

УДК 577.152:582.736.3:546:30

## ВЛИЯНИЕ СОЛЕЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ГЛИОКСИЛАТНОГО ЦИКЛА И МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЕНАХ СОИ

Е.Ф. БЕЗДУДНАЯ

*Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина  
61077 Харьков, пл. Свободы, 4*

Исследовано влияние  $\text{CoCl}_2$  и  $\text{CdCl}_2$  на активность изоцитратлиазы, малатсинтазы и сукцинатдегидрогеназы в семядолях сои на ранних этапах прорастания. Показано, что  $\text{CoCl}_2$  активирует изоцитратлиазную активность на третьи сутки, а  $\text{CdCl}_2$  ингибирует активность этого фермента уже в первые сутки прорастания по сравнению с контролем. Активность малатсинтазы снижается на пятые сутки прорастания независимо от наличия солей металлов. Ионы металлов тормозят активность сукцинатдегидрогеназы к пятым суткам.

*Ключевые слова:* *Glicine max* L., соя, изоцитратлиаза, малатсинтаза, сукцинатдегидрогеназа, глиоксилатный цикл, хлорид кобальта, хлорид кадмия.

В последнее время в связи с бурным развитием промышленности наблюдается значительное накопление тяжелых металлов в окружающей среде. Это элементы, физиологическая роль которых пока не выяснена (Pb, Hg, Cd и др.), и металлы, необходимые для нормальной жизнедеятельности растений (Fe, Mn, Cu, Co и др.). Последние в низких концентрациях играют важную роль как кофакторы многих ферментативных реакций, однако при избытке могут причинять значительный вред растительному организму, а также здоровью животных и человека [5]. Для поиска способов защиты растений от негативного влияния тяжелых металлов и снижения их накопления в сельскохозяйственной продукции необходимо всестороннее изучение механизмов их поступления в растительный организм, фитотоксического действия, а также повышения устойчивости, которые выработались у растений в процессе эволюции [5].

Избыточное поступление тяжелых металлов, как правило, приводит к ингибированию роста растений, что, с одной стороны, может реализовываться нарушением метаболических процессов, а с другой — обусловлено их взаимодействием с полисахаридами и снижением пластичности клеточной оболочки [15]. Поступление тяжелых металлов в ткани растений может приводить как к непосредственному влиянию самих ионов металлов, так и активированию свободнорадикального окисления и последующего развития оксидативного стресса [10].

Глиоксилатный цикл, впервые описанный в 1957 г. Корнбергом и Кребсом, активно функционирует в семенах масличных растений на ранних этапах прорастания. Основные ферменты этого цикла локализованы в специальных органеллах — глиоксисомах [11]. Значение цикла

состоит в утилизации запасных липидов семян масличных культур и превращении их в углеводные компоненты, необходимые как для формирования проростков и подготовки их к автотрофному питанию, так и для гликолиза [14]. Обычно о наличии глиоксилатного цикла судят по активности двух ферментов: изоцитратлиазы и малатсинтазы. Присутствие одного из них еще не доказывает наличие глиоксилатного цикла, поскольку изоцитратлиаза, например, может функционировать вне этого цикла [8]. Изоцитратлиаза катализирует реакцию расщепления изоцитрата на глиоксилат и сукцинат. Образовавшийся глиоксилат конденсируется со следующей молекулой ацетил-КоА в реакции, катализируемой малатсинтазой. Сукцинат поступает из глиоксисом в митохондрии, где окисляется в реакции, катализируемой сукцинатдегидрогеназой. Сукцинатдегидрогеназа является мембранным белковым комплексом, одновременно обеспечивающим функционирование цикла трикарбоновых кислот и электронтранспортной цепи [11]. Процесс  $\beta$ -окисления жирных кислот поставляет субстрат для глиоксилатного цикла, а последний — для цикла трикарбоновых кислот. Восстановительные эквиваленты, образующиеся в упомянутых выше реакциях, окисляются в дыхательной цепи и обеспечивают энергией ранние этапы прорастания [7].

Поскольку ферменты глиоксилатного цикла регулируют реакции превращения жирных кислот в углеводы и утилизацию последних при формировании гипокотыля, изучение активности ферментов глиоксилатного цикла — малатсинтазы и изоцитратлиазы, а также митохондриальной сукцинатдегидрогеназы при прорастании семян в присутствии солей тяжелых металлов представляет значительный интерес, так как дает возможность прогнозировать всхожесть семян культурных растений и их урожайность в условиях загрязнения почв и грунтовых вод этими соединениями.

