ОКИСЛЮВАЛЬНИЙ СТРЕС В ІЗОЛЬОВАНИХ ХЛОРОПЛАСТАХ МОХУ *FONTINALIS ANTIPYRETICA* HEDW. ТА ЙОГО МОДИФІКАЦІЯ ЗА УЧАСТЮ α-ТОКОФЕРОЛУ

НАТАЛЯ ЯРОСЛАВІВНА КИЯК

Кияк Н. Я. Окислювальний стрес в ізольованих хлоропластах моху *Fontinalis antipyretica* Hedw. та його модифікація за участю α-токоферолу // Наукові основи збереження біотичної різноманітності. – 2010. – Том 1(8), № 1. – С. 279-292. – ISSN 2220-3087.

Досліджено вплив ацетату свинцю на розвиток окислювального стресу в ізольованих хлоропластах моху *Fontinalis antipyretica* Hedw. Внесення важкого металу у середовище інку-бації хлоропластів спричиняло деградацію хлорофілів, індукувало процес ліпоперок-сидації й окислювальної модифікації білків. Також встановлено зниження активності супероксиддисмутази та зменшення кількості відновленої форми глутатіону. Антиоксидант α-токоферол істотно зменшував наслідки негативного впливу свинцю, інгібуючи наростання процесу ліпопероксидації та стабілізуючи функціональний стан ядерної ДНК, що підтверджує його протекторні властивості в умовах окислювального стресу.

Ключові слова: *іони свинцю, ізольовані хлоропласти, малоновий диальдегід, карбонільні групи білків, супероксиддисмутаза, відновлений глутатіон, люмінесценція ДНК*

Надлишок кисню та високоенергетичні реакції переносу електронів, асоційовані з мембранами тилакоїдів, є головним джерелом високоактивних кисневих інтермедіатів у фотосинтезуючих тканинах рослин. У хлоропластах виникнення супероксидного аніону відбувається як у фотосистемі I (переважно за участю ферредоксину), так і у фотосистемі II (у процесі фотоокислення води). Джерелом супероксидного радикалу в цих структурах може бути й ключовий фермент фіксації CO_2 – рибулозобісфосфаткарбоксилаза. Крім того, встановлено, що ефективним генератором синглетного кисню є хлорофіли, тому в рослинних клітинах завжди існує небезпека від ушкоджувальної дії вільних радикалів (Мерзляк, 1989).

Відомо, що вплив свинцю та кадмію призводить до збільшення вмісту активних форм кисню (АФК) у рослинному організмі, яке визначають поняттям „вторинний окислювальний стрес" (Стороженко, Шадчина, 2004). Унаслідок високої реакційної здатності АФК взаємодіють із різними клітинними компонентами – ліпідами, ініціюючи їх пероксидне окислення та білками, розриваючи пептидні зв'язки та модифікуючи амінокислотні ланцюги. Крім того, свинець, поряд з індукцією перекисного окислення ліпідів (ПОЛ), може призводити до серйозних пошкоджень генетичного апарату клітини: часткової денатурації ДНК, розпаду подвійної спіралі та розриву ланцюгів ДНК, появи хромосомних аберацій і мутацій (Жученко, 1980). У зв'язку з цим, важливим напрямком досліджень є пошук шляхів та механізмів підвищення загальної та специфічної адаптивної стійкості рослин.

© Н. Я. Кияк

Мохи часто використовують як модельні об'єкти для дослідження морфо-фізіологічних і геномних змін, спричинених дією важких металів (Bassi, 1995; Bargagli, 1998). Є публікації щодо вивчення особливостей окислювального стресу під впливом важких металів у деяких видів мохів (Choudhury, Panda, 2003, 2004; Кияк, 2007; Лобачевська, 2008). Відомо, що фотосинтетичний апарат мохів дуже чутливо реагує на підвищення рівня атмосферного забруднення середовища полютантами, а вміст хлорофілу використовується багатьма дослідниками для біоіндикації довкілля як окремими токсикантами, так і їх комплексами (Кравкина, 1991). У зв'язку з цим, метою роботи було з'ясування зміни основних показників прооксидантно-антиоксидантної системи в ізольованих хлоропластах моху *Fontinalis antipyretica* Hedw. під впливом іонів свинцю та дослідження протекторної ролі біоантиоксиданту α-токоферолу в умовах окислювального стресу.

Матеріали та методика досліджень

Об'єктом дослідження були дернини водного моху *F. antipyretica*. Для аналізу використовували пагони, вирощені в лабораторній культурі в контрольованих умовах температури (+20-22 °С), вологості (85-90%) та освітлення (2500 лк) (Демкив, Сытник, 1985). Рослини розділяли на 2 групи. Пагони *F. antipyretica* першої групи занурювали на 2 години у розчини ацетату свинцю з концентрацією 0,01-1,0 мкМ, після чого виділяли хлоропласти. Із пагонів другої групи спочатку виділяли хлоропласти й на 2 год вносили оцтовокислий свинець у середовище їх інкубації. Рослини контролю експонували в дистильованій воді.

Хлоропласти виділяли за методом В. Гавриленко (Гавриленко, Ладыгина, Хандобина, 1975). Уміст пігментів у суспензії хлоропластів визначали у 80%-ому ацетоні за методом Д. Арнона (Arnon, 1949). Варіанти контрольної та дослідних суспензій вирівнювали за вмістом хлорофілу. Отримані хлоропласти використовували для подальшого визначення біохімічних параметрів.

