

УДК 581.17; 581.19; 581.52

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС И УРОВЕНЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ОРГАНАХ ×TRITICOSECALE ПРИ ДЕЙСТВИИ КАДМИЯ**Гарифзянов А.Р., Ермакова И.А., Пантюхин Ю.О., Иванищев В.В.***ФГБОУ ВПО «Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого»,
Тула, e-mail: Garifzyanov86@yandex.ru*

Проведено исследование Cd-индуцированного развития окислительного стресса и динамики активности антиоксидантных ферментов в органах ×Triticosecale. Показано, что изменения редокс-гомеостаза у растений, выращенных на содержащей 0,04 мМ Cd²⁺ среде, носили органоспецифичный характер, обусловленный, по-видимому, преимущественной аккумуляцией кадмия в корнях. В проростках содержание пероксида достигало максимальной величины (39 ± 3 мкмоль/г сырой массы) уже к концу первого дня. Уровень пероксида в корнях после 12 часов увеличивался и оставался примерно на том же уровне до 24 ч. Одной из важнейших мишеней для пероксида являются липиды. Исследование показало, что в проростках уровень малонилдиальдегида в течение первого дня эксперимента возрастал в 1,5 раза. В корнях содержание МДА снижалось на 15% после 12 ч. Таким образом, «окислительный взрыв» в побегах в начальный период экспозиции включал повышение уровня H₂O₂ и детерминированную им интенсификацию перекисного окисления липидов. Это сопровождалось изменением активности аскорбатпероксидазы и гваяколовой пероксидазы. Увеличение активности гваяколовой пероксидазы в течение первых 12 ч эксперимента могло быть начальным звеном в ответе растений на стресс, который может быть связан с необходимостью разрушения пероксида, а также необходимостью укрепления клеточных оболочек за счет повышения их лигнификации. Стресс-динамика активности антиоксидантных ферментов свидетельствовал о разной их роли в органах растений тритикале для защиты от образующегося пероксида.

Ключевые слова: кадмий, окислительный стресс, пероксид водорода, малоновый диальдегид, аскорбатпероксидаза, гваяколовая пероксидаза

THE OXIDATIVE STRESS AND ANTIOXIDATIVE ENZYMES LEVELS IN ORGANS OF ×TRITICOSECALE IN THE PRESENCE OF CADMIUM**Garifzyanov A.R., Yermakova I.A., Pantyukhin Y.O., Ivanishchev V.V.***Tula state Lev Tolstoy pedagogical university, Tula, e-mail: Garifzyanov86@yandex.ru*

The research of the Cd-induced oxidative stress formation and dynamics of antioxidative enzymes levels has been studied in ×Triticosecale's organs. It was shown that alterations in a red-ox-gomeostasis of plants, growing on a mixture with 0,04 mmol/l of Cd²⁺ had a specific character. It was connected with preferential accumulation of cadmium in roots. In sprout the peroxide content reached the maximum value (39 ± 3 μmol/g wet weigh) already by the end of first day. The peroxide level in roots after 12 hours has increased and remained the same till 24 hs. One of the main targets for a peroxide reaction are lipids. The research has shown that in sprouts the malonyldialdehyde level for the first day of experiment has increased in 1,5-fold. In roots MDA level has decreased 15% after 12 hours. Thus «oxidative explosion» in sprouts included the increase of H₂O₂ level and lipid peroxidation level determined by a peroxide in an exposure initial stage. It was accompanied with alteration of ascorbate peroxidases and guaiacol peroxidases activities. The increase of a guaiacol peroxidase activity during the first 12 hs of experiment may be an initial part of a plant stressful response which could be connected with the necessity of a peroxide destroy, and also with the necessity of solidifying of cellular envelopes at the expense of their lignification. The stress dynamics of antioxidative enzymes activity said about different their roles in ×Triticosecale plant organs for protection from peroxide formation.

