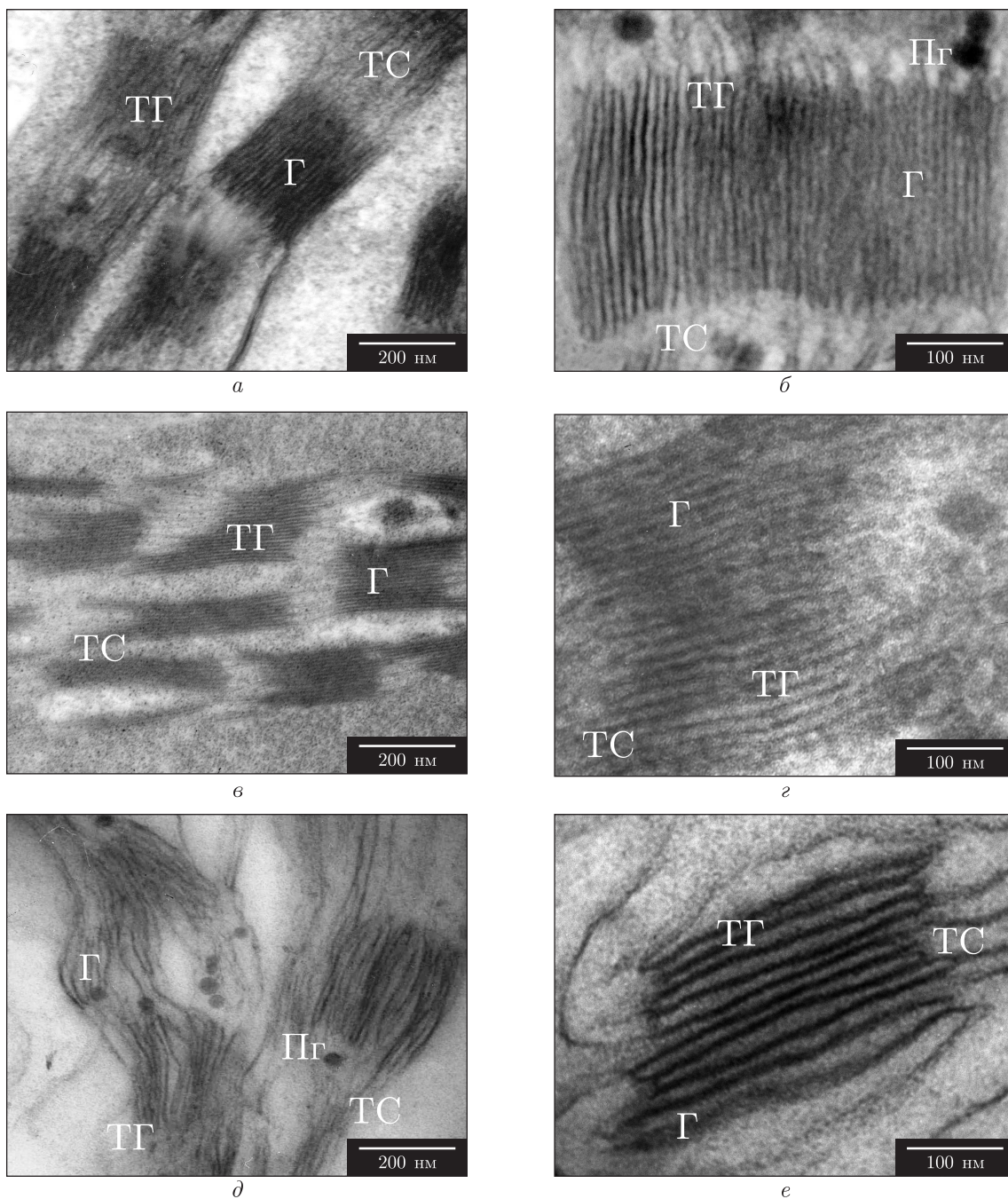


Рис. 2. Ультраструктура виділених хлоропластів шпинату та їх гран. *a, б* — контроль; *в, г* — обробка Cu^{2+} ; *д, е* — Zn^{2+} . Позначення: Г — грана, ТГ — тилакоїди грани, Пг — пластоглобули, ТС — тилакоїди строми

щення вмісту важких металів у навколишньому середовищі, що виявляється в порушенні багатьох параметрів його функціонування [11]. Серед основних причин цього явища можна назвати такі: зниження активності ферментів синтезу хлорофілу і каротиноїдів, руйнування пігментів інгібуванням електрон-транспортного ланцюга фотосинтезу, а також опосередковано через вплив на обмін заліза.

