



УДК 582.32.575.17

ЗМІНИ АКТИВНОСТІ ФЕРМЕНТІВ АНТИОКСИДАНОГО ЗАХИСТУ У МОХІВ ЗА ДІЇ ІОНІВ МІДІ ТА ЦИНКУ

О. Л. Баїк

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

Аналізували зміни активності ферментів антиоксидантного захисту мохів *Furnaria hygrometrica* Hedw. та *Amblystegium serpens* (Hedw.) Schimp. за 36-годинної дії 1–100,0 мкМ сульфату міді й цинку. Показано, що високі концентрації Cu^{2+} і Zn^{2+} істотно змінюють активність основних ензиматичних систем антиоксидантного захисту мохів: СОД, пероксидази та каталази. Крім цього, аналіз ферментів антиоксидантного захисту вказує на диференційну чутливість досліджуваних видів мохів до дії сульфатів міді та цинку.

Ключові слова: мохи, ферменти антиоксидантного захисту, супероксиддисмутаза, пероксидаза, каталаза.

ВСТУП

В основі одного з головних механізмів токсичної дії важких металів (ВМ) лежить їхня здатність зв'язуватися з сірковмісними сполуками (перш за все, SH-групами білків), що призводить до зміни нативної конформації макромолекул та інактивації ферментів [1, 10]. Крім цього, порушуються бар'єрні властивості мембран [3] та ініціюється оксидний стрес [19].

Особливе місце серед ВМ займають мідь і цинк, які є життєво необхідними. Відомо, що мідь є ключовим компонентом, який забезпечує функціонування таких ферментів, як аскорбатоксидаза, галактозооксидаза та ін., а також ряду білків неферментативної природи. Цинк бере участь у роботі транскрипційних факторів [18]. Одним із головних проявів токсичної дії надлишку Cu^{2+} і Zn^{2+} у клітині є оксидний процес. Антиоксидантні системи клітин беруть участь у нейтралізації активних форм кисню (АФК). У нормально функціонуючій клітині існує динамічна рівновага між утворенням АФК і їх ліквідацією. Різні ізоформи ферментів антиоксидантного захисту працюють у різних клітинних компартментах, де відбувається утворення АФК в ході тих чи інших окисно-відновних реакцій [13, 14]. **Стресові фактори, в тому числі високі концентрації ВМ, провокують у клітинах рослин надпродукцію АФК і оксидний стрес** [11, 20]. Водночас роль цих молекул під час стресів двояка. Доведено, що у багатьох випадках H_2O_2 бере участь як вторинний месенджер у схемах передачі сигналів,

що включають системи захисту рослин від стресу, зокрема, індукцію синтезу ферментів антиоксидантного захисту. Найважливішими високомолекулярними антиоксидантами рослин, які безпосередньо знешкоджують АФК, є супероксиддисмутаза (СОД), пероксидаза та каталаза. Ферменти антиоксидантного захисту забезпечують комплексний захист біополімерів від АФК, вони розміщені в різних клітинних компартментах і мають різну спорідненість до АФК [4]. Метою роботи було дослідження змін активності ферментів антиоксидантного захисту у зразках мохів *Funaria hygrometrica* та *Amblystegium serpens* за дії різних концентрацій Cu^{2+} і Zn^{2+} у середовищі.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У двомісячних гаметофорів мохів *Funaria hygrometrica* Hedw. та *Amblystegium serpens* (Hedw.) Schimp аналізували активність ферментів антиоксидантного захисту за дії різних концентрацій сульфатів міді та цинку. Для аналізу гаметофори обробляли 1,0–100,0 мкМ розчинами CuSO_4 та ZnSO_4 впродовж 36 год і короткочасно промивали дистильованою водою, після чого визначали активність ферментів антиоксидантного захисту.