Для визначення активності супероксиддисмутази (СОД) суспензію хлоропластів екстрагували протягом 30 хв у 0,15 М фосфатному буфері (рН 7,8). 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 (Чевари, Андял, Штренгер, 1991).

Для визначення вмісту відновленого глутатіону (Г-SH) використовували реакційну суміш, що містила ферментний препарат, 15 мМ ЕДТА, 0,02% білок яєчного альбуміну, 0,3 мМ 5,5-дитіобіс (2-нітробензойну) кислоту, 50 мМ імідазол та 0,48 од. глутатіонредуктази. Реакцію ініціювали додаванням 0,9 мМ НАДФН. Проби фотометрували за довжини хвилі 412 нм протягом 4 хв. Уміст відновленого глутатіону виражали в мкМ $НАДФН_2$ на 1 мл суспензії хлоропластів (Smith, Vierhgeller, Throne, 1988).

Для визначення вмісту малонового диальдегіду (МДА) суспензію хлоропластів розчиняли у 20% розчині трихлороцтової кислоти та інкубували з 0,5% розчином тіобарбітурової кислоти на киплячій водяній бані протягом 30 хв. У супернатанті, отриманому після центрифугування, спектрофотометрично визначали кількість МДА за довжини хвилі 532 нм. Його вміст виражали в нМ МДА на 1 мл суспензії хлоропластів (Мусиенко, Паршикова, Славный, 2001).

Для визначення вмісту карбонільних груп (КГ) білків до суспензії хлоропластів додавали 10 мМ розчин 2,4-динітрофенілгідразину та інкубували протягом 1 год за кімнатної температури. Суміш центрифугували (10 хв, 5000 g), а отриманий осад розчиняли в 6 М гуанідингідрохлориді. Уміст КГ білків визначали у супернатантах спектрофотометрично за довжини хвилі 370 нм, використовуючи коефіцієнт молярного поглинання 22000 $М^{-1}$ $см^{-1}$ та виражали в мкМ на мг білка (Климишин, Старикович, Клевета та ін., 2007). Концентрацію білка визначали за методом Бредфорда (Bredford, 1976).

Цитофлуориметричний аналіз ядерної ДНК здійснювали за допомогою флуорохромування ДНК акридиновим оранжевим (АО) за методикою Р. Ріглера (Зеленин, 1967). Листки *F. antipyretica* фарбували 15 хв у 0,1 мМ розчині АО на фосфатному буфері (рН 5,9) і тричі по 15 хв відмивали фосфатним буфером. Після відмивання препарати у фосфатному буфері монтували на предметні скла й вимірювали інтенсивність люмінесценції ДНК-АО на мікроскопі ЛЮМАМ зі світлофільтром ЗС-2.

Усі досліди проводили у 3-кратній повторності. Отримані дані опрацьовували методами статистичного аналізу (Плохинский, 1970).

Вивчаючи вплив іонів важких металів на хлоропласти, необхідно враховувати, що ці полютанти можуть порушувати роботу фотосинтетичного апарату не лише шляхом індукування процесу вільнорадикального окислення, але й спричиняючи деградацію хлорофілів (Baszynski, 1980). Тому в наших дослідах ми проаналізували зміни вмісту пігментів у середовищі інкубації хлоропластів за дії оцтовокислого свинцю і встановили, що важкий метал призводив до зменшення вмісту хлорофілів *a* та *b*. Внесення ацетату свинцю у середовище інкубації хлоропластів індукувало зменшення кількості хлорофілу *a* майже на 65%, хлорофілу *b* – на 40%, порівняно із контрольним варіантом. Хлоропласти, виділені з оброблених металом рослин, пошкоджувалися менше, оскільки вміст хлорофілу *a* зменшувався приблизно на 35%, хлорофілу *b* – на 30-33% (табл. 1). Зменшення кількості хлорофілу могло бути результатом пригнічення процесів біосинтезу й деградації пігменту, оскільки відомо, що іони важких металів інгібують біосинтез хлорофілу на рівні утворення 5-амінолевуленової кислоти, а також пригнічують синтез протохлорофілідредуктази (Stobart, Grifiths, Ameen-Bukhari et al., 1995). Наші результати свідчать, що вміст хлорофілів істотно залежав від способу внесення солі свинцю, оскільки хлоропласти, виділені з оброблених металом рослин, менше пошкоджувалися металом.

Таблиця 1.

Вплив ацетату свинцю на вміст пігментів у суспензії ізольованих хлоропластів моху *Fontinalis antipyretica* Hedw.

Конц. ацетату свинцю, мкМ	Уміст хлорофілу *a*, мг/г сирої маси		Уміст хлорофілу *b*, мг/г сирої маси		Уміст каротиноїдів, мг/г сирої маси	
	1*	2	1	2	1	2
контроль	1,03±0,05	1,07±0,06	0,61±0,03	0,58±0,03	0,06±0,001	0,05±0,006
0,01	0,61±0,03	0,42±0,01	0,43±0,02	0,33±0,01	0,05±0,003	0,08±0,002
0,1	0,65±0,02	0,34±0,02	0,39±0,04	0,34±0,03	0,07±0,004	0,15±0,01
1,0	0,68±0,02	0,49±0,01	0,41±0,02	0,39±0,02	0,05±0,003	0,14±0,02

*Варіанти досліду: 1 – обробка пагонів ацетатом свинцю перед виділенням хлоропластів; 2 – внесення розчину ацетату свинцю у середовище інкубації хлоропластів.

