

УДК 582.32:54.06

**ВПЛИВ СВИНЦЮ НА СТАН ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЇ
РІВНОВАГИ У ПАГОНАХ ВОДНОГО МОХУ
FONTINALIS ANTIPIRETTICA HEDW.**

Н. Кияк*, І. Микієвич**

**Інститут екології Карпат НАН України
вул. Стефаника, 11, Львів 79000, Україна
e-mail: morphogenesis@mail.lviv.ua*

***Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: biofr@franko.lviv.ua*

Досліджували вплив свинцю на динаміку ліпопероксидації та активності супероксиддисмутази у пагонах водного моху *Fontinalis antipyretica* Hedw. Встановлено, що на початкових етапах свинцевого стресу відбувалося зміщення рівноваги у системі прооксиданти↔антиоксиданти у напрямі активації пероксидного окиснення. 30- та 60-хвилинні експозиції з важким металом індукували підвищення активності СОД. Виявлено кількісні зміни в електрофоретичному спектрі СОД за дії свинцю.

Ключові слова: *Fontinalis antipyretica*, свинець, дієнові кон'югати, МДА, супероксиддисмутаза.

У рослинному організмі одним із можливих компонентів швидкої реакції на стрес є активація пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ). ПОЛ у клітині підтримується на постійному рівні завдяки існуванню багаторівневої антиоксидантної захисної системи. Тому збалансованість між обома частинами цієї системи – пероксидним окисненням з одного боку й антиоксидантною активністю з іншого – є важливою умовою для збереження нормальної життєдіяльності клітини. Вважається, що зміщення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги є однією з перших неспецифічних ланок у розвитку стрес-реакції та може слугувати, згідно з В.А. Барабой [1], тією біологічно важливою зміною внутрішнього середовища рослинної клітини, яка запускає інші механізми захисту.

Значною кількістю робіт продемонстровано, що загальною реакцією-відповіддю рослин на дію таких важких металів, як свинець, кадмій, мідь, цинк і хром, є посилене утворення та нагромадження активних форм кисню (АФК) й активація процесів ПОЛ [22]. Реакція мохів на дію важких металів висвітлена у багатьох публікаціях [21, 25]. Специфіка їх анатомо-морфологічної структури та здатність поглинати й акумулювати високі концентрації іонів важких металів стали передумовою для використання цих рослин як біоіндикаторів забруднення атмосферного і водного середовищ, а також як модельних об'єктів для дослідження морфологічних і геномних змін, спричинених дією важких металів [12, 24].

Механізми оксидного стресу, індукованого важкими металами, досить докладно вивчені на прикладі квіткових рослин [8, 16] і значно слабше – на прикладі мохів [23]. Тому, метою роботи було дослідження динаміки процесу ПОЛ і антиоксидантного захисту у пагонах водного моху *Fontinalis antipyretica* Hedw. як можливих факторів первинної реакції рослинного організму на дію стресу, спричиненого свинцем.

Об'єктом дослідження були рослини водного моху *Fontinalis antipyretica*. Для аналізу використовували пагони, вирощені в лабораторній культурі у контрольованих

умовах температури (20–22°C), вологості (85–90%) та освітлення (2500 лк) [4]. Обробку свинцем здійснювали шляхом внесення рослинного матеріалу у водне поживне середовище Кноп-II, що містило ацетат свинцю у концентраціях 1,0; 10,0 та 100,0 мкмоль/л. Тривалість експозиції – 15, 30, 60 хв та 48 год. Контролем були рослини, які не обробляли розчином важкого металу.

Пероксидне окиснення ліпідів оцінювали за вмістом первинних продуктів – дієнових кон'югатів (ДК) і кінцевого продукту ліпопероксидації – малонового диальдегіду (МДА). Для визначення кількості дієнових кон'югатів наважку рослинного матеріалу гомогенізували в 0,1 М калій-фосфатному буфері (рН 7,0), додавали суміш гептан-ізопропанол (1:1) та екстрагували протягом 20 хв. Вміст ДК визначали спектрофотометрично у гептановому шарі за довжини хвилі 232 нм та виражали в одиницях абсорбції [3].