Для визначення антиоксидантних параметрів моху застосовували загальноприйняті методики [2, 7]. Принцип методу визначення СОД ґрунтується на відновленні нітротетразолію супероксидними радикалами, які утворюються під час реакції між феназинметасульфатом і відновленою формою нікотинаміддинуклеотиду (NAD-H). Суть визначення каталази полягає в тому, що вона руйнує субстрат H_2O_2 , а незруйновану частину перекису водню, що залишилась, вимірюють за допомогою молібдату натрію. Для молібдену характерне утворення при взаємодії з перекисом водню перекисних сполук Na_2MoO_6 , які мають жовтий колір. Інтенсивність процесів пероксидації ліпідів оцінювали за нагромадженням у гаметофорах моху малонового диальдегіду (МДА) [5]. Вміст білка у зразках визначали за Бредфордом [9].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Активні форми кисню, що виникають під час оксидного стресу, змінюють активність ензиматичних антиоксидантних захисних систем. Про ступінь оксидного стресу судять за нагромадженням МДА – продукту перекисного окиснення ліпідів мембран [13, 17, 21]. У відповідь на стресові фактори в клітинах рослин збільшується вміст МДА, що пов'язано з активацією в цих умовах вільнорадикальних реакцій. Досліджували вплив ZnSO_4 та CuSO_4 у концентрації 1,0–100,0 мкМ на вміст МДА й активність ферментів антиоксидантної системи мохів. Встановлено, що досліджувані мохи істотно відрізнялися в контролі за вмістом МДА: у *A. serpens* – $50,3 \pm 0,2$ нмоль/г сирової маси, у *F. hygrometrica* $29,4 \pm 0,2$ нмоль/г сирової маси. Показано, що після 36-годинної дії 100 мкМ Zn^{2+} вміст МДА зростав у *A. serpens* в 1,3 разу, у *F. hygrometrica* – в 1,4 разу. Натомість, виявлено, що навіть за низьких концентрацій (1,0 мкМ) Cu^{2+} вміст МДА істотно підвищувався: у *A. serpens* в 1,3 разу, у *F. hygrometrica* в 1,5 разу, а за концентрації 100 мкМ – у 2,0–2,5 разу відповідно (рис. 1). Пояснюється це тим, що іони міді для рослин значно токсичніші, ніж цинку, що й спричинює зростання інтенсивності перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ).

Біохімічний аналіз досліджуваних видів мохів *F. hygrometrica* і *A. serpens* показав відмінності у роботі деяких ферментів АОС, зокрема, СОД, пероксидази та каталази за дії Zn^{2+} і Cu^{2+} . СОД є ключовим ферментом, який відіграє важливу роль

у захисті рослинних клітин від токсичної дії АФК, що утворюються під впливом ВМ, і запобігає патологічним змінам. Зростання активності СОД у 1,5 рази в *A. serpens* уже за концентрації міді у середовищі 1,0 мкМ дає змогу припустити, що ця концентрація є стресовим фактором, що активує ферменти-протектори, які запускають розвиток адаптивних реакцій. Показано, що збільшення вмісту Cu^{2+} в середовищі до 100 мкМ призводить до зростання активності СОД в *A. serpens* у 2,8 рази, а у *F. hygrometrica* – в 1,7 рази (рис. 2).

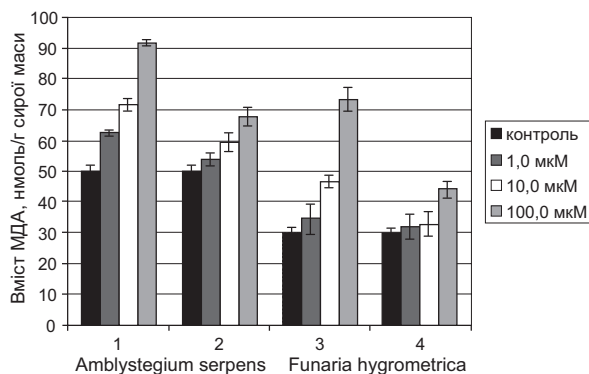


Рис. 1. Вміст МДА мохів *Amblystegium serpens* та *Funaria hygrometrica* за дії різних концентрацій сульфатів міді (1, 3) та цинку (2, 4)