Keywords: cadmium, oxidative stress, hydrogen peroxide, malondialdehyde, ascorbate peroxidases, guaiacol peroxidases

Токсичность тяжелых металлов как широко распространенных поллютантов обуславливает пристальное внимание исследователей к загрязнению ими окружающей среды. При этом кадмий относят к числу наиболее опасных тяжелых металлов, поскольку он обладает высоким кумулятивным эффектом, не подвергается биодegradации и практически не выводится из организма [7]. Повышенное содержание кадмия в окружающей среде приводит к ингибированию роста, изменению интенсивности и направленности многих метаболических процессов в клетке [10]. В частности, установлено, что одной из неспецифических реакций растений на кадмий является развитие в клетках окислительного стресса,

основу которого составляет образование избыточного количества активных форм кислорода (АФК) [16].

Пероксид водорода, обладающий наибольшим временем жизни (около 1 мс) и способный диффундировать от места образования, является одним из важнейших кислородных редуцтантов, который в клеточных компартментах приводит к окислению липидов, углеводов, белков, повреждению ДНК и РНК, дезорганизации цитоскелета [8]. Одним из главных механизмов защиты является функционирование антиоксидантных ферментов, разлагающих H₂O₂. При этом многие особенности поддержания редокс-гомеостаза в данных условиях остаются по-прежнему не исследованными.

дованными. В связи с этим **цель** работы состояла в изучении временной динамики Cd-индуцированного развития окислительного стресса и сопутствующего функционирования ферментативной составляющей ликвидации пероксида водорода (аскорбатпероксидазы и гваяколпероксидазы) в органах тритикале.

Материал и методы исследования

Объектами исследования являлись побеги и корни тритикале озимого (*×Triticosecale* Wittm. & Camus), сорта Дон (семена любезно предоставлены ГНУ Тульский НИИСХ РАСХН). Семена предварительно стерилизовали в 2,5%-м растворе $KMnO_4$, после чего проращивали на фильтровальной бумаге в присутствии 1/10 среды Кнопа с микроэлементами по Хогланду. Десятидневные проростки пересаживали в вегетационные сосуды и выращивали в аэрируемой водной культуре на полной питательной среде. Растения выращивали при 12-часовом световом периоде, температуре воздуха $23 \pm 1/15 \pm 1^\circ C$ (день/ночь), относительной влажности воздуха – 55/75% (день/ночь) и освещенности 35 Вт/м². При достижении проростками фазы кушения, их пересаживали на питательный раствор, содержащий 0,04 мМ $Cd(NO_3)_2$. Побеги и корни после 12, 24, 48, 72 и 96 часов экспозиции на Cd-содержащем растворе исследовали непосредственно, а при необходимости фиксировали и хранили при температуре $-18^\circ C$.

Определение содержания пероксида водорода проводили по методу, основанному на образовании окрашенного комплекса пероксида титана [14]. Оценка степени перекисного окисления липидов (ПОЛ) была проведена по методу, основанному на определении соединений, взаимодействующих с тиобарбитуровой кислотой в пересчете на малоновый диальдегид (МДА) [13].

Активность гваяколовой пероксидазы (ПО) определяли в экстракте, содержащем Na/K-фосфатный буфер (рН 6,7), при 430 нм на спектрофотометре СФ-26 (Россия) по количеству образующегося пурпурогаллина ($\epsilon = 2,47/(mM \cdot cm)$) [2]. Активность аскорбатпероксидазы (АПО) определяли в цитратно/фосфатно-буферном экстракте (рН 6,0) по количеству окисленной аскорбиновой кислоты [12].

Каждый опыт проводили в трех биологических по три аналитических повторности. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью пакета прикладных компьютерных программ MS Excel 2003 и SigmaStat 3.1. В таблицах и на рисунках представлены средние арифметические значения определяемых величин и их стандартные ошибки ($P > 0,95$). К полученным данным применен стандартный однофакторный дисперсионный анализ с использованием для оценки достоверности при множественном сравнении фактического значения q -критерия Ньюмена-Кейсля.

Результаты исследования и их обсуждение

Проведенное исследование показало, что изменения в про/антиоксидантной системе тритикале озимого под действием 0,04 мМ Cd^{2+} носили органоспецифичный характер. В частности, в побегах количество H_2O_2 существенно возрастало и достигало максимального значения (39 мкмоль/г сырой массы) уже к концу 1-х суток экспозиции на Cd-содержащей среде, после чего оно несколько снижалось к 48 часам (до 32 мкмоль/г сырой массы) и оставалось примерно на одном уровне до конца эксперимента (рис. 1).