Для визначення концентрації МДА рослинний матеріал гомогенізували у 20% розчині трихлороцтової кислоти й інкубували з 0,5% розчином тіобарбітурової кислоти. Вміст МДА визначали спектрофотометричним методом за довжини хвилі 532 нм і виражали в нМ на 1 г сирової маси [9].

Для визначення активності супероксиддисмутази (СОД) рослинний матеріал гомогенізували в 0,15 М фосфатному буфері (рН 7,8) й екстрагували протягом 30 хв при кімнатній температурі. Супернатант, отриманий після центрифугування (10 хв, 5000 g), додавали до інкубаційного середовища, що містило 0,33 мМ ЕДТА, 0,4 мМ нітросиній тетразолій, 0,01 мМ феназинметсульфат та 0,8 мМ НАДФН. Оптичну густину розчину вимірювали спектрофотометрично за довжини хвилі 540 нм. Активність СОД виражали в умовних одиницях на мг білка за хв [11].

Концентрацію білка визначали за методом Бредфорда [14].

Електрофоретичний аналіз рослинних зразків здійснювали на поліакриламідному гелі з використанням диск-електрофорезу [25]. Для виявлення супероксиддисмутази застосовували інкубаційне середовище з нітросинім тетразолієм [6].

Досліди проводили у трьох повторностях. Одержані результати вважали статистично ймовірними, якщо $p < 0,05$. Побудову графіків здійснювали за допомогою прикладної програми „Microsoft Excel 2000”.

У пагонах *F. antipyretica*, які інкубували протягом 48 год у розчинах ацетату свинцю, визначали вміст продуктів ПОЛ. Встановлено, що зі зростанням стресового впливу свинцю відбувалося підвищення вмісту первинних продуктів ліпопероксидації – дієнових кон'югатів (ДК). Так, їх кількість у пагонах водного моху під впливом 10,0 та 100,0 мкмоль/л ацетату свинцю зростала в 1,2–1,5 рази порівняно з контролем (табл. 1). Відомо, що підвищення рівня ДК у клітинах є чутливим тестом на появу гідроперекисів і, відповідно, на активацію ПОЛ [8]. Отримані дані узгоджуються з визначеним рівнем одного з кінцевих продуктів ПОЛ – малонового диальдегіду (МДА), кількість якого теж зростала у рослинному матеріалі під впливом свинцю (табл. 1).

Отже, свинцевий стрес індукує зростання процесу ПОЛ у пагонах водного моху *F. antipyretica*, свідченням чого є суттєве підвищення вмісту дієнових кон'югатів і МДА. Ці зміни, очевидно, можуть слугувати пусковим механізмом для відповідних захисних систем. У наших дослідженнях показано, що у результаті 48-годинної експозиції пагонів фонтіналіса у розчинах з оцтовокислим свинцем активність супероксиддисмутази (ферменту, котрий утилізує $O_2^{\cdot-}$ та перешкоджає ініціації ПОЛ) підвищувалася на 25–30% (табл. 2). Збільшення активності ферменту могло бути обумовлене активацією його латентних форм і (або) синтезом нових молекул ферменту [2]. Із літературних джерел

Таблиця 1

Вплив ацетату свинцю на вміст продуктів ПОЛ у пагонах *F. antipyretica*

Концентрації ацетату свинцю	Вміст дієнових кон'югатів, од. абсорб./мл	Вміст МДА, нмоль/г маси сирової речовини
Контроль (без металу)	12,8±0,6	31,3±1,2
1,0 мкмоль/л	13,2±1,4	33,9±0,9
10,0 мкмоль/л	17,4±0,8*	41,7±0,8*
100,0 мкмоль/л	18,9±1,1*	44,5±1,3*

Примітка. * – різниця порівняно з контролем статистично достовірна при $p < 0,05$.