Fig. 1. Changes of MDA contents in the moss *Amblystegium serpens* and *Funaria hygrometrica* under action of copper sulfate and zinc sulfate of different concentrations

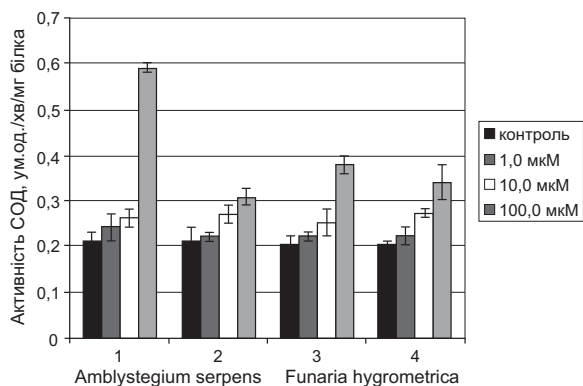


Рис. 2. Зміна активності СОД мохів *Amblystegium serpens* та *Funaria hygrometrica* за дії різних концентрацій сульфатів міді (1, 3) та цинку (2, 4)

Fig. 2. Changes of activity of superoxide dismutase (SOD) in the moss *Amblystegium serpens* and *Funaria hygrometrica* under action of copper sulfate and zinc sulfate of different concentrations

Низькі концентрації (1,0–10,0 мкМ) сульфату цинку неістотно впливали на активність СОД обох досліджуваних видів. Однак збільшення концентрації ZnSO_4 до 100,0 мкМ у поживному середовищі спричиняло зростання активності СОД у *A. serpens* в 1,5, а у *F. hygrometrica* – в 1,7 рази відповідно (рис. 2).

Важливу роль у системі захисту від АФК відіграє пероксидаза, що попереджує надлишкове нагромадження перекису водню. На відміну від багатьох інших ферментів пероксидаза характеризується поліфункціональністю і високою гетерогенністю своєї ізоферментної системи. Відомо, що підвищення активності пероксидази корелює зі збільшенням техногенного навантаження на рослини [3]. Підвищення концентрації Cu^{2+} у середовищі до 100,0 мкМ призводило до збільшення активності пероксидази в *F. hygrometrica* й *A. serpens* у 2,1–2,3 рази, порівняно з контролем. Сублетальні концентрації Zn^{2+} спричинювали збільшення активності пероксидази в *A. serpens* у 1,5 рази, а у *F. hygrometrica* – у 2,5 рази (рис. 3).

Можна припустити, що таке зростання активності пероксидази у *F. hygrometrica* за дії Zn^{2+} компенсувалося зниженням активності каталази в 1,3 рази (рис. 4)

і опосередковано свідчило про значне нагромадження АФК. Подібні зміни активності пероксидази і каталази пояснюються тим, що їх функціонування пов'язане з H_2O_2 , вміст якого контролюють обидва ферменти. Отримані результати узгоджуються з дослідженнями на інших вищих рослинах [15, 16]. Очевидно, зростання активності пероксидази у *F. hygrometrica* виконувало компенсаторну функцію. Натомість, у гаметофорах *A. serpens* збільшення вмісту Zn^{2+} до сублетальних концентрацій призводило до зростання активності як пероксидази в 1,5 разу, так і каталази в 1,7 разу (рис.3, 4).

