

УДК 577.15:633.15

Н. О. Хромих, В. С. Більчук

Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара

АКТИВНІСТЬ ГЛУТАТІОН-S-ТРАНСФЕРАЗИ ПРОРОСТКІВ КУКУРУДЗИ ЗА КОМБІНОВАНОГО ВПЛИВУ ВИСОКОЇ ТЕМПЕРАТУРИ ТА ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

У модельному експерименті досліджено зміни активності глутатіон-S-трансферази (GST) [КФ 2.5.18] у зерні й органах проростків кукурудзи за комбінованої дії високої температури, солей свинцю та кадмію. Виявлено тканинспецифічність динаміки активності ферменту за спільного впливу двох чинників. Показано залежність рівня ферментативної активності в органах проростків залежно від впливу іонів кадмію та свинцю на фоні короткочасної дії гіпертермії. Зроблено висновок про посилення процесу детоксикації важких металів у проростках за умов тривалого впливу високої температури.

Н. О. Хромых, В. С. Бильчук

Днепропетровский национальный университет им. Олеся Гончара

АКТИВНОСТЬ ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗЫ ПРОРОСТКОВ КУКУРУЗЫ ПРИ КОМБИНИРОВАННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ВЫСОКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ И ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

В модельном эксперименте исследованы изменения активности глутатион-S-трансферазы (GST) [КФ 2.5.18] в зерне и органах проростков кукурузы при комбинированном воздействии высокой температуры, солей свинца и кадмия. Выявлена тканеспецифичность динамики активности фермента при совместном воздействии двух факторов. Показана зависимость уровня ферментативной активности в органах проростков от воздействия ионов кадмия и свинца на фоне кратковременного влияния гипертермии. Сделан вывод об усилении процесса детоксикации тяжелых металлов в проростках в условиях длительного воздействия высокой температуры.

N. A. Khromykh, V. S. Bil'chuk

Oles' Gonchar Dnipropetrovsk National University

GLUTATHION-S-TRANSFERASE ACTIVITY IN *ZEA MAIS* SEEDLINGS UNDER HIGH TEMPERATURE AND HEAVY METALS COMBINE ACTION

In model experiment the changes of Glutathione-S-Transferase (GST) activity in *Zea maise* seeds and seedlings under high temperature, and lead and cadmium ions combine action were investigated. Tissue-specific dynamics of enzymatic activity under two factors' combine action was revealed. The dependence of enzyme's activity level in seedlings' organs from influence of cadmium and lead ions under short-term action of high temperature was shown. The enhancing of heavy metals detoxification process in seedlings under long-term action of high temperature was concluded.

