

УДК 582.739:577.158:546.74
© 2013

Т.А. АРТЮШЕНКО,
кандидат біологічних наук

Криворізький ботанічний сад
НАН України

АКТИВНІСТЬ АСКОРБАТПЕРОКСИДАЗИ У ВЕГЕТАТИВНИХ ОРГАНАХ ГОРОХУ ЗА ДІЇ КАДМІЮ ТА НІКЕЛЮ

Досліджено динаміку змін інтенсивності функціонування аскорбатпероксидази у вегетативних органах 10-добових проростків гороху за сумісного впливу кадмію та нікелю. Показано, що токсична дія їх сполук на ранніх етапах онтогенезу гороху виявляється в суттєвому порушенні про-/антиоксидантної рівноваги, що підтверджується відповідним підвищенням активності аскорбатпероксидази.

Пізнання механізмів стійкості рослин до несприятливих умов навколишнього середовища в останні десятиліття ввійшло до числа найактуальніших проблем фітофізіології і загальної біології. Це зумовлено передусім глобальними кліматичними змінами і посиленням впливу на рослини чинників антропогенного походження (ксенобіотики, різні види випромінювання, важкі метали тощо). Для знешкодження активних форм кисню, які утворюються при оксидативному стресі, зумовленому дією останніх, у рослин функціонують неферментативні та ферментативні захисні системи [1, 2]. Серед останніх ключову роль у мінімізації окисного пошкодження за дії важких металів відіграють ферменти аскорбат-глутатіонового циклу, зокрема аскорбатпероксидаза (L-аскорбат:кисень-оксидоредуктаза, КФ 1.11.1.11), що каталізує відновлення пероксиду водню до води за участю аскорбінової кислоти як специфічного донора протонів [3].

Відомо, що інтенсивність функціонування зазначеної оксидоредуктази за дії зовнішніх чинників може змінюватись. Так, у роботі [4] показано, що іони кадмію у високій концентрації викликали в рослин *Arabidopsis thaliana* зростання аскорбатпероксидазної активності через 2 год після початку стресової обробки та її зменшення при подовженні обробки до 12 год. Аналогічна тенденція до зростання активності ферменту на початкових етапах стресового впливу за дії кадмію і подальшим зниженням при збільшенні концентрації токсиканту та часу експозиції встановлена і для інших рослин [5]. Поряд з

цим за дії плюмбуму, кадмію та ртуті в концентрації 1 мг/л у коренях, стеблах і листках *Kandelia candel* активність зазначеного ферменту не змінювалась, тоді як за концентрації вище 5 мг/л вона значно зростала, а вегетативних органах *Bruguiera gymnorhiza* спостерігалось підвищення активності ферменту вже за мінімальної концентрації [6]. Інші дослідники виявили лише незначні зміни аскорбатпероксидазної активності в *Albizia julibrissin* за дії кадмію і плюмбуму [7].

Отже, враховуючи суперечливість наведених даних щодо дії негативних чинників довкілля на активність аскорбатпероксидази, варто відзначити, що дане питання вимагає подальшого дослідження, щоб у кінцевому підсумку визначити умови, які формують пул аскорбінової кислоти за стресових ситуацій. Саме така **мета** стояла і в наших дослідженнях.

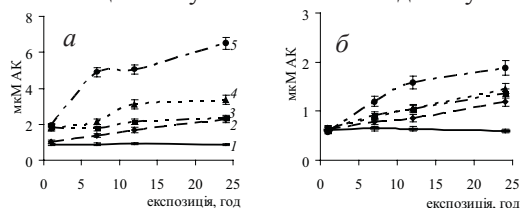
Об'єктами досліджень були проростки гороху посівного (*Pisum sativum* L.) сорту Харківський янтарний, що вирощувалися на дистильованій воді. На 10 добу експерименту до середовища вирощування вносили важкі метали у вигляді суміші їх сірчано-кислих солей в концентраціях 3 і 30 мг Cd^{2+} /л та 4 і 40 мг Ni^{2+} /л. Рослинний матеріал відбирали через 1, 7, 12 та 24 год після внесення важких металів. Активність аскорбатпероксидази у вегетативних органах гороху визначали за Nakano Y. і Asada K. [8], концентрацію білка – за методом Greenberg Ch.S. [9].