відомо, що в рослинних клітинах присутні 3 типи СОД: Cu/Zn-СОД, Mn-СОД та Fe-СОД [13]. Експресія генів СОД є чутливою до редокс-стану клітини, тому підвищення вмісту активних форм кисню в умовах оксидного стресу є сигналом до її активації [18]. У нашій роботі було досліджено вплив ацетату свинцю на електрофоретичний спектр множинних молекулярних форм супероксиддисмутази у пагонах *F. antipyretica*. Як видно на рис. 1, електрофореграма СОД представлена трьома фракціями з молекулярними масами 33, 40 та 49 кДа. Експозиція рослинного матеріалу у середовищі з ацетатом свинцю призвела до кількісних змін у спектрі СОД. Із підвищенням концентрації важкого металу спостерігалось послаблення фракції з молекулярною масою 33 кДа та суттєве посилення інтенсивності фракції з молекулярною масою 49 кДа порівняно з контролем. Очевидно, це може свідчити про існування координації експресії різних видів СОД. Аналогічно було показано, що у рослинах з надекспресією Fe-СОД експресія цитозольної та хлоропластної Cu/Zn-СОД була пригніченою [27].

Отже, результати наших експериментів дають змогу говорити про те, що у пагонах *F. antipyretica* в умовах стресового впливу, індукованого свинцем, відбувається активація СОД. Відомо, що у разі досить інтенсивного стресу може включатися синтез

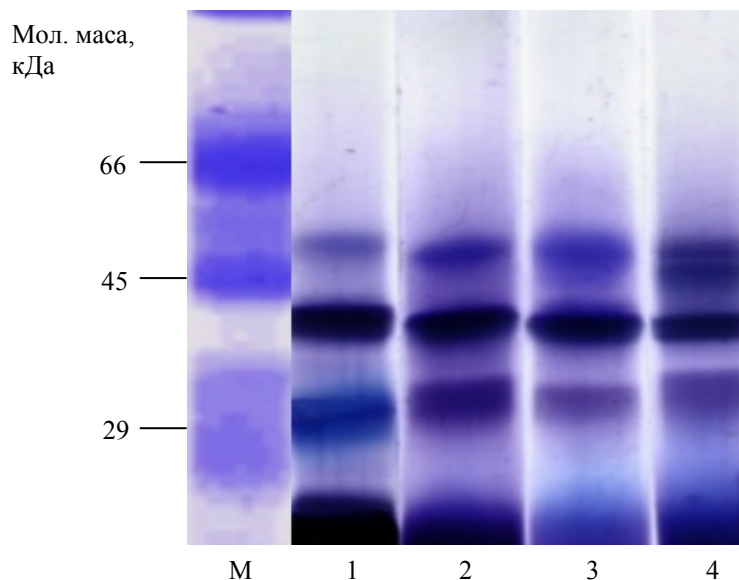


Рис. 1. Вплив ацетату свинцю на електрофоретичний спектр супероксиддисмутази у пагонах водного моху *F. antipyretica*: М – маркер молекулярних мас; 1 – контроль; 2 – 1,0 мкмоль/л ацетату свинцю; 3 – 10,0 мкмоль/л; 4 – 100,0 мкмоль/л.

нових мРНК та молекул СОД. Так, одночасне збільшення активності СОД і кількості відповідних білків було відзначено в умовах сольового стресу в хлоропластах гороху [17], у листках толерантного сорту *Lycopersion pennelii* [19], у хлоропластах пшениці під впливом міді [20]. Іншими словами, в кожному конкретному випадку активність ферменту регулюється відповідно до метаболічних потреб клітин, які залежать від інтенсивності стресового впливу, його тривалості та чутливості рослин.

Виходячи з того, що 48-годинна дія свинцю впливає на зміщення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги у пагонах водного моху, ми дослідили динаміку процесу ПОЛ і активності супероксиддисмутази на ранніх етапах впливу важкого металу – в умовах коротких (15, 30 і 60 хв.) експозицій. Установлено, що короткотривала 15-хвилинна обробка пагонів *F. antipyretica* розчином ацетату свинцю в концентрації 1,0–100,0 мкмоль/л призводила до зростання вмісту початкових продуктів ПОЛ – дієнових кон'югатів у 1,5 рази з поступовим їх зниженням при тривалій експозиції (рис. 2, А).

Вміст малонового діальдегіду у зразках залежав як від тривалості експозиції зі свинцем, так і від концентрації важкого металу. 15-хвилинна експозиція рослинного матеріалу у розчині ацетату свинцю практично не впливала на вміст цієї сполуки, і лише обробка металом тривалістю 30 і 60 хв у концентраціях 10,0–100,0 мкмоль/л індукувала зростання вмісту МДА (рис. 2, Б).