Вступ

Дослідження стійкості рослин до несприятливих чинників середовища потребує врахування спільного впливу зростаючого техногенного навантаження та мінливих кліматичних умов. Адаптивні реакції рослин на коливання температури зумовлені зміною інтенсивності та спрямованості ключових ланок метаболізму, які забезпечують життєдіяльність клітин [11]. Значної шкоди рослинні організми зазнають від антропогенного забруднення ґрунту сполуками важких металів, дія яких спричиняє окислювальний стрес [2; 8; 9]. У ланцюгу відповідних реакцій рослин на токсичний вплив важких металів важливе місце посідає система глутатіон-залежних ферментів [3; 6]. Показано участь глутатіон-редуктази сояшиника в детоксикації свинцю [4], глутатіон-пероксидази гороху в детоксикації нікелю [7]. Ключову роль у знешкодженні токсикантів у клітинах рослин відіграють глутатіон-S-трансферази (GST) [КФ 2.5.18]. Це численна родина ферментів, здатних нековалентно зв'язувати велику кількість гідрофобних речовин, унаслідок чого токсиканти поступово інактивуються та виводяться, не ушкоджуючи клітин [1; 3; 6]. Індукція активності GST, виявлена за дії важких металів на рослини гороху [5], пшениці [10], указує на необхідність подальшого всебічного вивчення функціонального значення цієї групи ферментів у детоксикації важких металів культурними рослинами. Спільний вплив нестабільних температур середовища та важких металів на перебіг змін глутатіон-трансферазної активності рослин наразі не досліджено. Мета цієї роботи – з'ясувати здатність GST проростків кукурудзи до знешкодження іонів свинцю та кадмію за умов підвищеної температури середовища.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проведено на проростках кукурудзи середньораннього гібриду Хмельницький 280 СВ. На першому етапі експерименту, від першої до сьомої доби (I), проростки перебували при температурі +26 °С і природному освітленні; на другому (II) – проростки піддавали короточасній (5 годин) дії гіпертермії (+48 °С) у темряві; третій етап (III) передбачав тривалу дію гіпертермії (+48 °С протягом 24 годин) у темряві. Упродовж усіх етапів експерименту контрольні проростки пророщували на дистильованій воді, а дослідні після трьох діб пророщування на дистильованій воді переносили на розчини нітратних солей кадмію та свинцю з концентраціями $0,5 \cdot 10^{-4}$ М та $1,0 \cdot 10^{-4}$ М. Активність GST у зерні, що проростає, коренях і пагонах проростків визначали методом Яcobу [12] у модифікації Гришка [1], субстратом слугував 2,4-динітрохлорбензол (ДНХБ). Зміни оптичної густини реєстрували при довжині хвилі 340 нм на фотоелектроколориметрі КФК-2МП, по три повтори для кожного зразка. Каталітичну активність GST виражали в мкМ ДНХБ/с·г тканини. Результати опрацьовано статистично за допомогою пакета Statistica 6.0; розбіжності між вибірками вважали достовірними при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

У зерні кукурудзи на першому етапі експерименту (рис. 1, I), за відсутності температурного чинника, порівняно з контролем виявлено зростання активності GST під впливом сполук свинцю в концентраціях $0,5 \cdot 10^{-4}$ М та $1,0 \cdot 10^{-4}$ М відповідно на 13 та 14 %, а за дії іонів кадмію в низькій концентрації – зниження на 19 %. Різниця впливу зазначених катіонів на активність ферменту зумовлена їх неоднаковою здатністю до проникнення у рослинні тканини й до сполучення з клітинними оболонками [2; 6]. Короточасна (рис. 1, II) дія гіпертермії (5 годин) не викликала достовірної зміни вихідного рівня активності GST у контрольному зерні, тоді як у присутності обох ме-

талів відмічено зростання активності в 1,2–1,8 раза. Зіставлення результатів спільної дії двох чинників на ферментативну активність з контрольним рівнем II етапу виявило достовірне її збільшення: за дії іонів кадмію в концентраціях $0,5 \cdot 10^{-4}$ та $1,0 \cdot 10^{-4}$ М відповідно на 38 і 67 %, за дії іонів свинцю – на 70 і 23 % відповідно.

У результаті тривалої дії високої температури (рис. 1, III) у зерні за присутності іонів кадмію та свинцю в низькій і високій концентраціях виявлено зниження активності GST порівняно з II етапом і наближення її до рівнів на I етапі експерименту. Контрольний рівень активності III етапу достовірно перевищений на 13 % за спільної дії гіпертермії та іонів кадмію й свинцю у низькій концентрації.