Чітка відмінність між дослідними варіантами встановлена й у випадку визначення кількості каротиноїдів. Згідно з нашими експериментальними даними, у хлоропластах, виділених із оброблених ацетатом свинцю рослин, вміст каротиноїдів зберігався на рівні контрольного варіанту незалежно від дози важкого металу. У випадку внесення солі свинцю у концентраціях 0,1-1,0 мкМ у середовище інкубації хлоропластів встановлено підвищення концентрації каротиноїдів майже втричі, порівняно із контролем (рис. 1). Таке значне збільшення вмісту каротиноїдів може бути пов'язане з антиоксидантими властивостями цих пігментів. Відомо, що вони у хлоропластах виконують функцію гасників синглетного кисню та вільних радикалів. Причому, дія каротиноїдів є настільки ефективною, що практично кожне їх зіткнення з триплетами збуджених молекул хлорофілу чи з $^1O_2$ призводить до повної дезактивації цих сполук (Foyer, Harbinson, 1999).

Можна припустити, що в ізольованих хлоропластах моху *F. antipyretica* іони свинцю індукували підвищення кількості АФК, що й стало причиною збільшення вмісту каротиноїдів. Вивчення дії високоактивних кисневих радикалів як регуляторів біосинтезу каротиноїдів у хромопластах показало, що вони індукують експресію множинного каротиногенного гена, виконуючи функцію вторинних месенджерів, які ініціюють синтез каротиноїдів (Bouvier, Backhaus, Camara, 1998).

Отже, результати наших експериментів свідчать, що внесення ацетату свинцю в середовище інкубації хлоропластів істотно впливає на фотосинтетичні пігменти. Т. Сакакі (Sakaki, 1998), вивчаючи дію абіотичних стресових факторів на хлоропласти, встановив, що першою фазою оксидаційних пошкоджень є зменшення вмісту хлорофілів. Під час другої фази спостерігали значну деструкцію пігментів та ліпідів, яка супроводжувалася різким підвищенням вмісту МДА. У наших дослідах концентрація цього кінцевого продукту ПОЛ теж підвищувалася за дії металу, однак визначальне значення

мав спосіб внесення ацетату свинцю (рис. 2, а). За умов обробки пагонів фонтіналіса розчином металу з подальшим виділенням хлоропластів, уміст МДА збільшувався в 1,3-1,5 разів, а внесення ацетату свинцю в середовище інкубації хлоропластів істотно стимулювало процес ПОЛ, оскільки вміст МДА збільшувався майже в 3 рази, порівняно з контролем.

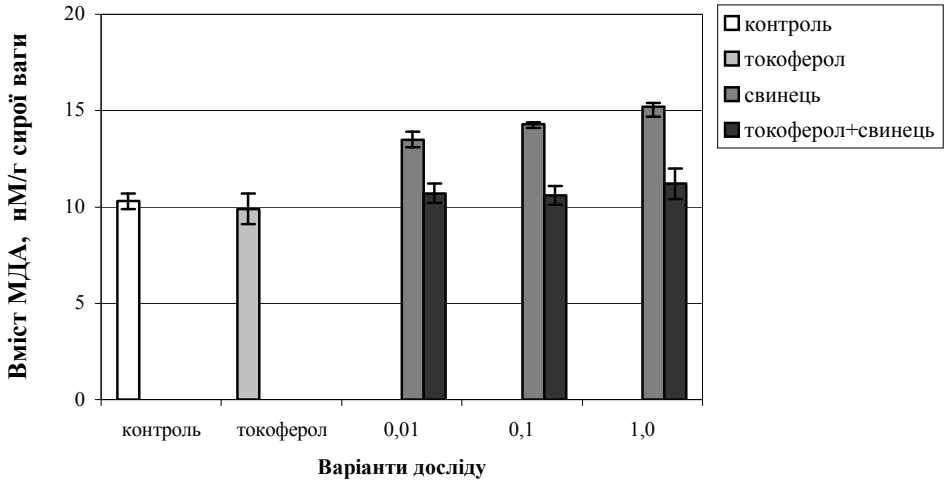

Рис. 1. Вплив α-токоферолу та ацетату свинцю на вміст малонового диальдегіду в пагонах водного моху *Fontinalis antipyretica* Hedw. Умовні позначення: контроль – рослини, які інкубували в поживному середовищі Кноп-II, токоферол – рослини, які інкубували в середовищі з α-токоферолом, 0,01-1,0 – рослини, які інкубували в середовищах із різними концентраціями ацетату свинцю, мкМ.

Модифікації АФК надаються не тільки ліпіди, але й білки, причому, окислені білки практично не відновлюються (Dean, Hunt, Grant et al., 1991). Первинні кисневі радикали взаємодіють із залишками амінокислот білків, які модифікуються, утворюючи кето- та альдопохідні різного характеру, а також інші продукти. На сьогодні існують численні публікації, у яких показано позитивну кореляцію між процесами окисної модифікації білків і ліпідів (Климишин, Старикович, Клевета та ін., 2007). У таких модифікованих білків змінюється функціональна активність, вони розщеплюються протеолітичними ферментами і, разом із тим, можуть слугувати джерелом вільних радикалів.

Використаний метод дослідження окислювальної модифікації білків базується на взаємодії 2,4-динітрофенілгідразину з альдегідними й кетонними групами у бічних ланцюгах амінокислот. Як показник окисної модифікації білків використовували вміст карбонільних груп (КГ) білків (Лущак В., Багнюкова, Лущак О., 2004). У проведених експериментах іони свинцю індукували підвищення вмісту КГ білків, причому, як і у випадку з МДА, значна кількість цих сполук утворювалася за безпосередньої взаємодії солі металу з хлоропластами – майже у 2 рази більше, порівняно з контролем (рис. 2, б).