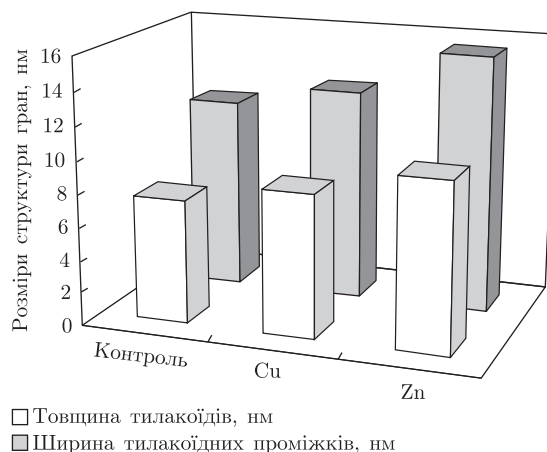


Рис. 3. Вплив інгібіторів КА на розміри структури гран — товщину тилакоїдів та ширину міжтилакоїдних проміжків

Нааявні дані щодо впливу Cu^{2+} та Zn^{2+} на рівні фотосинтетичного електрон-транспортного ланцюга свідчать про те, що найбільш уразливою його ділянкою є фотосистема II (ФСII). Зокрема, іони Cu^{2+} та Zn^{2+} можуть зв'язуватися в межах Fe^{2+} -сайта між Q_A і Q_B , викликаючи зсув негемового заліза, який реєструється як зникнення сигналу ЕПР, що належить $\text{Q}_A - \text{Fe}^{2+}$ в частках ФСII [12]. Модифікації акцепторної сторони ФСII під впливом іонів важких металів підтверджуються також методами релаксації флуоресценції хлорофілу і визначення відносного вмісту Q_B -невідновлювальних реакційних центрів ФСII [12]. Порушення в структурі хлоропластів під впливом важких металів призводять до зниження вмісту хлорофілів у листках рослин, а також викликають інактивацію кисневиділяючого центру ФСII і уповільнення електронного транспорту [13].

Результати структурних досліджень дають можливість припустити, що зміна кінетичних характеристик фотохімічних процесів у хлоропластах в присутності іонів Cu^{2+} та Zn^{2+} , яка спостерігалася раніше [11], може бути наслідком саме перебудов мембранної системи хлоропластів (набухання тилакоїдних мембран, руйнування гран та структури тилакоїдів). Слід зазначити, що вплив іонів Zn^{2+} на структуру гранальної системи виявився більш вираженим, ніж іонів Cu^{2+} , що збігається з даними про більший ступінь інгібування активності КА іонами Zn^{2+} , ніж Cu^{2+} [14].

Функції КА багатогранні, і всі вони засновані на швидкому обміні CO_2 і HCO_3^- . Разом з тим, як свідчать наші результати, у тилакоїдах цей фермент консервує C_n і запобігає його втраті. Тилакоїдна КА, ймовірно, є важливою частиною нещодавно описаного базального C_n -концентруючого механізму [15], притаманного всім фотосинтезуючим організмам. Роль рослинної γ -КА комплексу I мітохондрій полягає в перетворенні CO_2 на HCO_3^- з подальшою транслокацією в цитоплазму для запобігання втрати клітиною CO_2 , що утворився при декарбоксилюванні, і його подальшого використання при фотосинтезі. Тилакоїдна КА β -типу, у свою чергу, зв'язує бікарбонат, і перетворює його на CO_2 за умови дефіциту останнього [15]. Проте ми вважаємо, що не менш важливою є каталітична, а не субстратна функція бікарбонатного пулу. Він, включаючись у структуру тилакоїдної мембрани, полегшує латеральне перенесення протонів до АТФ-синтази і, регулюючи ефективність синтезу АТФ, забезпечує координування світлової та темної фаз фотосинтезу, тобто виступає в ролі сигнальної молекули.

Отримані дані можуть вказувати на важливу роль тилакоїдної КА у підтриманні бікарбонатного пулу в хлоропластах, як поблизу РБФК/О, так і в тилакоїдах, а також на істотне значення бікарбонатного пулу в підтриманні ультраструктури тилакоїдних мембран. Разом з тим не можна виключати безпосередній вплив металів-інгібіторів (Cu^{2+} та Zn^{2+}) на ультраструктуру тилакоїдних мембран.

Отже, на підставі одержаних нами експериментальних даних можна висловити припущення про участь КА в організації та підтримці інтактною структури гранальної системи хлоропластів.

Аналіз впливу інгібіторів КА на ультраструктуру тилакоїдів гран може становити значний інтерес, оскільки він несе інформацію про стан гран і хлоропластів у цілому. Ультраструктурні характеристики тилакоїдів гран можна також використовувати як маркери при вивченні впливу на рослини несприятливих факторів навколишнього середовища, зокрема іонів важких металів.