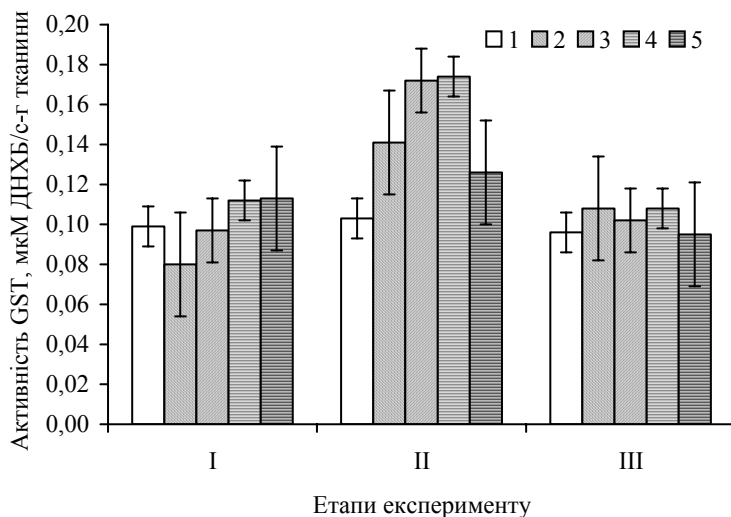


Рис. 1. Активність GST (µM ДНХБ/с·г тканини) у зерні кукурудзи, що проростає, за спільної дії важких металів та гіпертермії: 1 – дистильована вода, 2 – $0,5 \cdot 10^{-4}$ М $Cd(NO_3)_2$, 3 – $1,0 \cdot 10^{-4}$ М $Cd(NO_3)_2$, 4 – $0,5 \cdot 10^{-4}$ М $Pb(NO_3)_2$, 5 – $1,0 \cdot 10^{-4}$ М $Pb(NO_3)_2$; I – +26 °С, II – +48 °С, 5 год, III – +48 °С, 24 год.

У коренях проростків на I етапі експерименту (рис. 2, I) вплив сполук кадмію та свинцю на активність GST визначався концентрацією токсикантів. За дії іонів свинцю в концентраціях $0,5 \cdot 10^{-4}$ та $1,0 \cdot 10^{-4}$ М активність ферменту достовірно зростала (відповідно на 20 та 8 % від контролю). За присутності іонів кадмію зростання активності відмічено лише за високої концентрації (на 12 % від контролю), а за низької – зниження на 9 % від контролю. Різниця ступенів активації GST може бути наслідком неоднакової інтенсивності процесів детоксикації сполук кадмію та свинцю у коренях рослин [2].

Короткочасний вплив високої температури (рис. 2, II) викликав у коренях контрольних і дослідних проростків зниження активності GST порівняно з вихідними значеннями на I етапі в 1,6–2,5 раза. Аналіз результатів спільного впливу двох чинників на II етапі виявив різницю дії обраних важких металів: за присутності іонів кадмію активність достовірно знижувалась і становила при концентраціях токсиканта $0,5 \cdot 10^{-4}$ та $1,0 \cdot 10^{-4}$ М відповідно 69 та 83 % від контролю. За дії іонів свинцю активність зростала за низької та високої концентрації токсиканта відповідно на 26 та 29 %.

Тривала дія високої температури (рис. 2, III) порівняно з короткочасною спричинила у контрольних і дослідних коренях зростання активності GST в 1,9–3,1 раза. Вплив іонів обох важких металів на активність ферменту на фоні тривалої гіпертермії мав однакову спрямованість відносно контрольного рівня: достовірно перевищення в концентраціях $0,5 \cdot 10^{-4}$ та $1,0 \cdot 10^{-4}$ М за присутності сполук кадмію відповідно на 7 та 13 %; за присутності іонів свинцю – відповідно на 20 та 42 %.

У пагонах проростків (рис. 3, I) на першому етапі експерименту, за відсутності впливу підвищеної температури, дія сполук кадмію та свинцю призвела до достовірного перевищення контрольного рівня активності GST: за концентрації $0,5 \cdot 10^{-4}$ М відповідно на 7 та 13 %, а за концентрації $1,0 \cdot 10^{-4}$ М – на 20 та 29 %. Відомо, що у тканини листя з коренів транспортується незначна кількість важких металів [6; 7], тому зміни активності ферменту в листі рослин можуть бути наслідком як первинної дії токсикантів, так і пошкодження інших метаболічних процесів.