Активність СОД теж суттєво залежала від тривалості свинцевого стресу. У перші хвилини реакції активність ферменту не перевищувала контрольного варіанту, після 30-хвилинної експозиції у розчині з ацетатом свинцю активність зростала на 20%, а максимум активності СОД було відзначено після 1-годинної експозиції з металом – на 40% вище активності контрольного варіанту (табл. 2).

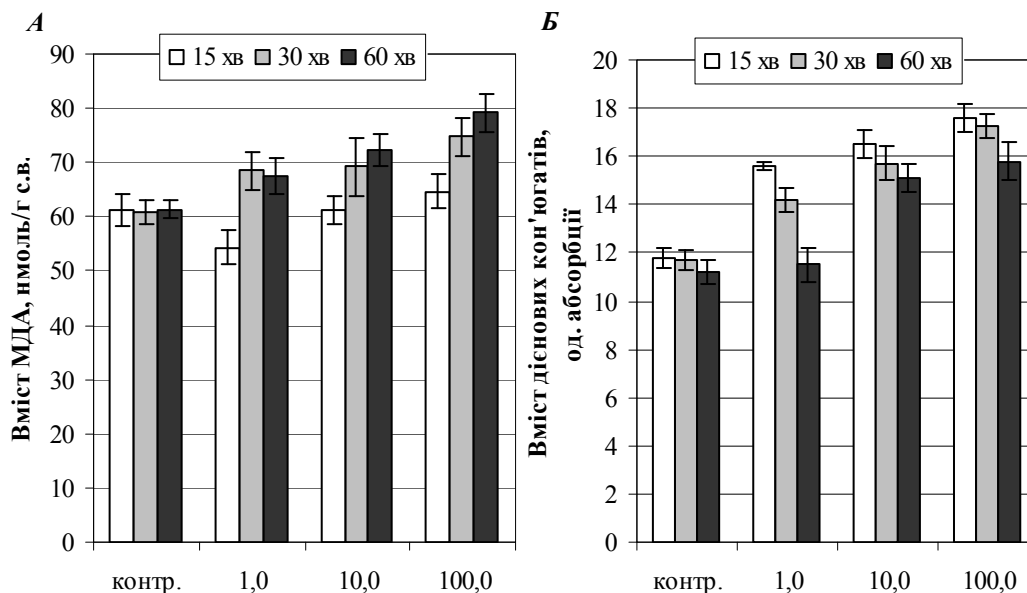


Рис. 2. Вплив ацетату свинцю на динаміку вмісту продуктів ПОЛ у пагонах *F. antipyretica*: А – дієнові кон'югати; Б – малоновий діальдегід. 1,0–100,0 – концентрації ацетату свинцю (мкмоль/л); контр. – контроль (без металу). 15 хв, 30 хв, 60 хв – тривалість реакції зі свинцем.

Таблиця 2

Вплив ацетату свинцю на динаміку активності супероксиддисмутазу у пагонах *F. antipyretica*

Концентрації ацетату свинцю, кмоль/л	Активність СОД, відн. од./ мг білка/ хв			
	15 хв реакції	30 хв реакції	60 хв реакції	48 год реакції
Контроль (без металу)	191,2±8,6	195,4±5,5	193,7±4,5	236,3±6,2
1,0	112,5±5,8*	192,7±9,8	218,9±7,2	247,6±7,5
10,0	158,7±11,8*	238,3±7,8*	271,8±10,2*	313,5±6,8*
100,0	188,5±8,1	230,2±10,2*	267,5±7,5*	293,2±5,1*

Примітка. * – різниця порівняно з контролем статистично достовірна при $p < 0,05$.

Отже, обговорюючи результати наших досліджень, слід зауважити, що пероксидне окиснення й антиоксидантний потенціал у пагонах *F. antipyretica* змінюються в часі. 15-хвилинна дія оцтовокислого свинцю на рослини призводила до суттєвого зростання первинних продуктів ПОЛ. Концентрація МДА й активність супероксиддисмутазу зберігалися на рівні контрольного варіанту. 30- та 60-хвилинні експозиції з важким металом індукували зворотний процес: зниження вмісту первинних продуктів ПОЛ, зростання концентрації кінцевого продукту – МДА та суттєве підвищення активності СОД. Подібні результати щодо перебігу ПОЛ і стану антиоксидантної системи були встановлені у хлоропластах гороху в умовах теплового стресу [7], в умовах надмірного зволоження та водного дефіциту в пагонах ячменю [5].