Проведені дослідження активності аскорбатпероксидази в кореневій системі гороху дозволили встановити, що рівень активності аскорбатпероксидази залежить від концен-

трації іонів кадмію і нікелю в середовищі вирощування (рисунок). Так, на початковому етапі сумісної дії сполук кадмію і нікелю в низькій концентрації активність аскорбатпероксидази в коренях перевищувала контрольну на 18 %. Поряд з цим, при внесенні більш значних кількостей токсикантів активність даного ферменту відрізнялася від контролю в 2–2,2 раза.

Із збільшенням тривалості стресового впливу до 7 год у кореневій системі гороху зареєстрована тенденція до подальшого зростання активності даної оксидоредуктази, що добре узгоджується з показаним нами раніше зростанням вмісту як аскорбінової, так і дегідроаскорбінової кислот [10]. Відзначимо, що за дії сполук важких металів при переважанні нікелю активність даного ферменту не змінювалася відносно попереднього дослідного періоду. Найбільш суттєво аскорбатпероксидазна активність у коренях гороху збільшувалася за комплексного впливу сполук кадмію і нікелю у високих концентраціях – у 2,5 раза порівняно з першою годиною стресової дії. У решти випадків оксидоредуктаза функціонувала на 20–34 % активніше, ніж на початковому етапі інтоксикації. Зважаючи на те, що в даному випадку відзначена активація процесів синтезу аскорбату [10], відбувається інтенсифікація функціонування ферменту за умов достатньої кількості субстрату реакції.

Дані, представлені на рисунку, дозволяють стверджувати, що після 12-годинної інтоксикації сполуками нікелю і кадмію у ва-



Активність аскорбатпероксидази у коренях (а) та листках (б) гороху за сумісної дії іонів кадмію та нікелю (мкмоль аскорбінової кислоти/мг білка /хв):
1 – контроль; 2 – 3 мг Cd^{2+} /л+4 мг Ni^{2+} /л; 3 – 3 мг Cd^{2+} /л+40 мг Ni^{2+} /л; 4 – 30 мг Cd^{2+} /л+4 мг Ni^{2+} /л; 5 – 30 мг Cd^{2+} /л+40 мг Ni^{2+} /л

ріантах за низької концентрації останнього в коренях гороху рівень збільшення активності аскорбатпероксидази перевищував відповідні показники після 7-годинної експозиції на 20–23 %. Одночасно за високого вмісту кадмію на фоні низького нікелю в середовищі вирощування спостерігалася більш істотна активація функціонування зазначеного ферменту – майже в 1,5 раза. У коренях проростків гороху за сумісної дії сполук металів у високій концентрації активність аскорбатпероксидази статистично достовірно не відрізнялася від такої в попередній дослідний період, що пояснюється, зокрема, зниженням кількості відновленої аскорбінової кислоти.

На 24 год експерименту в коренях гороху спостерігалось уповільнення темпів зростання активності аскорбатпероксидази. Так, за низької та високої концентрацій сполук обох металів її абсолютні значення збільшувалися на 35 і 28 % відповідно, того часу як в інших варіантах – не змінювалися порівняно з 12-годинною експозицією. Встановлена тенденція зміни активності аскорбатпероксидази пояснюється підвищенням концентрації іонів кадмію і нікелю у тканинах коренів, що призводить до відповідної інтенсифікації утворення інтермедіатів стресової дії, зокрема продуктів пероксидного окиснення ліпідів, та використанням значної кількості вітаміну С для переривання вільнорадикальних процесів.

У листках гороху сумісна дія сполук кадмію і нікелю протягом першої години не спричиняла змін активності аскорбатпероксидази, що узгоджується і з відсутністю відмінностей в концентрації аскорбінової кислоти в дослідних та контрольних рослин [10]. На відміну від короточасного, 7-годинний стресовий вплив спричинював статистично достовірне підвищення активності аскорбатпероксидази в листках гороху на 25–44 % за комплексного впливу токсикантів з низькою концентрацією хоча б одного з них. Поряд з цим за сумісної дії кадмію і нікелю у високих концентраціях інтенсивність функціонування даного ферменту була майже вдвічі вищою за контрольну (рисунок).

Аналогічна тенденція зміни активності аскорбатпероксидази спостерігається і у ва-

ріантах дослідів з подовженням тривалості інтоксикації сполуками важких металів до 12 год. Наприклад, використання токсикантів у низькій концентрації зумовлювало інтенсифікацію функціонування аскорбатпероксидази на 10 % порівняно з попереднім варіантом, тоді як найбільше зростання значень активності ферменту були відмічені за сумісної дії металів у високих концентраціях – на 30 %, що в 2,5 рази перевищувало контроль.

