

ИЗМЕНЕНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В ПРОРОСТКАХ СОИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

В.Т. Синеговская¹, академик РАН, О.А. Терехова¹,
С.И. Лаврентьева², кандидат биологических наук,
Л.Е. Иваченко², К.С. Голохваст³, доктора биологических наук

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сои,
675027, Амурская область, Благовещенск, Игнатьевское шоссе, 19
E-mail: valsin09@gmail.com

²Благовещенский государственный педагогический университет,
675000, Благовещенск, ул. Ленина, 104

³Дальневосточный Федеральный университет,
690922, о. Русский, п. Аякс, 10

Изучено влияние окислительного стресса на активность и множественные формы рибонуклеазы (КФ 3.1.) и пероксидазы (КФ 1.11.1.7) проростков культурной сои, выращенных под воздействием тяжелых металлов. В связи с этим в проростках сои сорта Лидия определяли активность антиоксидантного фермента пероксидазы и содержание малонового диальдегида, характеризующего степень перекисного окисления липидов. Повышенный уровень малонового диальдегида под влиянием тяжелых металлов указывает на то, что токсичность этих загрязнителей проявилась через стимуляцию образования активных форм кислорода, что привело к развитию окислительного стресса. Показано, что в условиях окислительного стресса, вызванного сульфатом кадмия, активность рибонуклеазы в проростках сои повышается. Биогенные элементы Cu и Zn снижались, а Cd значительно повышал ее за счет появления новых форм фермента, что свидетельствует о способности клеток проростков сои противостоять воздействию тяжелого металла кадмия – стрессору растений. В то же время усиление перекисного окисления липидов служит сигналом, который реализуется посредством изменений пероксидазной и рибонуклеазной активности, что обеспечивает защиту растительной клетки от стрессового воздействия.

EFFECT OF HEAVY METALS ON OXIDATIVE PROCESSES IN SOYBEAN SEEDLINGS

Sinegovskaya V.T.¹, Terekhova O.A.¹,
Lavrent'yeva S.I.², Ivachenko L.E.², Golokhvast K.S.³

¹All-Russian Scientific Research Institute of Soybean,
675027, Amurskaya oblast, Blagoveshchensk, Ignatievskoe shosse, 19
E-mail: valsin09@gmail.com

²University Blagoveshchensk State Pedagogical, 675000, Blagoveshchensk, ul. Lenina, 104

³Far Eastern Federal University, 690922, o. Russkij, Ayaks, 10

The article shows the effect of oxidative stress on the activity and multiple forms of ribonuclease (EC 3.1.) And peroxidase (EC 1.11.1.7) of seedlings of cultured soybean grown under the influence of heavy metals. In this regard, the activity of the antioxidant peroxidase enzyme and the content of malon dialdehyde, which characterizes the degree of lipid peroxidation, was determined in soybean seedlings of varieties Lydia. The increased level of malondialdehyde (MDA) under the influence of heavy metals indicates that the toxicity of these pollutants appeared through the stimulation of the formation of reactive oxygen species (ROS), which led to the development of oxidative stress. Studies have established that under conditions of oxidative stress caused by cadmium sulfate, ribonuclease activity in soybean seedlings increases. Studies have established that under conditions of oxidative stress caused by cadmium sulfate, the ribonuclease activity in soybean seedlings increases. The biogenic elements Cu and Zn reduced the activity of ribonuclease, and Cd significantly increased it due to the emergence of new forms of the enzyme, which indicates the ability of soy sprout cells to withstand the effects of heavy metal cadmium plant stressor. At the same time, the enhancement of lipid peroxidation is a signal that is realized by changes in the peroxidase and ribonuclease activity, which protects the plant cell from stress.