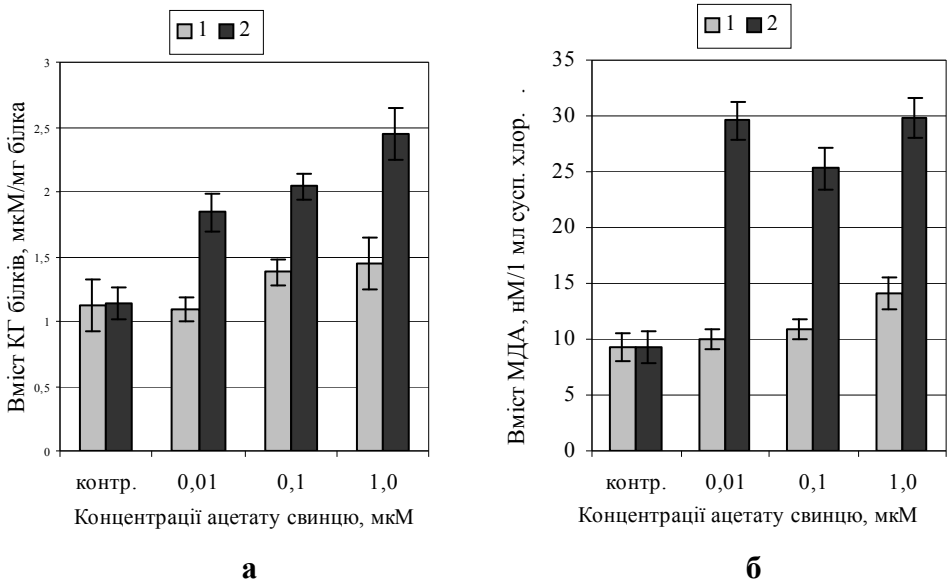

Рис. 2. Вплив ацетату свинцю на вміст МДА (а) та карбонільних груп білків (б) у суспензії ізольованих хлоропластів моху *Fontinalis antipyretica* Hedw.: 1 – обробка пагонів моху ацетатом свинцю перед виділенням хлоропластів; 2 – внесення ацетату свинцю у середовище інкубації хлоропластів.

Отже, поряд зі значною активацією ПОЛ, у хлоропластах *F. antipyretica* зростав рівень карбонільної модифікації білків, чому могли сприяти й продукти вільнорадикального окислення ліпідів, які діють на білки як сильні окислювачі. Інтенсифікація окислювальних процесів за внесення солі важкого металу у середовище інкубації хлоропластів могла бути спричинена зменшенням активності системи антиоксидантного захисту, яка нормально функціонує у цілісному рослинному організмі.

Дослідження проблеми адаптації рослин до дії стресових впливів різної природи пов’язане з вивченням механізмів захисту фотосинтетичного апарату. Однією з його захисних ланок є антиоксидантна ферментативна система. У зв’язку з цим, була досліджена активність основних компонентів антиоксидантної системи хлоропластів за дії іонів свинцю. Відомо, що СОД є першою лінією захисту проти впливу супероксидного радикалу у хлоропластах (Allen, Webb, Schake, 1997). Тут локалізовані Cu/Zn-СОД та Fe-СОД (Bueno, Varela, Gimenes-Gallego et al., 1995).

Крім того, у знешкодженні кисневих радикалів у хлоропластах важливу роль відіграють ферменти аскорбатпероксидаза, глутатіонредуктаза (ГР) та низькомолекулярні сполуки – відновлений глутатіон (Г-SH) та аскорбат, які у високих концентраціях присутні в цих клітинних компартментах.

У проведених дослідах іони свинцю у концентрації 0,01-0,1 мкМ індукували збільшення активності СОД, однак найвищі значення активності встановлено у хлоропластах, виділених з оброблених ацетатом свинцю рослин – у 1,2-1,5 рази вища активність ферменту, порівняно з контролем (табл. 2). Дещо нижча активність встановлена у випадку внесення 0,01-0,1 мкМ солі металу у середовище інкубації хлоропластів. Крім того, сублетальна концентрація металу 1,0 мкМ, внесена у суспензію хлоропластів, індукувала зниження активності СОД майже в 1,5 рази, порівняно з контролем, що може бути пов'язане з втратою цілісності рослинного організму та, відповідно, зниженням активності антиоксидантної системи за дії високої дози стресового фактора. Із літератури відомо, що активність СОД в умовах впливу несприятливих факторів може змінюватися різнонаправлено. Істотне збільшення активності цитоплазматичної та хлоропластної СОД було встановлено у випадку впливу іонів цинку на активність ізоферментів СОД у різних субклітинних фракціях листків люцерни, на культурі гороху посівного теж було відзначено збільшення активності СОД у хлоропластах під впливом іонів міді та сольового стресу (Christov, Bakardjieva, 1999). Дослідження з трансгенними рослинами виявили, що надекспресія Cu/Zn-СОД хлоропластів змінених рослин тютюну збільшує рівень захисту мембран від пошкодження (Foyer, Noctor, 2005). Зменшення активності СОД може відбуватися в умовах досить інтенсивного впливу стресового фактора, як, наприклад, під впливом важких металів та УФ-опромінення (Barka, 2001), теплового шоку та водного дефіциту (Бараненко, 2006). Причинами зменшення активності ферменту може бути виснаження пулу СОД посиленим його використанням для нейтралізації супероксидних радикалів, а також деградація молекул СОД під впливом гідроксильних радикалів і пероксиду водню.