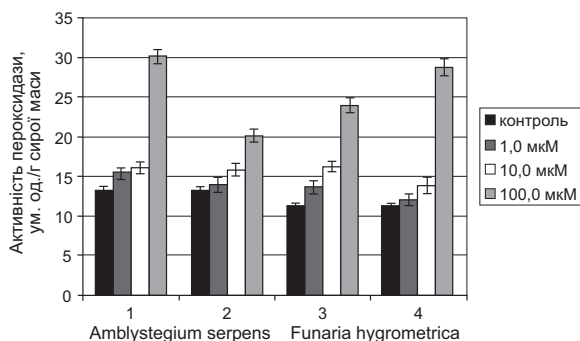


Рис. 3. Активність пероксидази мохів *Amblystegium serpens* і *Funaria hygrometrica* за дії різних концентрацій сульфатів міді (1, 3) та цинку (2, 4)

Fig. 3. Changes of activity of peroxidase in the moss *Amblystegium serpens* and *Funaria hygrometrica* under action of copper sulfate and zinc sulfate of different concentrations

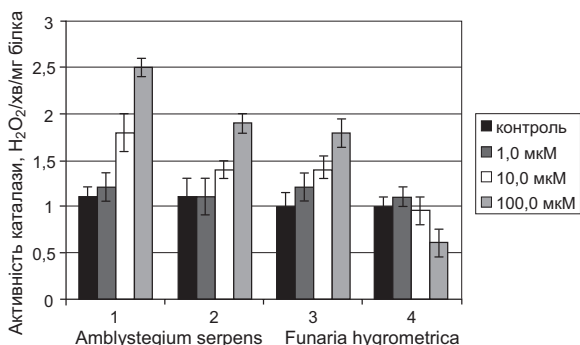


Рис. 4. Активність каталази мохів *Amblystegium serpens* і *Funaria hygrometrica* за дії різних концентрацій сульфатів міді (1, 3) та цинку (2, 4)

Fig. 4. Changes of activity of catalase in the moss *Amblystegium serpens* and *Funaria hygrometrica* under action of copper sulfate and zinc sulfate of different concentrations

Відомо, що значну роль у реакціях рослин на несприятливі умови середовища, у тому числі на токсичний вплив ВМ, відіграють окисно-відновні процеси, що відбуваються за участю кисневих радикалів. Радикальні форми кисню та продукти їх перетворення можуть змінювати активність ферментів і спричинювати деградацію білків тощо [8, 12].

ВИСНОВОК

Високі концентрації сульфату цинку та сульфату міді істотно змінюють активність основних ензиматичних систем антиоксидантного захисту мохів: СОД, пероксидази, каталази. Крім цього, аналіз ферментів антиоксидантного захисту вказує на диференційну чутливість досліджуваних видів мохів до дії Zn^{2+} і Cu^{2+} .

1. *Иванов В.Б., Быстрова Д.И., Серегин И.В.* Сравнение влияния тяжелых металлов на рост корня в связи с проблемой специфичности и избирательности их действия. **Физиология растений**, 2003; 50: 445–454.