Ключевые слова: *Glycine max* (L.) Merrill, окислительный стресс, тяжелые металлы, малоновый диальдегид, пероксидаза, рибонуклеаза, удельная активность, множественные формы

Избыточное поступление в организм тяжелых металлов способствует формированию окислительного стресса, сопровождающегося повреждением мембранных структур клеток, биологических макромолекул, в том числе ферментов [1, 2]. Растения подвергаются окислительному стрессу постоянно. Вследствие того, что процесс фотосинтеза является окислительным, концентрация молекулярного кислорода в листьях может увеличиваться и превращаться в активные формы кислорода (АФК). Нарушение структуры мембран клеток связано с образованием свободных радикалов, что приводит к перекисному окислению липидов (ПОЛ). Пе-

Key words: *Glycine max* (L.) Merrill, oxidative stress, heavy metals, malonic dialdehyde, peroxidase, ribonuclease, specific activity, multiple forms

роксид водорода участвует в образовании токсичных АФК, к которым относится синглетный кислород (¹O₂), свободные радикалы (O₂–• и HO•) и другие вещества [3]. В качестве маркера окислительного стресса можно использовать активность пероксидазы [4, 5]. Согласно гипотезе Реголи с коллегами [6], несмотря на то, что пероксидаза, как и каталаза, участвует в удалении H₂O₂, ее основная функция состоит в разрушении органических гидропероксидов и предотвращении продукции цитотоксичных ненасыщенных альдегидов и кетонов в процессах ПОЛ.

Ведущую роль в поддержании внутриклеточного

гомеостаза и адаптации к стрессорам играют ферменты [7, 8]. Интерес к гидролитическим ферментам обусловлен рядом причин, среди которых одна из важнейших связана с их участием в инициации и развитии патологического процесса в растительных тканях. К защитным ферментам, обладающим широкой субстратной специфичностью и способным нейтрализовать действие большого спектра вирусных, бактериальных и других инфекций, относится рибонуклеаза (РНКаза) (КФ 3.1.). Установлено, что она чувствительна к изменениям факторов внешней среды [9, 10].

У большинства вирусов растений генетический материал представлен РНК, поэтому можно предположить, что экстраклеточные РНКазы, индуцируемые поранением, являются одним из компонентов противовирусной защиты на начальных этапах инфекции. С.С. Сангаев [11] показал, что растения табака с повышенной активностью экстраклеточной рибонуклеазы характеризуются высокой устойчивостью к вирусу табачной мозаики. Это подтверждает гипотезу об участии экстраклеточных рибонуклеаз растений в формировании устойчивости к вирусам.

В связи с этим исследование проростков сои на активность рибонуклеазы в условиях окислительного стресса, вызванного действием тяжелых металлов, стало главной целью настоящей работы. Определяли также содержание малонового диальдегида и активность пероксидазы в этих условиях.

Методика. Материалом исследования служил сорт сои Лидия селекции Всероссийского научно-исследовательского института сои. Сою выращивали на питательной среде по общепринятой методике в модификации С.А. Бегуна [4] в течение 21 суток до появления первого тройчатого листа при температуре 25 °С и освещенности 450 лк. Ранее было установлено, что при загрязнении почвы медью и цинком в концентрации, соответствующей 2 ПДК, эти металлы накапливаются в проростках семян [9, 12]. Поэтому интоксикацию солями сульфата меди (II), сульфата цинка и сульфата кадмия проводили путем внесения их в питательную среду в концентрации 2 ОДК (ориентировочно допустимая концентрация), или $2 \cdot 10^{-3}$ М, $3 \cdot 10^{-3}$ М и $1,8 \cdot 10^{-5}$ М соответственно (Гигиенический норматив ГН 2.1.7.2511-09). В эксперименте использовали соли серной кислоты в связи с тем, что ионная сила действия солей убывает в ряду $\text{CO}_3^{2-} > \text{Cl}^- > \text{SO}_4^{2-}$ [13]. Контролем служили проростки, выращенные на питательной среде без добавления солей тяжелых металлов.