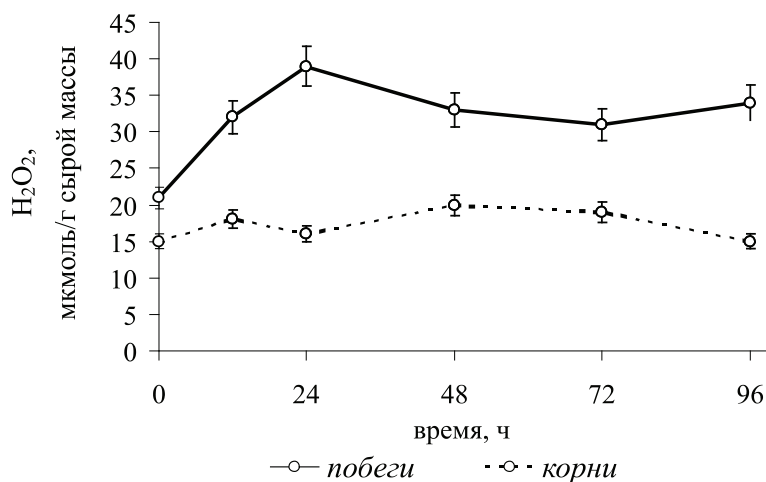


Рис. 1. Динамика образования H_2O_2 в органах тритикале под действием кадмия

В то же время количество H_2O_2 в корнях после повышения его уровня к 12-часам оставалось почти неизменным до 24 часов, после чего вновь повышалось к 48 часам. Далее количество H_2O_2 в корнях снижалось, достигая минимального значения к 96 часам (15 мкмоль/г сырой массы).

Известно, что кадмий при кратковременной обработке растений, накапливается преимущественно в корнях. Напр., Казнина с соавт. [7] показали, что у растений ячменя до 90% всего поглощенного за трое суток кадмия аккумулировалось в корневой системе. С этой позиции не вполне ясно,

почему содержание пероксида водорода в побегах к 24 часам нашего эксперимента увеличивалось практически вдвое. Возможно, какое-то незначительное количество металла проникло в побеги через апопласт. Такая возможность перемещения ионов показана, напр., для растений кукурузы [10]. С другой стороны, авторами [10] установлено, что кадмий практически не обнаруживался в клетках мезофилла.

Поэтому повышение уровня H_2O_2 в побегах, по-видимому, является опосредованной реакцией действия токсичных ионов на растения. Напр., в экспериментах Балахниной с соавт. [1] наблюдали снижение тургора, а также визуальные признаки водного стресса у гороха под действием кадмия, что могло быть связано с нарушением поглощения и транспорта воды, а также транспирации вследствие снижения устьичной проводимости [9], т.е. в результате подобных явлений нарастает осмотический стресс. В данных условиях в ходе фотосинтеза в хлоропластах происходит накопление НАДФН и АТФ, которые не успевают расходоваться вследствие нехватки CO_2 , а ЭТЦ начинает испытывать недостаток акцептора

(НАДФ⁺). Такое физиолого-биохимическое состояние фотосинтетического аппарата может провоцировать перенос электронов на O_2 и генерацию АФК [3].

Известно, что одной из основных мишеней действия пероксида, как и других АФК, являются липиды. Проведенное исследование показало, что в побегах количество малонового диальдегида (МДА), являющегося основным продуктом перекисного окисления фосфолипидов мембран, за первые сутки экспозиции на среде, содержащей Cd^{2+} , возрастало в 1,5 раза, после чего оставалось неизменным на уровне 0,24 мкмоль/г сырой массы до конца эксперимента. В корнях содержание МДА варьировалось, вначале снижаясь и достигая минимального значения к 24 часам (0,17 мкмоль/г сырой массы). К 48 часам оно увеличивалось и оставалось на уровне 0,21 мкмоль/г сырой массы до 72 часов, после чего вновь снижалось к 96 часам эксперимента (рис. 2). Обнаруженное нами снижение интенсивности ПОЛ после 12 часов в корнях и после 24 часов в побегах соответствовало процессам, наблюдаемым ранее в листьях гороха [1].