### Методика

Объектом исследования были семена сои *Glycine max* L. сорта Кларк урожая 2006 г., выращенные на территории вивария ХНУ им. В.Н. Каразина. Семена стерилизовали погружением в 2,5 %-й раствор гипохлорита натрия на 2 мин, после чего промывали 0,05 М раствором HCl в течение 20—30 с и далее — трехкратно дистиллированной водой.

Семена проращивали при температуре  $23 \pm 2$  °C в термостате в чашках Петри на фильтровальной бумаге, смоченной дистиллированной водой (контроль); при исследовании влияния солей металлов среда проращивания содержала  $\text{CoCl}_2$  или  $\text{CdCl}_2$  концентрацией  $10^{-4}$  М [9]. Растворы солей предварительно стерилизовали в автоклаве при давлении 50 кПа в течение 30 мин. Семена покрывали этим раствором на четверть и заменяли его через каждые сутки.

В экспериментах использовали семядоли семян сои, прорастающих через 1, 3 и 5 сут. Навеску растительной ткани гомогенизировали в охлажденной среде, содержащей 50 мМ *трис*-HCl буфера (pH 7,5), 0,5 М сахарозы, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ дитиотреитола, 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ . Гомогенат фильтровали сквозь четыре слоя марли и центрифугировали при 1300 g в течение 10 мин. Полученный осадок, содержащий не полностью разрушенные клетки и ядра, отбрасывали [12]. Надосадочную жидкость центрифугировали в течение 20 мин при 8500 g [2]. Осадок митохондрий ресуспендировали в 0,1 М Na-K-фосфатном буфере (pH 7,4) и повторно

центрифугировали при 8500 g в течение 15 мин. Отмытые митохондрии ресуспендировали в Na-K-фосфатном буфере и использовали для определения сукцинатдегидрогеназной активности.

Постмитохондриальную фракцию центрифугировали в течение 20 мин при 14 000 g. Осадок, содержащий грубую фракцию микротелец, разрушали путем погружения проб в жидкий азот и ресуспендировали в 2 мл 50 mM *tris*-HCl буфера (pH 7,5), содержащего 1 mM ЭДТА, 5 mM ДТТ и 1 mM MgCl<sub>2</sub>. Затем проводили повторное центрифугирование в течение 15 мин. Осадок растворяли в 0,4 %-м растворе дигитонина и повторно центрифугировали в указанном режиме [8]. Для получения необходимого размера микротелец проводили фильтрацию через мембранные фильтры («Millipore», США) с диаметром пор 0,45 мкм [3]. Фильтрат использовали для определения активности изоцитратлиазы и малатсинтазы. Все операции проводили при температуре 3 ± 1 °С.

Активность сукцинатдегидрогеназы (КФ 1.3.99.1) определяли при λ = 420 нм по восстановлению феррицианида калия при наличии сукцината натрия, выражали в наномолях сукцината на 1 мг белка за 1 мин [12]. Активность изоцитратлиазы (КФ 4.1.3.1) находили методом Диксона при λ = 324 нм и выражали в наномолях глиоксилата на 1 мг белка за 1 мин [19], активность малатсинтазы (КФ 4.1.3.2) — по увеличению концентрации КоА-SH, который образуется в ходе реакции из ацетил-КоА, и выражали в наномолях КоА-SH на 1 мг белка за 1 мин [19]. Белок определяли методом Лоури в модификации Миллера, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

Статистическую обработку результатов проводили методом вариационной статистики ANOVA с использованием пакета программ «Statistica 6.0».

## Результаты и обсуждение

При прорастании семян сои на среде без солей тяжелых металлов активность изоцитратлиазы в семядолях достигала максимума на пятые сутки (табл. 1). В то же время при наличии в среде кобальта активность данного фермента достоверно повышалась уже на третьи сутки проращивания и сохранялась высокой до конца эксперимента. Вероятно, это связано с тем, что ионы кобальта в физиологических концентрациях являются активаторами метаболических процессов и способствуют более интенсивной мобилизации запасных веществ [14]. Так, известно, что кобальт — кофактор метилмалонил-КоА-мутазы — фермента, участвующего в деградации жирных кислот с нечетным числом атомов углерода, кото-

ТАБЛИЦА 1. Влияние солей тяжелых металлов на активность изоцитратлиазы в семядолях сои при прорастании, нмоль/(мин · мг белка); M ± m, n = 3—4

Сутки проращивания	Контроль	CoCl <sub>2</sub>	CdCl <sub>2</sub>
1-е	19,6 ± 1,6	21,3 ± 1,4	11,9 ± 1,8*
3-е	22,4 ± 3,0	37,2 ± 1,7*#	25,7 ± 1,2#
5-е	31,8 ± 1,9 #	37,4 ± 2,1*#	29,6 ± 2,3#

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3: \*p ≤ 0,05 по отношению к контролю; # p ≤ 0,05 по отношению к результатам на 1-е сутки.