Таким чином, результати наших досліджень свідчать про індукцію оксидного стресу в умовах токсичного впливу свинцю у пагонах *F. antipyretica*. Активація ПОЛ на початкових етапах свинцевого стресу слугує підтвердженням можливої ролі продуктів ліпопероксидації як медіаторів стресу в рослинах. Зворотне зміщення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги, виявлене у наших дослідках, очевидно, є важливою ланкою в процесі формування адаптивних реакцій рослини на свинцевий стрес.

1. Барабой В. А. Механизмы стресса и перекисное окисление липидов // Успехи современной биологии. 1991. Т. 11. Вып. 6. С. 923–932.
2. Бараненко В. В. Супероксиддисмутаз в клетках растений // Цитология. 2006. Т. 48. № 6. С. 465–474.
3. Гаврилов В. Б., Мишкорудная М. И. Спектрофотометрическое определение содержания диеновых гидроперекисей липидов в плазме крови // Лаб. дело. 1983. № 3. С. 33–35.
4. Демкив О. Т., Сытник К. М. Морфогенез архегоният. К.: Наук. думка, 1985. 204 с.
5. Калашников Ю. Е., Балахнина Т. И., Закржевский Д. А. Действие почвенной гипоксии на активацию кислорода и систему защиты от окислительной деструкции в корнях и листьях ячменя // Физиол. раст. 1994. Т. 41. № 4. С. 583–588.
6. Корочкин Л. И., Серов О. Л., Пудовкин А. И. и др. Генетика изоферментов. М.: Наука, 1977. 275 с.
7. Курганова Л. Н., Веселов А. П., Гончарова Т. А., Синицына Ю. В. Перекисное окисление липидов и антиоксидантная система защиты хлоропластов гороха при тепловом шоке // Физиология растений. 1997. Т. 44. № 5. С. 725–730.
8. Мерзляк М. Н. Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки // Итоги науки и техники. Сер. Физиология растений. М.: ВИНТИ, 1989. 167 с.