1. *Giordano M., Beardall I., Raven J. A.* CO₂ Concentrating Mechanisms in Algae: Mechanisms, Environmental Modulation, and Evolution // *Ann. Rev. Plant Biol.* – 2005. – **56**. – P. 99–131.
2. *Raven J. A.* CO₂-Concentrating Mechanism: A Direct Role for Thylakoid Lumen Acidification? // *Plant Cell Environ.* – 1997. – **20**, No 2. – P. 147–154.
3. *Игнатова Л. К., Руденко Н. Н.* Гетерогенная природа карбоангидразной активности тилакоидных мембран. – Пушино, 2006. – 21 с.
4. *Badger M. R.* Effect of carbonic anhydrase inhibition of photosynthesis by leaf pieces of C₃ and C₄ plants // *Austral. J. Plant Physiol.* – 1995. – **22**, No 1. – P. 45–49.
5. *Camm E. L., Green B. R.* Wide spread distribution of the same minor chlorophyll-protein complexes in some plants and algae // *Plant Physiol.* – 1981. – **67**, No 5. – P. 1061–1064.
6. *Алиев Д. А., Гулиев Н. М.* Карбоангидраза растений. – Москва: Наука, 1990. – 175 с.
7. *Гавриленко В. Ф., Жигалова Т. В.* Большой практикум по фотосинтезу. – Москва: Академия, 2003. – 256 с.
8. *Molas J.* Changes in morphological and anatomical structure of cabbage (*Brassica oleracea* L.) outer leaves and in ultrastructure of their chloroplasts caused by an in vitro excess of nickel // *Photosynthetica.* – 1997. – **34**, No 4. – P. 513–522.
9. *Siedlecka A., Krupa Z.* Cd/Fe interaction in higher plants – its consequences for the photosynthetic apparatus // *Photosynthetica.* – 1999. – **36**, No 3. – P. 321–331.
10. *Skorzynska E., Baszynski T.* The changes in PSII complex polypeptides under cadmium treatment are they of direct or indirect nature? // *Acta Physiol. Plant.* – 1993. – **15**, No 4. – P. 263–269.
11. *Титов А. Ф., Таланова В. В., Казнина Н. М., Лайдинен Г. Ф.* Устойчивость растений к тяжелым металлам. – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2007. – 172 с.
12. *Jegerschöld C., MacMillan F., Lubitz W.* Effects of copper and zinc ions on photosystem II studied by EPR spectroscopy // *Biochemistry.* – 1999. – **38**, No 38. – P. 12439–12445.
13. *Atal N., Saradhi P. P., Mohanty P.* Inhibition of the chloroplast photochemical reactions by treatment of wheat seedlings with low concentrations of cadmium. Analysis of electron transport activities and changes in fluorescence yield // *Plant Cell Physiol.* – 1991. – **32**, No 7. – P. 943–951.
14. *Hakan S., Beydemir S.* The impact of heavy metals on the activity of carbonic anhydrase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) kidney // *Toxicol. Indust. Health.* – 2011. – **27**, No 1. – P. 1–10.
15. *Zabaleta E., Martin M. V., Braun H.-P.* A basal carbon concentrating mechanism in plants? // *Plant Sci.* – 2012. – **187**. – P. 97–104.

М. В. Водка, А. В. Полищук, Н. А. Белявская, Е. К. Золотарева

Реакция фотосинтетического аппарата шпината на действие тяжелых металлов, ингибиторов карбоангидразы

Исследовано влияние тяжелых металлов (ионов Cu^{2+} и Zn^{2+}), ингибиторов карбоангидразы, на мембранную систему изолированных хлоропластов шпината. Установлено, что при обработке препаратов хлоропластов ионами Zn^{2+} снижается содержание бикарбоната на 20%, увеличивается толщина тилакоидов гран на 35% и межтилакоидных промежутков на 34% по сравнению с контролем. В условиях действия ионов Cu^{2+} по сравнению с контролем несущественно снижается уровень бикарбоната, тогда как толщина тилакоидов гран увеличивается на 15%, а толщина межтилакоидных промежутков — на 10%. Отмечено, что влияние ионов Zn^{2+} на структуру гранальной системы и уровень бикарбоната более выражено, чем ионов Cu^{2+} . Полученные данные могут указывать на снижение активности тилакоидной карбоангидразы, ингибирование электронного транспорта и процесса фотосинтеза в целом в присутствии ингибиторов карбоангидразы.

M. V. Vodka, O. V. Polishchuk, N. O. Bilyavs'ka, E. K. Zolotareva

Response of spinach photosynthetic apparatus to the action of heavy metals, carbonic anhydrase inhibitors

The effects of heavy metals (Cu^{2+} and Zn^{2+}), carbonic anhydrase inhibitors, on the membrane system of isolated chloroplasts of spinach are investigated. Following the treatment of chloroplast preparations with zinc ions, a decline in the bicarbonate content by 20% occurred, the thickness of the granal thylakoids increased by 35%, and the interspace between thylakoids did by 34% as compared with control. As a result of the Cu^{2+} treatment, the bicarbonate level decreased by 20%, the thickness of granal thylakoids enhanced by 15%, and the interspace between thylakoids increased by 10% in comparison to control. It is shown that the effects of zinc ions on the structure of the chloroplast granal system and the bicarbonate level are more evident than those of copper ions. The data obtained can indicate a decrease in the activity of thylakoid carbonic anhydrase and the inhibition of the electron transport and the photosynthetic process as a whole in the presence of carbonic anhydrase inhibitors.