рыми богаты запасные липиды растений. Кроме того, кобальтсодержащие ферменты играют важную роль в метаболизме аминокислот [4].

Хлорид кадмия оказывал тормозящее влияние на изоцитратлиазную активность уже в первые сутки прорастания семян, которая восстанавливалась до контрольных значений на третьи и пятые сутки. Это, по-видимому, связано с низким содержанием хелатирующих веществ и ингибирующим действием свободного кадмия на синтез глиоксисомальных ферментов и биогенез глиоксисом в первые сутки прорастания [24]. В дальнейшем индукция синтеза металлотионеинов и фитохелатинов, вероятно, уменьшала негативное влияние кадмия на клетки [18, 21].

Что касается активности малатсинтазы, то в контроле она повышалась на третьи сутки и снижалась на пятые (табл. 2). В реакции, катализируемой малатсинтазой, утилизируются глиоксилат и ацетил-КоА, образующийся малат включается в реакции глюконеогенеза. Снижение активности малатсинтазы на пятые сутки, по-видимому, связано с уменьшением пула липидов в прорастающих семенах. Известно, что глиоксисомы активно функционируют только до тех пор, пока рост проростка обеспечивается запасенными питательными веществами семядолей. Наличие солей металлов не оказывало достоверного влияния на активность малатсинтазы по сравнению с контролем.

Полученные нами данные о влиянии хлорида кобальта или кадмия на активность сукцинатдегидрогеназы в семядолях сои на ранних этапах прорастания свидетельствуют о снижении активности исследуемого фермента на пятые сутки проращивания по сравнению с контролем (табл. 3). Это может ослабить функционирование цикла Кребса, в результате чего у растений снизится обеспечение восстановительными и энергетическими эквивалентами метаболических процессов [4].

Наши данные согласуются с результатами исследований других авторов, в которых было показано ингибирующее действие солей тяжелых металлов на сукцинатдегидрогеназу [16].

Описана стимуляция свободнорадикальных реакций пероксидного окисления липидов (ПОЛ) под действием стрессовых факторов, однако сведения о влиянии тяжелых металлов на процессы липопероксидации в растительных организмах немногочисленны [6]. На сегодня известно,

ТАБЛИЦА 2. Влияние солей металлов на активность малатсинтазы в семядолях сои при прорастании, нмоль/(мин · мг белка);  $M \pm m$ ,  $n = 3-4$

Сутки проращивания	Контроль	CoCl <sub>2</sub>	CdCl <sub>2</sub>
1-е	62,7 ± 5,3	70,4 ± 5,3	58,4 ± 4,7
3-е	72,9 ± 3,6	66,7 ± 4,1	63,2 ± 2,6
5-е	48,7 ± 4,5 <sup>#</sup>	54,1 ± 4,2 <sup>#</sup>	47,1 ± 3,2 <sup>#</sup>

ТАБЛИЦА 3. Влияние солей металлов на активность сукцинатдегидрогеназы в семядолях сои при прорастании, нмоль/(мин · мг белка);  $M \pm m$ ,  $n = 3-4$

Сутки проращивания	Контроль	CoCl <sub>2</sub>	CdCl <sub>2</sub>
1-е	5,87 ± 0,70	6,93 ± 0,59	4,59 ± 0,41
3-е	3,71 ± 0,83	3,01 ± 0,67	3,96 ± 0,13
5-е	4,46 ± 0,79	2,57 ± 0,41 <sup>**</sup>	1,82 ± 0,34 <sup>**</sup>

что одним из универсальных механизмов реализации токсического действия тяжелых металлов является активизация свободнорадикального окисления [23]. Кобальт, как металл с переменной валентностью, усиливает продукцию активных форм кислорода, участвуя в реакциях Фентона, в то время как кадмий, связываясь с SH-группами белков и восстановленного глутатиона, снижает антиоксидантный потенциал клетки. И в том, и в другом случае нарушается баланс между про- и антиоксидантами, что приводит к развитию оксидативного стресса, окислительному повреждению макромолекул и надмолекулярных комплексов [20].