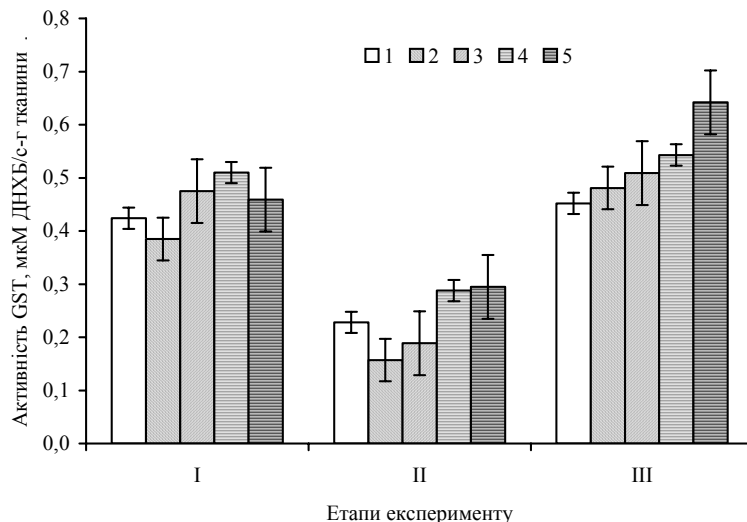


Рис. 2. Активність GST у коренях проростків кукурудзи за спільної дії важких металів та гіпертермії: позначки див рис. 1

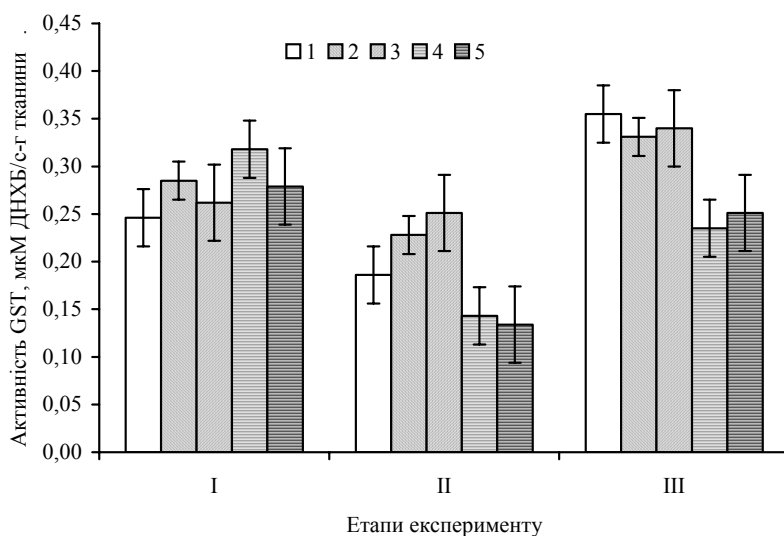


Рис. 3. Активність GST у пагонах проростків кукурудзи за спільної дії важких металів та гіпертермії: позначки див рис. 1

Короткочасний вплив гіпертермії (рис. 3, II) викликав зниження вихідного рівня ферментативної активності як у пагонах контрольних проростків (у 1,3 раза), так і в дослідних (в 1,3–2,2 раза). Результати спільного впливу двох чинників порівняно з контрольним рівнем активності GST на II етапі показали специфічність дії металів: за присутності іонів кадмію в низькій і високій концентраціях активність ферменту достовірно зро-

стала (на 23 та 36 % відповідно), тоді як за дії іонів свинцю активність достовірно знижувалась (відповідно на 22 та 28 %). За тривалої дії гіпертермії (рис. 3, III), порівняно з II етапом, у пагонах проростків активність ферменту зросла в контролі в 1,9 раза, за дії іонів важких металів – в 1,4–1,9 раза. При зіставленні рівнів активності GST на III етапі експерименту виявлено, що за дії іонів кадмію активність ферменту знижувалась порівняно з контролем недостовірно, а за присутності іонів свинцю в концентраціях $0,5 \cdot 10^{-4}$ та $1,0 \cdot 10^{-4}$ М зниження було достовірним (відповідно на 34 і 29 % від контролю).