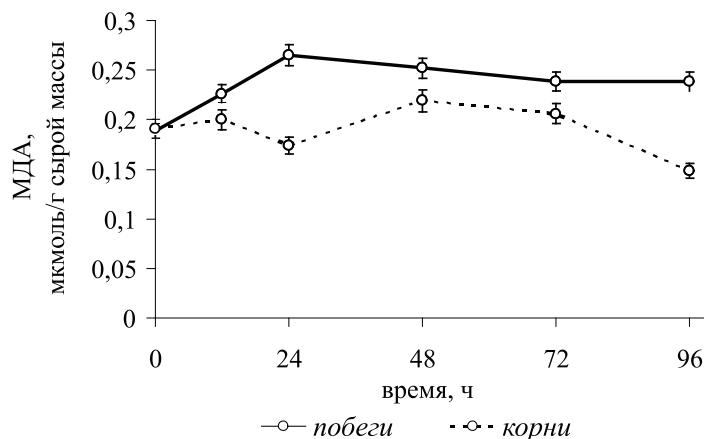


Рис. 2. Динамика накопления МДА в органах тритикале под действием кадмия

Возрастание интенсивности ПОЛ в начальный период экспозиции на Cd -содержащей среде могло быть связано с избыточной генерацией H_2O_2 в органах тритикале. Очевидное соответствие наблюдавшихся изменений (см. рис. 1 и 2) подтверждается высокими коэффициентами корреляции (r), рассчитанными для пары: количество пероксида и МДА. Они оказались равными 0,93 и 0,84 соответственно для побегов и корней. Радотик с соавт. [16] правильно полагают, что интенсивность ПОЛ определяется, с одной стороны, степенью развития окислительного стресса, а с другой — уровнем активности компонентов антиоксидантной системы. Поэтому наблюдавшийся

нами в начальный период стрессового воздействия кадмия «окислительный взрыв» (см. рис. 1) мог инициировать включение адаптационных механизмов. Одним из них является увеличение активности ферментов, разлагающих пероксид.

Было установлено, что активность ПО в побегах в течение первых 3-х суток оставалась примерно на одном уровне, после чего к 96 часам эксперимента увеличивалась, достигая 3,2 мкмоль/мин·г (рис. 3). Резкий рост содержания пероксида водорода (см. рис. 1) и незначительное возрастание активности ПО (рис. 3) в побегах в первые 48 часов эксперимента свидетельствуют о том, что данный фермент не игра-

ет существенной роли в разложении пероксида в побегах. Это может быть связано с наличием небольшого конститутивного

пула фермента, de novo синтезом которого можно объяснить повышение его активности к 96 часам эксперимента.

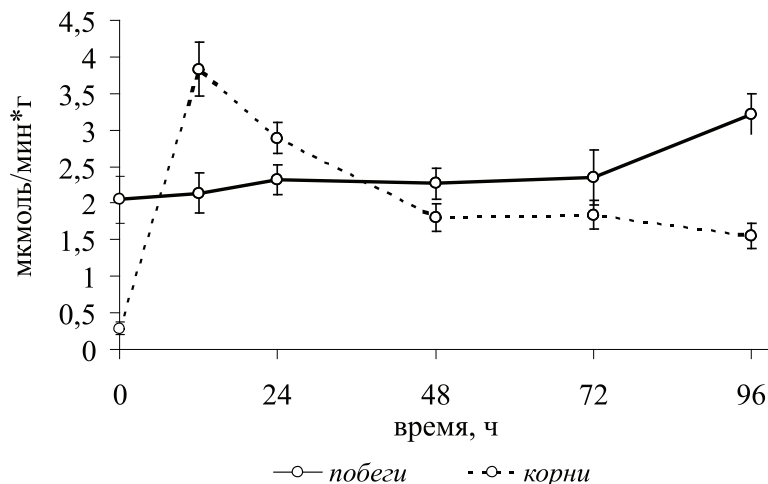


Рис. 3. Динамика активности гваяколовой пероксидазы в органах тритикале под действием кадмия