Збільшення тривалості експозиції гороху на розчинах сірчаноокислого кадмію та нікелю до 24 год призводило до подальшого зростання активності аскорбатпероксидази в

листяках. Зокрема, у варіантах з низьким вмістом у середовищі вирощування хоча б одного з металів інтенсивність функціонування ферменту перевищувала відповідну після 12-годинного стресу на 32–39 %. Наголосимо, що у варіанті за дії високої концентрації обох токсикантів активність аскорбатпероксидази підвищувалося лише на 18 % відносно аналогічного варіанта на 12 год експозиції. На нашу думку, цей факт може свідчити про недостатню для нормального функціонування ферменту кількість аскорбінової кислоти, яка використовується аскорбатпероксидазою як специфічний субстрат.

Висновки

Можна стверджувати, що токсична дія сполук кадмію та нікелю на ранніх етапах онтогенезу гороху виявляється в суттєвому порушенні прооксидантно-антиоксидантної рівноваги, що підтверджується відповідним підвищенням активності аскорбатпероксидази. У коренях гороху на 24 год експерименту спостерігалось уповільнення темпів зростання активності аскорбатпероксидази, яке може бути пов'язане з недостатньою

кількістю аскорбінової кислоти за тривалого стресового впливу.

На початковому етапі стресового впливу, зумовленого сумісною дією сполук кадмію і нікелю, в листках гороху не відбувалося змін активності аскорбатпероксидази, тоді як 7-годинний стресовий вплив викликав статистично достовірне підвищення активності зазначеної оксидоредуктази.

Бібліографія

1. Долиба І.М. Активність каталази та аскорбат пероксидази у *cat2* нокаутного мутанта *Arabidopsis thaliana* за дії іонів кадмію / І.М. Долиба, Р.А. Волков, І.І. Панчук // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2011. – Т. 9, № 2. – С. 200–208.
2. Cadmium accumulation and tolerance of two safflower cultivars in relation to photosynthesis and antioxidative enzyme / G. Shi, C. Liu, Q. Cai [et al.] // Bull. Environ. Contam. Toxicol. – 2010. – Vol. 85. – P. 256–263.
3. Гришко В.М. Перебіг процесів пероксидного окиснення ліпідів та роль аскорбінової кислоти у формуванні адаптаційного синдрому рослин за сумісної дії кадмію та нікелю / В.М. Гришко, Т.А. Демура // Доповіді НАН України. – 2009. – № 2. – С. 154–162.
4. Реакція відповіді рослин на УФ-В опромінення та оксидний стрес / Н.Ю. Таран, О.А. Оканенко, Л.М. Бацманова [та ін.] // Ukrainian Antarctic Journal. – 2009. – № 8. – С. 395–403.
5. Совместное влияние гибберелловой и аскорбиновой кислот на перекисное окисление липидов и активность антиокислительных ферментов в проростках сои при обработке никелем / С. Сауди-Кар, Р.А. Хавари-Неджад, Х. Фахими [и др.] // Физиология растений. –

2007. – Т. 54, № 1. – С. 85–91.

6. Role of peroxidases in the compensation of cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants under abiotic stress / A. Bonifacio, M.O. Martins, C.W. Ribeiro [et al.] // Plant, cell and environment. – 2011. – Vol. 34, Issue 10. – P. 1705–1722.

7. Effects of Cd, Pb, chilling and drought treatments on activity of five antioxidant enzymes and free proline level in Albizzia leaves / G. Baycu, H. Ozden, N. Goren-Saglam [et al.] // FESPB Congress, 17–24 August 2008. – Tampere-Finland, 2010. – P. 133.

8. Артюшенко Т.А. Участие аскорбиновой кислоты и ферментов ее метаболизма в физиологической адаптации гороха и кукурузы к совместному действию соединений никеля и кадмия / Т.А. Артюшенко, В.Н. Гришко // Растение и стресс: тезисы докладов Всероссийского симпозиума, 9–12 ноября 2010 г. – М., 2010. – С. 39–40.

9. Nakano Y. Hydrogen peroxide is scavenger by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts / Y. Nakano, K. Asada // Plant and Cell Physiol. – 1981 – Vol. 22, № 5. – P. 867–880.

10. Greenberg Ch.S. Rapid single step membrane protein assay / Ch.S. Greenberg, Rh.R. Gaddock // Clin. Chem. – 1982. – Vol. 28, № 7. – P. 1726–1728.

Рецензент – доктор біологічних наук, професор **Ю.І. Грицан**