9. Мусиенко М. М., Паршикова Т. В., Славный П. С. Спектрофотометрические методы в практике физиологии, биохимии и экологии растений. К.: Фитосоцицентр, 2001. 200 с.
10. Пескин А. В., Столяров С. Д. Окислительный стресс как критерий оценки окружающей среды // Изв. АН СССР. Сер. Биол. 1994. С. 588–595.
11. Чвари С., Андял Т., Штрэнгер Я. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте // Лаб. дело. 1991. № 3. С. 95–99.
12. Bargagli R. Mosses as passive and active biomonitors of trace elements // Trace Elements in Terrestrial Plants. / Ed. Bargagli R. – Springer-Verlag, Berlin. 1998. P. 207–236.
13. Bowler C., Van Camp W., Van Montagu M., Inze D. Superoxide dismutase in plants // Crit. Rev. Plant Sci. 1994. Vol. 13. P. 199–218.
14. Bredford W. A simple method for protein test // Annal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248–252.
15. Choudhury S., Panda S. K. Induction of oxidative stress and ultrastructural changes in moss *Taxithelium nepalense* (Schwaegr.) Broth. under lead (Pb) and arsenic (As) phytotoxicity // Curr. Sci. 2004a. Vol. 87. P. 342–348.
16. Gille G., Sigler K. Oxidative stress and living cells // Folia Microbiol. 1995. Vol. 40. P. 131–152.
17. Gomez J., Jimenez A., Olmos E., Sevilla F. Location and effects of long-term NaCl stress on superoxide dismutase and ascorbate peroxidase isoenzymes of pea (*Pisum sativum*, cv. Puget) chloroplasts // J. Exp. Bot. 2003/4. Vol. 55. P. 119–130.
18. Herbertte S., Lene C., de Iabrouhe D., Drevet J., Roeckel-Drevet P. Transcripts of sunflower antioxidant scavengers of the SOD and GPX families accumulate differentially in response to downy mildew infection, phytohormones, reactive oxygen species, nitric oxide, protein kinase and phosphatase inhibitors // Physiol. Plant. 2003. Vol. 119. P. 418–428.
19. Mittova V., Tal M., Volokita M., Guy M. Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii* // Plant. Cell Envir. 2003. Vol. 26. P. 845–856.
20. Navari-Izzo F., Milone M. T. A., Quartacci M. F. et al. Metabolic changes in wheat plant subjected to a water-deficit stress programme // Plant Sci. 1993. Vol. 92. P. 151–157.
21. Panda S. K. Heavy metal phytotoxicity induces oxidative stress in a moss, *Taxithelium* sp. // Curr. Sci. 2003. Vol. 84. P. 631–663.
22. Panda S. K., Choudhury I., Khan M. H. Heavy metal induced lipid peroxidation affects antioxidants in wheat leaves // Biol. Plant. 2003. Vol. 46. P. 289–294.
23. Saxena A., Saxena D.K., Srivastava H. S. The influence of glutathione on physiological effects of lead and its accumulation in moss *Sphagnum squarrosum* // Water Air Soil Pollut. 2003. Vol. 143. P. 351–361.
24. Sidhu M., Brown D. H. A new laboratory technique for studying the effect of heavy metals on bryophyte growth // Ann. Bot. 1996. Vol. 78. P. 711–717.
25. Taylor P. Analysis of moss dehydrogenases by polyacrylamide disco-electrophoresis // Can. J. Bot. 1970. Vol. 48. P. 367–369.
26. Tyler G. Bryophytes and heavy metals: a literature review // Bot. J. Linn. Soc. 1990. Vol. 104. P. 231–253.
27. Van Camp W., Herouart D., Willekens H. et al. Tissue-specific activity of two manganese superoxide dismutase promoters in transgenic tobacco // Plant Physiol. 1996b. Vol. 112. P. 525–535.

**INFLUENCE OF LEAD ON THE STATE OF PROOXIDATIVE-
ANTIOXIDATIVE EQUILIBRIUM IN THE SHOOTS OF AQUATIC MOSS
FONTINALIS ANTIPYRETICA HEDW.**

N. Kyjak*, I. Mykiyevych**

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

***Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskyyi St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: biofr@franko.lviv.ua*

The influence of lead on dynamics of lipid peroxidation and activity of superoxide dismutase in shoots of aquatic moss *Fontinalis antipyretica* Hedw. was investigated. It was fixed activation of lipid peroxidation on the initial stages of lead stress. 30- and 60-minute expositions with heavy metal induced increasing of superoxide dismutase activity. The quantitative changes in the electrophoretic spectrum of SOD under lead influence were revealed.

Key words: Fontinalis antipyretica, lead, diene conjugates, malonic dialdehyde, superoxide dismutase.

**ВЛИЯНИЕ СВИНЦА НА СОСТОЯНИЕ ПРООКСИДАНТНО-
АНТИОКСИДАНТНОГО РАВНОВЕСИЯ В ПОБЕГАХ ВОДНОГО МХА
FONTINALIS ANTIPYRETICA HEDW.**

Н. Кияк*, И. Микиевич**

**Институт экологии Карпат НАН Украины
ул. Стефаника, 11, Львов 79000, Украина
e-mail: morphogenesis@mail.lviv.ua*

***Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина
e-mail: biofr@franko.lviv.ua*

Исследовали влияние свинца на динамику липопероксидации и активности супероксиддисмутазы в побегах водного мха *Fontinalis antipyretica* Hedw. Установлено, что на начальных этапах свинцового стресса происходило смещение равновесия в системе прооксиданты-антиоксиданты в направлении активации перекисного окисления. 30- и 60-минутные экспозиции с тяжелым металлом индуцировали повышение активности СОД. Выявлены количественные изменения в электрофоретическом спектре СОД при воздействии свинца.

Ключевые слова: Fontinalis antipyretica, свинец, диеновые конъюгаты, МДА, супероксиддисмутаза.

Стаття надійшла до редколегії 30.01.09

Прийнята до друку 19.03.09