Таблиця 2.

Вплив ацетату свинцю на активність компонентів захисної антиоксидантної системи у суспензії ізольованих хлоропластів моху *Fontinalis antipyretica* Hedw.

Концентрація ацетату свинцю, мкМ	Активність СОД, ум. од./мг білка/хв		Уміст Г-SH, мкМ НАДФН/мл усп.	
	1*	2	1	2
контроль	129,9±9,3	130,2±7,3	2,8±0,1	2,7±0,09
0,01	231,8±7,4	182,1±8,4	8,1±0,1	3,6 ±0,2
0,1	210,1±6,4	167,6±9,5	7,5±0,2	3,1±0,2
1,0	146,5±8,2	83,4±6,8	8,6±0,3	6,9±0,3

*Варіанти досліду: 1 – обробка пагонів ацетатом свинцю перед виділенням хлоропластів; 2 – внесення розчину ацетату свинцю у середовище інкубації хлоропластів.

Ацетат свинцю істотно впливав і на вміст одного з основних низькомо-

лекулярних антиоксидантів хлоропластів – відновленого глутатіону (Г-SH). У хлоропластах, виділених з оброблених важким металом рослин, уміст цієї сполуки підвищувався майже втричі, порівняно з контролем. Причому, така тенденція встановлена за дії усіх концентрацій свинцю. Згідно з літературними даними, глутатіон відіграє провідну роль у захисті клітин на ранніх стадіях окислювального стресу (Кения, Лукаш, Гуськов, 1993). Крім того, на різних об'єктах показано одночасне збільшення синтезу глутатіону та збільшення активності СОД у відповідь на дію екзогенного пероксиду водню та інших токсикантів, що індукують оксидний стрес (Гришко, Сищиков, 2000). Існує гіпотеза, що інтермедіати окисно-відновного метаболізму глутатіону можуть виконувати тригерну функцію: індукувати синтез СОД за збільшення концентрації донорів електронів, або пригнічувати активність цього ферменту за накопичення акцепторів. Активація СОД може бути пов'язана з відновленням міді сульфгідрильними сполуками. У проведених дослідах лише у хлоропластах, виділених із листків *F. antipyretica* після обробки важким металом, чітко простежувалася позитивна кореляція між активністю СОД та концентрацією Г-SH. Унаслідок внесення ацетату свинцю у середовище інкубації хлоропластів уміст відновленої форми глутатіону зберігався на рівні контролю і лише сублетальна концентрація металу індукувала збільшення його вмісту у 2,5 рази (табл. 2).

Отже, встановлено, що внесення ацетату свинцю в інкубаційне середовище хлоропластів призводить до цілого ряду негативних наслідків: спричиняє деградацію хлорофілів, індукує процеси пероксидації ліпідів мембран та окислювальної модифікації білків. У подальшому це може призвести до гальмування процесів фотосинтезу, зменшення активності ферментів, пригнічення синтезу хлоропластних білків. Інтенсифікація окислювального стресу в ізольованих хлоропластах може бути зумовлена зменшенням активності компонентів антиоксидантної системи, які нормально функціонують у цілісній клітині. Адже рослинну клітину можна розглядати як комплекс взаємопов'язаних компартментів з різними ємкостями антиоксидантних буферів (або антиоксидантного контролю) (Трач, Стороженко, 2007). Для нормальної життєдіяльності клітини необхідна узгодженість роботи всієї антиоксидантної системи. Низькомолекулярні антиоксиданти аскорбат, глутатіон і токоферол, на думку К. Фойєр (Foyer, Noctor, 2005) виконують у клітині функцію інформаційно багатих буферних систем, котрі взаємодіють з численними компартментами клітини. Крім того, вони впливають на експресію генів. СОД інактивує супероксидні радикал-іони, каталаза, пероксидази та аскорбатпероксидаза інактивують пероксид водню. Таким чином, антиоксидантна система створює динамічну метаболічну взаємодію між сприйняттям стресу рослинною клітиною та фізіологічною відповіддю. Підтвердженням цього стали отримані результати дослідів із хлоропластами, виділеними з оброблених ацетатом свинцю рослин *F. antipyretica*. Вони значно менше пошкоджувалися в умовах свинцевого стресу, оскільки рівні ПОЛ та окислювальної модифікації білків були значно нижчі, ніж у дослідах з внесенням важкого

металу у середовище інкубації хлоропластів. Антиоксидантний захист у цілісному організмі теж спрацьовував значно ефективніше, про що свідчать покази активності СОД та вмісту відновленого глутатіону. Очевидно, саме взаємодія різних компонентів антиоксидантної захисної системи на різних етапах реакції на стрес гальмує процеси ПОЛ мембран хлоропластів і забезпечує стійкість фотосинтетичного апарату рослини до окислювальних ушкоджень за дії важкого металу.

З метою пошуку протекторів-біоантиоксидантів, в умовах свинцевого стресу досліджено захисну роль α-токоферолу (вітаміну Е), що володіє високоефективними плейотропними антиоксидантними та генозахисними властивостями (Набиева, 2004). Численні літературні джерела свідчать, що α-токоферол є універсальним протектором клітинних мембран, який захищає ліпідний шар мембран від дезорганізації у результаті інтенсифікації процесів ПОЛ (Munne-Bosch, Alerge, 2003). Фенольні антиоксиданти, до яких належить і α-токоферол, є головними відновниками гідроксильного радикалу – найбільш реакційно здатного продукту пероксидного окислення. Крім того, надзвичайно важливою є здатність α-токоферолу попереджувати розвиток апоптозу клітин в умовах окислювального стресу.