В то же время в корнях наблюдали 13-кратное увеличение активности фермента в течение первых 12 часов экспозиции на Cd-содержащей среде. Далее происходило постепенное снижение активности пероксидазы, достигавшей к 96 часам величины 1,6 мкмоль/мин*г. Значительное увеличение активности ПО в корнях в первые 12 часов экспозиции (см. рис. 3), по-видимому, являлось ответной реакцией, связанной с необходимостью ликвидации избыточного образования H_2O_2 . При этом реакция, катализируемая данным ферментом, лежит в основе неупорядоченной полимеризации оксикоричных спиртов (п-кумарового, кониферилового и синапового), в результате которой образуется лигнин [6]. Известно, что кадмий может связываться с карбоксильными и гидроксильными радикалами различных соединений, к которым можно отнести

и лигнин [5]. Так, Загоскина с соавт. [4] наблюдали усиленную лигнификацию клеток корневых каллусов чайного растения при обработке их растворами нитрата кадмия. Также известно, что фенольные соединения используются для образования другого полимера – суберина, который является матриксом газо- и водонепроницаемого слоя, образуемого на поверхности клеточных стенок [11]. В результате растениям удастся препятствовать поступлению токсичных компонентов среды через корневую систему.

Активность АПО в побегах тритикале в течение первых 12 часов экспозиции на Cd-содержащей среде снижалась в 2,3 раза, после чего повышалась до уровня в 0,27 мкмоль/мин*г (что было всё же на 30% ниже первоначального значения), и далее она стабилизировалась до конца эксперимента (рис. 4).

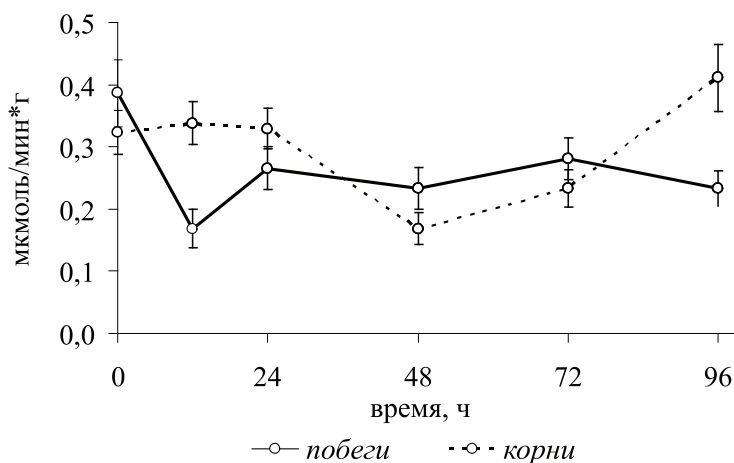


Рис. 4. Динамика активности аскорбатпероксидазы в органах тритикале под действием кадмия

Такое падение активности фермента можно объяснить быстрой инактивацией его пула в ходе катализируемой реакции. Ресинтез новых порций фермента (или изозимов), по-видимому, обеспечил возрастание активности после 12 часов эксперимента. Синтез новых молекул фермента, отчасти, возможно инициирован самим образующимся пероксидом в силу известной сигнальной роли этого вещества [3]. Выход активности на стационарную величину до конца эксперимента (см. рис. 4) и постепенное снижение количества пероксида (см. рис. 1) можно объяснить, с одной стороны, поддержанием необходимой скорости синтеза фермента, и повышенной скоростью образования аскорбата из продуктов фотосинтеза, с другой.

В корнях активность фермента до 24 часов поддерживалась на примерно одном уровне, а затем к 48 часам снижалась вдвое. Такие данные могут быть объяснены инактивацией конститутивного пула фермента после 24 часов с последующей индукцией синтеза новых его порций (или изоферментов). Подобная динамика активности фермента в корнях на фоне данных по содержанию пероксида водорода (см. рис. 1) может свидетельствовать о незначительной роли этой биохимической реакции в корнях, по-видимому, отчасти из-за невозможности (или низкой скорости) синтеза аскорбата в этой части растений. Повышение активности фермента к 96 часам эксперимента может быть обусловлено, как синтезом фермента *de novo*, так и поступлением синтезированного аскорбата из листьев растений тритикале.

Полесская [8] утверждает, что на долю аскорбатпероксидазы выпадает основная работа по ликвидации H_2O_2 в клетках. Однако наши результаты показывают разную значимость действия этого фермента в органах растений тритикале.