Висновки

У зерні кукурудзи, що проростає, короткочасний спільний вплив високої температури та важких металів призвів до активації GST, тоді як за тривалого спільного впливу відмічено гальмування каталітичної дії ферменту та повернення активності до вихідного рівня. У коренях і пагонах проростків унаслідок короткочасної спільної дії високої температури та важких металів активність ферменту знижувалась, навпаки, тривала спільна дія двох чинників призводила до достовірного зростання рівнів активності GST, що свідчить про посилення процесу детоксикації важких металів у органах проростків на фоні тривалої гіпертермії. Спільна короткочасна дія іонів кадмію та гіпертермії призводила до найбільшого зниження активності GST у коренях проростків. Комплексний вплив іонів свинцю та високої температури на всіх етапах експерименту знижував активність ферменту у пагонах проростків, що вказує на тканинспецифічність відповідних реакцій органів проростків кукурудзи на вплив важких металів на фоні гіпертермії.

Бібліографічні посилання

1. **Гришко В. Н.** Peroxidное окисление липидов и функционирование некоторых антиоксидантных ферментных систем у кукурузы и овса при остром поражении фтористым водородом / В. Н. Гришко, Д. В. Сыщиков // Укр. биохим. журнал. – 1999. – Т. 71, № 3. – С. 51–57.
2. **Иванов В. Б.** Сравнение влияния тяжелых металлов на рост корня в связи с проблемой специфичности и избирательности их действия / В. Б. Иванов, Е. И. Быстрова, И. В. Серегин // Физиология растений. – 2003. – Т. 50, № 3. – С. 445–454.
3. **Колесниченко Л. С.** Глутатионтрансферазы / Л. С. Колесниченко, В. И. Кулинский // Успехи современной биологии. – 1989. – Т. 107, вып. 2. – С. 179–193.
4. **Пацула О.** Система глутатіону в разі адаптації рослин соняшника до токсичної дії свинцю / О. Пацула, О. Демків // Вісник Львів. ун-ту. Серія біологічна. – 2004. – Вип. 37. – С. 222–226.
5. **Платонова А. А.** Вміст відновленого глутатіону та активність глутатіонзалежних ферментів у проростках гороху (*Pisum sativum* L.) за дії іонів кадмію і талію / А. А. Платонова, С. С. Костишин, М. М. Блошко // Физиол. и биохим. культ. растений. – 1998. – Т. 30, № 4. – С. 264–270.
6. **Серегин И. В.** Физиологические аспекты токсического действия кадмия и свинца на высшие растения / И. В. Серегин, В. Б. Иванов // Физиология растений. – 2001. – Т. 48, № 4. – С. 606–630.
7. **Сищиков Д. В.** Глутатіонзалежна антиоксидантна система проростків гороху та кукурудзи за дії сполук нікелю / Д. В. Сищиков, В. М. Гришко // Укр. біохім. журнал. – 2003. – Т. 75, № 4. – С. 131–138.
8. **Ernst W. H. O.** Metal tolerance in plants / W. H. O. Ernst, J. A. C. Verkleij, H. Schat // Acta Bot. Neere. – 1992. – Vol. 43. – P. 229–248.
9. **Hagemeyer J.** Grows under trace element stress / J. Hagemeyer, S. W. Breckle // Plant roots: The Hidden Hals / Eds. Y. Waisel, U. N. Kafkafi. – Y.: Marcel Dekker, 1996. – P. 415–433.
10. **Induction** of glutathione transferase activity in wheat and peg seedlings by cadmium / M. Votila, A. A. Aioub, G. Gullner, T. Komives // Acta Biol. Hung. – 1994. – Vol. 45. – P. 11–16.
11. **Pollock C. I.** The response of plants to temperature change // G. Agr. Sci. – 1990. – Vol. 115, N 1. – P. 1–5.
12. **Jacoby W. B.** Glutathion transferases: methods in enzymology. – Acad. Press INC, 1985. – P. 495–510.

Надійшла до редколегії 07.10.2009