У результаті 3-годинної експозиції пагонів *F. antipyretica* у розчині токоферолу з концентрацією 0,1 мкг/мл перед впливом оцтовокислого свинцю спостерігали зменшення токсичного ефекту металу. Особливо чітко ця тенден-ція простежувалася за дії 10,0-100,0 мкМ концентрацій свинцю. Відзначено зменшення вмісту МДА на 35%, порівняно зі зразками, які інкубували в середовищі лише зі свинцем (рис. 1). Протекторний вплив α-токоферолу пов'язаний, перш за все, з його здатністю стабілізувати в біомембранах просторову структуру ненасичених жирних кислот. Крім того, у дослідах П.С. Філіпенко та ін. (Филипенко, Титоренко, Потапов, 2006) показано, що на початкових етапах ПОЛ, під час утворення первинних продуктів – дієнових кон'югатів (ДК), α-токоферол відігравав роль пастки, перериваючи подальшу ланцюгову реакцію окислення ДК з переходом у МДА. Так само він мав модулюючий вплив на ферментативні комплекси, зв'язані з механізмом оновлення мембранних структур і попередження процесів ПОЛ.

У цьому випадку α-токоферол, впливаючи на мембранозв'язані ферменти, регулював їх активність і відігравав роль ефектора.

За дії антиоксиданту істотно змінювався і функціональний стан ядер у листках *F. antipyretica*, який оцінювали за інтенсивністю зеленого свічення комплексу ДНК-акридиновий оранжевий (ДНК-АО) (рис. 3).

Встановлено, що під впливом свинцю інтенсивність люмінесценції ДНК-АО зменшувалася в 1,2-1,5 рази, порівняно з контролем, а в присутності токоферолу збільшувалася до контрольних значень. Як бачимо, у варіантах із застосуванням α-токоферолу простежувалася кореляція між зменшенням вмісту МДА та збільшенням інтенсивності люмінесценції ДНК-АО. Максимальний протекторний ефект цього антиоксиданту встановлено у випадку дії 0,1-1,0 мкМ оцтовокислого свинцю. Сам α-токоферол не впливав ні на вміст

МДА, ні на інтенсивність зеленого свічення комплексу ДНК-АО, а лише в умовах свинцевого стресу попереджав наслідки негативного впливу стресового фактора.

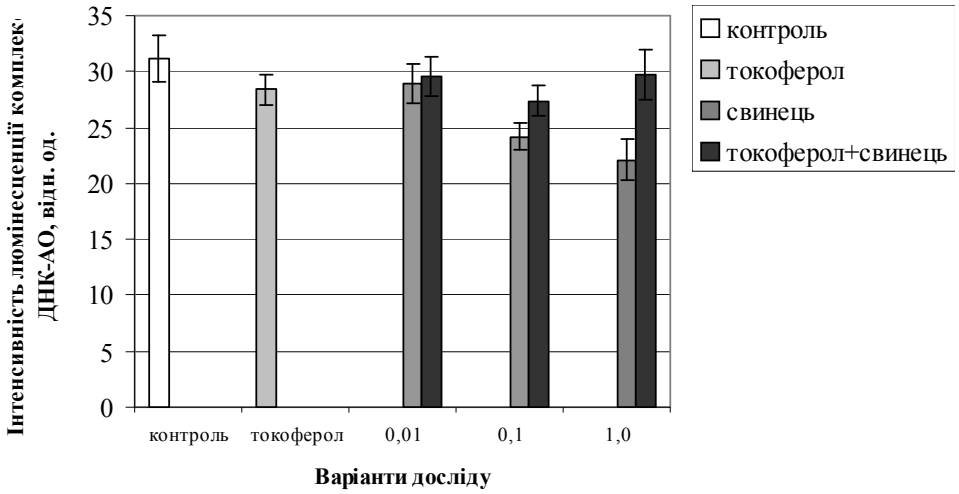

Рис. 3. Вплив α-токоферолу та ацетату свинцю на інтенсивність люмінесценції комплексу ДНК-акридиновий оранжевий у клітинах водного моху *Fontinalis antipyretica* Hedw. Умовні позначення, як на рис. 2.

Таким чином, використаний у наших експериментах антиоксидантний фактор чинить не лише пряму захисну дію на генетичний апарат клітин, але й підвищує надійність та ефективність функціонування енерготрансформуючої системи рослин. Отримані результати підтверджують той факт, що в основі одного з можливих шляхів захисної дії α-токоферолу є його антиоксидантні властивості. Відповідно, профілактична стабілізуюча роль α-токоферолу може розглядатися як важливий елемент у формуванні стійкості рослин шляхом збереження енергетичного балансу в організмі за несприятливих умов середовища.

Висновки

1. Ацетат свинцю у концентраціях 0,01-1,0 мкМ індукував розвиток окислювального стресу в ізольованих хлоропластах моху *F. antipyretica*.

2. Внесення свинцю у середовище інкубації хлоропластів спричиняло деградацію хлорофілів, індукувало процеси ПОЛ та окислювальної модифікації білків більшою мірою, ніж у хлоропластах, виділених з оброблених ацетатом свинцю рослин.