Заключение

Проведенное исследование показало, что регуляция редокс-гомеостаза у тритикале, выращенного на содержащей 0,04 мМ Cd^{2+} среде, носила органоспецифичный характер, обусловленный, по-видимому, преимущественной аккумуляцией кадмия в корнях. При этом значительное накопление пероксида водорода в побегах может быть как опосредованным из-за возникновения осмотического стресса, так и, отчасти, за счёт работы внеклеточных форм пероксидазы клеток корня [15], в результате чего образуется пероксид, который переносится в побег с током воды по ксилеме. В результате мы обнаруживаем повышенную вели-

чину ПОЛ для клеток побега. Показанная высокая корреляция между накоплением H_2O_2 и величиной ПОЛ подтверждает взаимосвязь этих процессов у растений тритикале на ранних этапах онтогенеза.

Стресс-индуцированные изменения активности антиоксидантных ферментов (аскорбатпероксидазы и гваяколовой пероксидазы) впервые позволили обнаружить их разную значимость в функционировании антиоксидантной системы разных органов растения. При этом показанное возрастание активности ферментов может быть обусловлено их синтезом *de novo*, который отчасти можно объяснить сигнальной ролью образованного пероксида водорода. Динамика активности ферментов антиоксидантной защиты свидетельствует о разной величине пула исследованных ферментов в органах тритикале и разной скорости активации их синтеза *de novo* в ответ на образование пероксида.

Список литературы

1. Влияние кадмия на CO_2 -газообмен, переменную флуоресценцию хлорофилла и уровень антиоксидантных ферментов в листьях гороха / Т.И. Балахнина, А.А. Кособрюхов, А.А. Иванов, В.Д. Креславский // Физиология растений. – 2005. – Т. 52. – С. 21–26.
2. Гавриленко В.Ф., Ладыгина М.Е., Хандобина Л.М. Большой практикум по физиологии растений. – М.: Высшая школа, 1975. – С. 280–310.
3. Гарифзянов А.Р., Жуков Н.Н., Иванищев В.В. Образование и физиологические реакции активных форм кислорода в клетках растений // Современные проблемы науки и образования. – 2011. – № 2; URL: www.science-education.ru/96-4600.
4. Загоскина Н.В., Гончарук Е.А., Алявина А.К. Изменение в образовании фенольных соединений при действии кадмия на каллусные культуры, инициированные из различных органов чайного растения // Физиология растений. – 2007. – Т. 54. – С. 267–274.
5. Запрометов М.Н. Фенольные соединения. – М.: Наука, 1993. – 230 с.
6. Запрометов М.Н. Фенольные соединения и их роль в жизни растений. – М.: Наука, 1996. – С. 21–23.
7. Влияние кадмия на некоторые физиологические показатели растений ячменя в зависимости от возраста / Н.М. Казнина, А.Ф. Титов, Г.Ф. Лайдинен, Ю.В. Батова // Труды Карельского научного центра РАН. – 2010. – № 2. – С. 27–31.
8. Полесская, О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода. – М.: Изд-во КДУ, 2007. – 140 с.
9. Прасад М.Н. Практическое использование растений для восстановления экосистем, загрязненных металлами // Физиология растений. – 2003. – Т. 50. – С. 756–763.
10. Серегин И.В., Иванов В.Б. Физиологические аспекты токсического действия кадмия и свинца на высшие растения // Физиология растений. – 2001. – Т. 48, № 4. – С. 606–630.
11. Хелдт Г.В. Биохимия растений. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – С. 355.
12. Чулахина Г.Н. Физиологические и биохимические методы анализа растений. – Калининград: Изд-во Калинин. гос. универ., 2000. – 59 с.
13. Heath R.L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty

acid peroxidation // Arch. Biochem. Biophys. – 1968a. – Vol. 125(1). – P. 189–198.

14. Kumar G.N., Knowles N.R. Changes in Lipid Peroxidation and Lipolytic and Free-Radical Scavenging Enzyme during Aging and Sprouting of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Seed-Tubers // Plant Physiol. – 1993. – Vol. 102. – P. 115–124.

15. Mika A., Minibayeva F., Beckett R., Luthje S. Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species // Phytochemistry Reviews. – 2004. – Vol. 3. – P. 173–193.