В физиологически нормальных условиях в растениях количество свободных радикалов и продуктов ПОЛ поддерживается на минимальном стабильном уровне благодаря системе антиоксидантных ферментов, таких как супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, глутатионпероксидаза. Согласно литературным данным, в стрессовых условиях уровень СОД снижался по сравнению с контролем [13].

Стимуляция ПОЛ, вероятно, может осуществляться также путем активации липоксигеназы с образованием гидропероксидов, так как наиболее ранние стрессовые реакции происходят на уровне мембран, а объектом, возможно, являются ненасыщенные жирные кислоты, которыми богаты семена масличных растений.

Ранее нами показано, что проращивание семян сои на среде, содержащей хлорид кобальта или кадмия, приводит к усилению ПОЛ. Уровень ТБК-активных продуктов на пятые сутки был в три раза выше по сравнению с контролем [1]. Это дает основание предположить, что оксидативный стресс, индуцированный ионами тяжелых металлов, может быть одной из причин снижения сукцинатдегидрогеназной активности в семядолях сои. Известно, что в состав сукцинатдегидрогеназы входят два железосерных кластера:  $[2\text{Fe}-2\text{S}]$  в  $\alpha$ -субъединице и  $[4\text{Fe}-4\text{S}]$  в  $\beta$ -субъединице. Эти кластеры повреждаются активными формами кислорода, а их разрушение приводит к потере ферментативной активности [22].

Таким образом, установлено, что проращивание семян сои на среде, содержащей ионы кобальта, оказывает стимулирующее действие на активность изоцитратлиазы. Ионы кадмия в первые сутки проращивания ингибируют активность изоцитратлиазы с последующим восстановлением ее до контрольного уровня [17]. Ионы изученных металлов не оказывали существенного влияния на малатсинтазную активность и угнетали активность сукцинатдегидрогеназы на пятые сутки проращивания.

1. Бездудная Е.Ф., Калиман П.А. Влияние тяжелых металлов на активность ключевых ферментов глиоксилатного цикла и содержание ТБК-активных продуктов в семенах сои *Glycine max* L. при проращивании // Укр. биохим. журн. — 2008. — 80, № 1. — С. 80—85.
2. Биологические мембраны. Методы; Пер. с англ. / Под ред. Дж.Б. Финдлея, У.Г. Эванза. — М.: Мир, 1990. — 424 с.
3. Грядунова Г.П., Козлова Л.М., Литвинова Т.П. Руководство к практическим занятиям по заводской технологии лекарственных форм. — М.: Медицина, 1986. — 272 с.
4. Гудвин Т., Мерсер Э. Введение в биохимию растений. — В 2 т.; Пер. с англ. — М.: Мир, 1986. — 393 с.
5. Гуральчук Ж.З. Фітотоксичність важких металів та стійкість рослин до їх дії. — К.: Логос, 2006. — 208 с.
6. Жиров В.К., Мерзляк М.Н., Жибедов П.М., Руденко С.М. Жирные кислоты и перекисное окисление липидов у растений костреча безостого // Бюл. Главн. бот. сада АН СССР. — 1988. — № 147. — С. 54—57.