3. Функціонування компонентів антиоксидантної системи (СОД, відновленого глутатіону) в ізольованих хлоропластах моху *F. antipyretica* залежало від способу обробки важким металом і послаблювалося в умовах внесення

ацетату свинцю у середовище інкубації хлоропластів.

4. Антиоксидант α-токоферол зменшував наслідки негативного впливу свинцю у пагонах *F. antipyretica*, інгібуючи наростання процесу ліпопероксидації та стабілізуючи функціональний стан ядерної ДНК, що підтверджує його протекторні властивості в умовах окислювального стресу.

Бараненко В. В. Супероксиддисмутаза в клетках растений // Цитология. – 2006. – 48, № 6. – С. 465-475.

Гавриленко В. Ф., Ладыгина М. Е., Хандобина Л. М. Большой практикум по физиологии растений. Фотосинтез. Дыхание. – М.: Высш. школа, 1975. – 392 с.

Гришко В. Н., Сищиков Д. В. Процеси перекисного окиснення ліпідів та функціонування деяких антиоксидантних ферментативних систем у кукурудзи при дії HF // Доп. НАН України. – 2000. – № 2. – С. 191-195.

Демкив О. Т., Сытник К. М. Морфогенез архегониат. – К.: Наук. думка, 1985. – 204 с.

Жученко А. А. Экологическая генетика культурных растений. – Кишинев: Штиница, 1980. – С. 373-383.

Зеленин А. В. Люминесцентная цитохимия нуклеиновых кислот. – М.: Наука, 1967. – 136 с.

Кения М. В., Лукаш А. И., Гуськов Е. П. Роль низкомолекулярных антиоксидантов при окислительном стрессе // Успехи соврем. биол. – 1993. – Т. 113, вып. 4. – С. 465-470.

Кияк Н. Я. Особливості накопичення іонів свинцю та їх вплив на стан прооксидантно-антиоксидантної системи у пагонах водного моху *Fontinalis antipyretica* Hedw. // Чорноморський ботанічний журнал. – 2007. – Т. 3, № 1. – С. 56-64.

Климишин Н., Старикович Л., Клевета Г. та ін. Окиснювальна модифікація ліпідів і білків за дії низькоінтенсивного рентгенівського опромінення // Вісник Львів. ун-ту. Серія біологічна. – 2007. – № 45. – С. 63-70.

Кравкина И. М. Влияние атмосферных загрязнителей на ультраструктуру листьев // Укр. ботан. журн. – 1991. – Т. 76, № 1. – С. 3-9.

Лобачевська О. В. Вміст вільного проліну та активність антиоксидантного захисту за стресових умов // Чорноморський ботанічний журнал. – 2008. – Т. 4, № 2. – С. 230-236.

Лущак В. І., Багнюкова Т. В., Лущак О. В. Показники окислювального стресу. 1. Тіобарбітуратактивні продукти і карбонільні групи білків // Укр. біохім. журн. – 2004. – Т. 71, № 5. – С. 112-117.

Мерзляк М. Н. Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки // Итоги науки и техники. Сер. "Физиология растений". – М.: ВИНИТИ. – 1989. – 167 с.

Мусиенко М. М., Паршикова Т. В., Славный П. С. Спектрофотометрические методы в практике физиологии, биохимии и экологии растений. – К.: Фитосоциоцентр, 2001. – 200 с.

Набиева Н. А. Модификация генетических и метаболических последствий водного стресса у растений пшеницы // Физиол. растений. – 2004. – № 4. – С. 773-779.

Плохинский Н. А. Биометрия. – М.: Изд-во МГУ, 1970. – 367 с.

Стороженко В. О., Шадчина Т. М. Активність супероксиддисмутази та аскорбатпероксидази в хлоропластах листків ярої пшениці за умов натрійхлоридного засо-

лення ґрунту // Физиол. и биохим. культ. растений. – 2004. – Т. 36, № 4. – С. 315-319.

Трач В. В., Стороженко В. А. Супероксиддисмутаза как компонент антиоксидантной системы растений при абиотических стрессовых воздействиях // Физиология и биохимия культ. растений. – 2007. – Т. 39, № 4. – С. 291-302.

Филипенко П. С., Титоренко М. В., Потапов Г. В. Влияние α-токоферола на процессы перекисного окисления липидов в печени собак с острым панкреатитом // Ученые записки Ставропольской государственной медицинской академии. – 2006. – № 3. – С. 78-84.

Чевари С., Андял Т., Штренгер Я. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте // Лабораторное дело. – 1991. – № 3. – С. 95-99.

Allen R. D., Webb R. P., Schake S. A. Use of transgenic plants to study antioxidant defenses // Free Radic. Biol. Med. – 1997. – Vol. 23, № 3. – P. 473-479.

Arnon D. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in Beta vulgaris // Plant Physiol. – 1949. – № 24. – P. 1-15.

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.

Barka E. A. Protective enzymes against reactive oxygen species during ripening of tomato (Lycopersicon esculentum) fruits in response to low amounts of UV-C. // Austr. J. Plant Physiol. – 2001. – Vol. 28. – P. 785-791.

Bassi P. Effect of lead on nuclear repetitive DNA of the moss *Funaria hygrometrica* (Funariales) // Ann. Bot. – 1995. – № 87. – P. 537-534.

Baszynski T. Interference of Cd^{2+} in functioning of the photosynthetic apparatus of higher plants // Acta Soc. bot. pol. – 1980. – Vol. 48, № 4. – P. 291-301.