2. *Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е.* Метод определения активности каталазы. **Лабораторное дело**, 1988; 1: 16–19.
3. *Лукаткин А.С., Башмаков Д.И., Кипайкина Н.В.* Протекторная роль обработки тиодиазуроном проростков огурца при действии тяжелых металлов и охлаждения. **Физиология растений**, 2003; 50: 346–348.
4. *Рачковская М.М., Ким Л.О.* Изменение активности некоторых оксидаз как показатель адаптации растений к условиям промышленного загрязнения. В кн.: **Газоустойчивость растений** / Под ред. В.С. Николаевского. Новосибирск: Наука, 1980: 117–126.
5. *Стальная Н.Д., Гаришвили Т.Г.* Метод определения МДА с помощью ТБК. В кн.: **Современные методы в биохимии**. Москва: Медицина, 1977. 66 с.
6. *Тарчевский И.А.* **Сигнальные системы клеток растений**. Москва: Наука, 2002. 294 с.
7. *Чевари С., Андян Т., Штрэнгер Я.* Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте. **Лабораторное дело**, 1991; 10: 9–13.
8. *Чиркова Т.В.* **Физиологические основы устойчивости растений**. Санкт-Петербург: Изд-во Санкт-Петербург. ун-та, 2002. 244 с.
9. *Bredford W.A.* A simple method for protein test. **Annal. Biochem**, 1976; 72: 248–252.
10. *De Vos C.H.R., Schat H., de Waal M.A.M.* et al. Increased resistance to copper-induced damage of the root cell plasmalemma in copper tolerant *Silene cucubalus*. **Physiol. Plant**, 1991; 82: 523–528.
11. *Gechev T., Gadjevi I., van Breusgem E.* et al. Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. **Cell Mol. Life Sci**, 2002; 59: 708–714.
12. *Merzlyak M.N., Hendry G.A.* Free radical metabolism, pigment degradation and lipid peroxidation in leaves during senescence. **Proc. Royal Soc**, Edinburgh, 1994; 102B: 459–471.
13. *Mittler R.* Oxidative stress, antioxidants, and stress tolerance. **Trends Sci**, 2002; 7: 405–409.
14. *Nakano Y., Asada K.* Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiol**, 1981, 22: 867–880.
15. *Panda S.K.* Heavy metal phytotoxicity induces oxidative stress in moss, *Taxithelium* sp. **Curr. Sci**, 2003; 84: 631–663.
16. *Panda S.K., Chaudhury I., Khan M.N.* Heavy metals induce lipid peroxidation and affect antioxidants in wheat leaves. **Biol. Plant**, 2003; 46: 289–294.
17. *Prasad K.V.S.K., Saradhi P.P., Sharmila P.* Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in *Brassica juncea*. **Environ. Exp. Bot**, 1999; 42: 1–10.
18. *Ramesh S.A., Shin R., Eide D.J., Schachman D.P.* Differential metal selectivity and gene expression of two zinc transporters from rice. **Plant Physiol**, 2003; 133: 126–134.
19. *Schuetzenduebel A., Polle A.* Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. **J. Exp. Bot**, 2002; 53: 1351–1365.
20. *Smirnoff N.* Ascorbic acid: metabolism and function of a multi-faceted molecule. **Curr. Opin. Plant Biol**, 2000; 3: 229–235.
21. *Sudhakar C., Lakshmi A., Giridarakumar S.* Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. **Plant Sci**, 2002; 161: 613–619.

CHANGES IN MOSS ENZYMES OF ANTIOXIDANT DEFENSE UNDER THE ACTION OF COPPER AND ZINC IONS

O. L. Baik

Institute of Ecology of the Carpathians, NAS of Ukraine, 11, Stefanyk St., Lviv 79000, Ukraine

Changes in activity of moss enzymes of antioxidant defense under the 36-hour duration action of 1,0–100,0 μM of copper and zinc sulfates were analysed in *Funaria*

hygrometrica Hedw. and *Amblystegium serpens* (Hedw.) Schimp. It has been shown that high concentrations of Cu^{2+} and Zn^{2+} essentially change the activity of main enzymes of moss antioxidative defense enzymes such as SOD, peroxidase and catalase. The analysis of these enzymes points to differential sensibility of the investigated moss species to copper sulfate and zinc sulfate action.

Key words: mosses, enzymes of antioxidative defense: superoxide dismutase, peroxidase, catalase.

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ У МХОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ИОНОВ МЕДИ И ЦИНКА

О. Л. Байк

Институт экологии Карпат НАН Украины, ул. Стефаника, 11, Львов 79000, Украина

Анализировали изменение активности ферментов антиоксидантной защиты мхов *Funaria hygrometrica* Hedw. и *Amblystegium serpens* (Hedw.) Schimp. после 36-часовой обработки 1–100,0 мкМ сульфатом меди и цинка. Показано, что высокие концентрации Cu^{2+} и Zn^{2+} существенно изменяют активность основных ферментатических антиоксидантных защитных систем мхов: СОД, пероксидазы, каталазы. Кроме этого, анализ указанных ферментов указывает на дифференциальную чувствительность исследованных видов мхов к действию сульфата меди и цинка.

Ключевые слова: мхи, ферменты антиоксидантной защиты, супероксиддисмутаза, пероксидаза, каталаза.

Одержано: 30.09.2009