16. Radotic K., Majstorovic I., Mutavdic D. Induction of free-radical processes in the spruce leaves after exposure to different concentrations of cadmium // Winter meeting of the society for free radical research (European region). Oxygen free radicals and oxidative stress in plant. Abst. Granada, Spain, 1984. – P. 64.

References

1. Balahnina T.I., Kosobryuhov A.A., Ivanov A.A., Kreslavskij V.D. Vliyanie kadmija na CO₂-gazoobmen, perezmenuju fluorescenciju hlorofilla i uroven' antioksidantnyh fermentov v list'jah goroha. Fiziologija rastenij, 2005. Vol. 52. pp. 21–26.

2. Gavrilenko V.F., Ladygina M.E., Handobina L.M. Bol'shoj praktikum po fiziologii rastenij. M.: Vysshaja shkola, 1975. pp. 280–310.

3. Garifzjanov A.R., Zhukov N.N., Ivaniwev V.V. Obrazovanie i fiziologicheskie reakcii aktivnyh form kisloroda v kletkah rastenij. Sovremennye problemy nauki i obrazovanija, 2011. no. 2; URL: www.science-education.ru/96m4600.

4. Zagorskina N.V., Goncharuk E.A., Aljavina A.K. Izmenenie v obrazovanii fenol'nyh soedinenij pri dejstvii kadmija na kallusnye kul'tury, iniciirovannye iz razlichnyh organov chajnogo rastenija. Fiziologija rastenij, 2007. Vol. 54. pp. 267–274.

5. Zaprometov M.N. Fenol'nye soedinenija. M.: Nauka, 1993. pp. 230.

6. Zaprometov M.N. Fenol'nye soedinenija i ih rol' v zhizni rastenij. M.: Nauka, 1996. pp. 21–23.

7. Kaznina N.M., Titov A.F., Lajdinen G.F., Batova Ju.V. Vliyanie kadmija na nekotorye fiziologicheskie pokazateli ras-

tenij jachmenja v zavisimosti ot vozrasta. Trudy Karel'skogo nauchnogo centra RAN, 2010. no. 2. pp. 27–31.

8. Poleskaja, O.G. Rastitel'naja kletka i aktivnye formy kisloroda. M.: Izd-vo KDU, 2007. pp. 140.

9. Prasad M.N. Prakticheskoe ispol'zovanie rastenij dlja vosstanovlenija jekosistem, zagrizannyh metallami. Fiziologija rastenij, 2003. Vol. 50. pp. 756–763.

10. Seregin I.V., Ivanov V.B. Fiziologicheskie aspekty toksicheskogo dejstvija kadmija i svinca na vysshie rastenija. Fiziologija rastenij, 2001. Vol. 48. pp. 606–630.

11. Heldt G.V. Biohimija rastenij. M.: BINOM. Laboratorija znaniy, 2011. pp. 355.

12. Chupahina G.N. Fiziologicheskie i biohimicheskie metody analiza rastenij. Kaliningrad: Izd-vo Kalinin. gos. univer., 2000. pp. 59.

13. Heath R.L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys., 1968a. Vol. 125(1). pp. 189–198.

14. Kumar G.N., Knowles N.R. Changes in Lipid Peroxidation and Lipolytic and Free-Radical Scavenging Enzyme during Aging and Sprouting of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Seed-Tubers. Plant Physiol, 1993. Vol. 102. pp. 115–124.

15. Mika A., Minibayeva F., Beckett R., Luthje S. Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species. Phytochemistry Reviews. 2004. Vol. 3. pp. 173–193.

16. Radotic K., Majstorovic I., Mutavdic D. Induction of free-radical processes in the spruce leaves after exposure to different concentrations of cadmium // Winter meeting of the society for free radical research (European region). Oxygen free radicals and oxidative stress in plant. Abst. Granada, Spain, 1984. pp. 64.

Рецензенты:

Пузина Т.И., д.б.н., профессор, зав. кафедрой ботаники Орловского государственного университета, г. Орел.

Субботина Т.И., д.м.н., профессор, зав. кафедрой медико-биологических дисциплин Тульского государственного университета, г. Тула.

Работа поступила в редакцию 07.02.2012.