Bouvier F., Backhaus R. A., Camara B. Induction and control of chromoplast-specific carotenoid genes by oxidative stress // J. Biol. Chem. – 1998. – Vol. 273, № 46. – P. 30651-30659.

Bredford W. A simple method for protein test // Annal. Biochem. – 1976. – № 72. – P. 248-252.

Bueno P., Varela J., Gimenes-Gallego G. et al. Peroxisomal copper, zinc superoxide dismutase. Characterization of the isoenzyme from watermelon cotyledons // Plant Physiol. – 1995. – Vol. 108, № 3. – P. 1151-1160.

Choudhury S., Panda S. K. Heavy metal phytotoxicity induces oxidative stress in moss, *Taxithelium* sp. //Curr. Sci. – 2003. – 84. – P. 631-663.

Choudhury S., Panda S. K. Induction of oxidative stress and ultrastructural changes in moss *Taxithelium nepalense* (Schwaegr.) Broth. under lead and arsenic phytotoxicity // Current Science. – 2004. – Vol. 87, № 3. – P. 342-346.

Christov K., Bakardjieva N. Subcellular distribution of superoxide dismutase isoforms in lucerne leaves (*Medicago rigidula*) and effect of calcium and zink ions // Докл. Бълг. АН. – 1999. – Vol. 52, № 3-4. – С. 89-92.

Dean R. T., Hunt J. V., Grant A. J. et al. Free radicals damage in proteins: the influence of the relative localization of radical generation, antioxidants and target proteins // Free Radical Biol. Med. – 1991. – № 11. – P. 161-168.

Foyer C. H., Harbinson J. Relationships between antioxidant metabolism and carotenoids in the regulation of photosynthesis // The photochemistry of carotenoids/ Eds. H. A. Frank, A. J. Young, R. J. Cordell. – Dordrext, The Netherlands: Kluwer Acad. Publ., 1999. – P. 305-325.

FOYER C. H., NOCTOR G. Redox homeostasis and antioxidant signaling. A metabolic interface between stress perception and physiological responses // Plant Cell. – 2005. – Vol. 17, № 5. – P. 1866-1876.

MUNNE-BOSCH S., ALERGE L. Drought-induced changes in the redox state of α-tocopherol, ascorbate and the carnosic acid in chloroplasts of labiatae species differing in carnosic acid contens // Plant Physiol. – 2003. – Vol. 131. – P. 1816-1825.

SAKAKI T. Photochemical oxidants: toxicity // Responses of plant metabolism to air pollution and global change / Eds. L. J. De Kok, J. Stulen. – Leiden, The Netherlands: Backhuys Publ., 1998. – P. 117-129.

SMITH J., VIERHGELLER T. L., THRONE C. A. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenate using 5,5´-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) // Annal. Biochem. – 1988. – № 175. – P. 408-413.

STOBART A. K., GRIFITHS W. T., AMEEN-BUKHARI L. et al. The effect of Cd^{2+} on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley // Physiol. Plant. – 1995. – Vol. 63, № 6. – P. 293-295.

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС В ИЗОЛИРОВАННЫХ ХЛОРОПЛАСТАХ МХА *FONTINALIS ANTIPYRETICA* HEDW. И ЕГО МОДИФИКАЦИЯ С УЧАСТИЕМ α-ТОКОФЕРОЛА

Н. Я. Кияк

Изучено влияние ацетата свинца на развитие окислительного стресса в изолированных хлоропластах мха *Fontinalis antipyretica*. Внесение тяжелого металла в среду инкубации хлоропластов приводило к деградации хлорофиллов, индуцировало процесс липопероксидации и окислительной модификации белков. Также наблюдалось снижение активности супероксиддисмутазы и уменьшение количества восстановленой формы глутатиона. Антиоксидант α-токоферол существенно снижал последствия негативного влияния свинца, ингибируя нарастание процесса липопероксидации и стабилизируя функциональное состояние ядерной ДНК, что подтверждает его протекторные свойства в условиях окислительного стресса.

Ключевые слова: *lead ions, isolated chloroplasts, malonic dialdehyde, carbonylproteins, superoxide dismutase, reduced form of glutathione, luminescence of DNA*

OXIDATIVE STRESS IN ISOLATED CHLOROPLASTS OF MOSS *FONTINALIS ANTIPYRETICA* HEDW. AND ITS MODIFICATION BY α-TOKOPHEROL

N. YA. KYJAK

It was investigated the influence of lead acetate on the development of oxidative stress in isolated chloroplasts of moss *Fontinalis antipyretica*. In the medium of the chloroplasts incubation the heavy metal caused the degradation of chlorophylls, induced the processes of lipid peroxidations and oxidative modification of proteins. The activity of the components of antioxidative system (superoxide dismutase, reduced form of glutathione) in the isolated chloroplasts reduced when lead acetate had been added to the medium of the chloroplasts incubation. Antioxidant α-tocopherol essentially decreased the lead effects reducing the processes of lipoperoxidation and the stabilization of the functional state of nuclear DNA. It confirms the protective properties of α-tocopherol in the conditions of the oxidative stress.

Key words: *lead ions, isolated chloroplasts, malonic dialdehyde, carbonylproteins, superoxide dismutase, reduced form of glutathione, luminescence of DNA*

Надійшла 21.06.2010
Прийнята до друку 09.11.2010

Кияк Н. Я. Інститут екології Карпат НАН України, вул. Стефаника, 11, м. Львів, 79000, Україна; e-mail: morphogenesis@mail.lviv.ua

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