7. Землянхун А.А., Землянхун Л.А., Епринцев А.Т., Игамбердиев А.У. Глиоксилатный цикл растений. — Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та, 1986. — 148 с.
8. Землянхун А.А., Игамбердиев А.У. Регуляция активности изоцитратлиазы в растениях конопли // Физиология растений. — 1985. — **32**, № 4. — С. 739—746.
9. Костишин С.С., Марченко М.М., Руденко С.С. та ін. Антипероксидантно-пероксидантний статус як критерій адаптації рослин до позаоптимальних факторів // Фізіологія рослин в Україні на межі тисячоліть. — К.: Фітосоціоцентр, 2001. — Т. 2. — С. 52—66.
10. Курський М.Д., Кучеренко С.М. Біомембранологія. — К.: Вища шк., 1993. — 260 с.
11. Медведев С.С. Физиология растений: Учебник. — СПб.: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2004. — 336 с.
12. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / Под ред. М.И. Прохоровой. — Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. — 272 с.
13. Платонова А.А., Костишин С.С. Вплив малонового діальдегіду та активність антиоксидантних ферментів у проростках гороху за дії іонів кадмію // Физиология и биохимия культ. растений. — 2000. — **32**, № 2. — С. 146—150.
14. Полевой В.В. Физиология растений. — М.: Высш. шк., 1989. — 464 с.
15. Сергеева Л.Є. Іони важких металів та клітинна селекція рослин // Физиология и биохимия культ. растений. — 2006. — **38**, № 3. — С. 197—208.
16. Серегин И.В., Иванов В.Б. Физиологические аспекты токсического действия кадмия и свинца на высшие растения // Физиология растений. — 2001. — **48**, № 4. — С. 606—630.
17. Ягодин Б.А., Виноградова С.Б., Говорина В.В. Кадмий в системе почва—удобрения—растения—животные организмы и человек // Агрехимия. — 1989. — № 5. — С. 118—130.
18. Clemens S., Kim E.J., Neumann D. et al. Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatase synthases from plants and yeast // EMBO J. — 1999. — **18**. — P. 3325—3333.
19. Dixon G.H., Kornberg H.L. Assay methods for the key enzymes of the glyoxylate cycle // Biochem. J. — 1959. — **72**, N 1. — P. 3.
20. Halliwell B. // Ibid. — 1982. — 205. — P. 461.
21. Robinson N.J., Tommey A.M., Kuske C. et al. Plant metallothioneins // Ibid. — 1993. — **295**. — P. 1—10.
22. Shnarrenberger C., Martin W. Evolution of the enzymes of the citric acid cycle and the glyoxylate cycle of higher plants // Eur. J. Biochem. — 2002. — **269**. — P. 868—883.
23. Shutzenduble A., Polle A. Plant responses to abiotic stress: heavy-metal induced oxidative stress and protection by mycorrhization // J. Exp. Bot. — 2002. — **53**, N 372. — P. 1351—1365.
24. Zimmerman R., Neupert W. Biogenesis of glyoxysomes. Synthesis and intracellular transfer of isocitrate lyase // Eur. J. Biochem. — 1980. — **112**, N 2. — P. 225—233.

Получено 03.07.2008

#### ВПЛИВ СОЛЕЙ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ ГЛЮКСИЛАТНОГО ЦИКЛУ ТА МІТОХОНДРІАЛЬНОЇ СУКЦИНАТДЕГІДРОГЕНАЗИ У ПРОРОСТАЮЧОМУ НАСІННІ СОЇ

О.Ф. Бездудна

Харківський національний університет ім. В.Н.Каразіна

Досліджено вплив  $\text{CoCl}_2$  і  $\text{CdCl}_2$  на активність ізоцитратліази, малатсинтази та сукцинатдегідрогенази в сім'ядолях сої на ранніх етапах проростання. Показано, що  $\text{CoCl}_2$  активує ізоцитратліазну активність на третю добу, а  $\text{CdCl}_2$  гальмує активність цього ферменту вже в першу добу проростання відносно контролю. Активність малатсинтази знижується на п'яту добу проростання незалежно від наявності солей металів. Іони металів гальмують активність сукцинатдегідрогенази на п'яту добу.

INFLUENCE OF HEAVY METAL SALTS ON ACTIVITY OF GLYOXYLATE CYCLE  
ENZYMES AND MITOCHONDRIAL SUCCINATE DEHYDROGENASE IN  
GERMINATING SOYBEAN SEEDS

*E.F. Bezudna*

V.N. Karazin Kharkiv National University  
4 Svobody sq., Kharkiv, 61077, Ukraine

The influence of  $\text{CoCl}_2$  and  $\text{CdCl}_2$  on the activity of isocitratlyase, malatsynthase and succinate dehydrogenase in the seedlobes at early stages of germination of soybean seeds was investigated.  $\text{CoCl}_2$  increased isocitratlyase activity at 3-d day and  $\text{CdCl}_2$  suppressed isocitratlyase activity at the 1-st day. Salt of metals has no influence on malatsynthase activity.  $\text{CoCl}_2$  and  $\text{CdCl}_2$  suppressed succinate dehydrogenase activity at 5-th day that may be caused by oxidative stress.

*Key words:* *Glicine max* L., soybean, isocitratlyase, malatsynthase, succinate dehydrogenase, glyoxylate cycle, cobalt chloride, cadmium chloride.