Содержание белка определяли биуретовым методом, удельную активность рибонуклеаз – спектрофотометрическим методом по Расселу [14]. Субстратом для определения РНКазной активности служила высокополимерная РНК из дрожжей. Инкубационную смесь готовили из 0,1 мл соевого экстракта, содержащего РНКазы, 0,4 мл 1 %-ной дрожжевой РНК в 0,2 М ацетатном буфере (рН 5,6). Смесь инкубировали при 37 °С в течение 45 мин, после чего не гидролизованную РНК осаждали, добавляли к пробам по 1 мл спиртово-магниевый осадителя. Затем пробирки ставили на 1 ч на лед для формирования осадка, который удаляли центрифугированием при 8000 мин⁻¹ в течение 10 мин. Из супернатанта отбирали пробы по 0,5 мл, к каждой прибавляли по 3 мл воды и измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 260 нм против воды. Параллельно обрабатывали контрольную пробу. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое вызывает увеличение поглощения раствора на единицу оптической плотности при 260 нм/мин.

Удельную активность пероксидаз сои определяли фотометрическим методом по Бояркину в модификации Мокроносова по изменению оптической плотности [15]. В качестве субстрата использовали бензидин солянокислый. В две кварцевые кюветы с толщиной оптического слоя 20 мм приливали 0,02-0,1 мл вытяжки в зависимости от общей активности фермента, 4 мл ацетатного буфера (рН 4,7) и 3 мл бензидина. Кюветы в колориметре фотоэлектрическом концентрационном располагали против светофильтров при 670 нм. Устанавливали стрелку гальванометра на нуль. Автоматической пипеткой вносили в открытую кювету 0,5 мл раствора 0,3%-ной H_2O_2 и одновременно включали секундомер. Быстро закрывали кюветную камеру и по шкале оптической плотности следили за развитием синей окраски. По секундомеру замечали время достижения оптической плотности 0,5. Удельную активность выражали в единицах/мг белка.

Множественные формы РНКаз и пероксидаз выявляли методом электрофореза на колонках полиакриламидного геля (ПААГ). Фракционирование растворимых белков проводили в 7,5%-ном ПААГ при 4 °С по Дэвису [16] в модификации для белков сои [4]. На каждую колонку ПААГ наносили 0,1 мл экстракта соевого белка. Электрофорез проводили на приборе ПЭФА-1 в трис-глициновом буфере (рН 5,7; ионная сила – 0,1) при напряжении 200-500В, силе тока 2,5 мА на каждую колонку, в течение первых 15 мин и 5 мА на колонку – в последующие 1,0-1,5 ч при температуре 2-6 °С. В качестве метчика использовали бромфеноловый синий.

Места локализации РНКаз на электрофореграмме выявляли после инкубации гелей в течение 30 мин в 0,5%-ном растворе РНК в ацетатном буфере (рН 5,7) и последующей окраски 0,2%-ным раствором метиленовой сини в течение 30 мин. Избыток красителя удаляли 5%-ным раствором уксусной кислоты. Зоны рибонуклеазной активности проявлялись в виде бесцветных полос на голубом фоне.

Выявление множественных форм пероксидазы после электрофореза проводили бензидиновым реагентом в ацетатном буфере (рН 4,7). Соляно-кислый бензидин (0,5 г) растворяли в 100 см³ ацетатного буфера, состоящего из 2,3 см³ уксусной кислоты (ледяной), 5,45 г уксуснокислого натрия и доводили H_2O до 200 см³. Гели помещали на 20 мин в бензидиновый реагент, а затем переносили в 0,1%-ный водный раствор пероксида водорода, через несколько секунд (в зависимости от активности фермента) проявлялись формы пероксидаз в виде четких синих полос, переходящих через некоторое время в бурые.

Стандартным критерием для характеристики множественных форм ферментов служит их относительная электрофоретическая подвижность (Rf). Ранее каждой форме фермента сои мы присвоили сокращенное обозначение в соответствии со значениями их Rf (для пероксидазы – П1-П18, рибонуклеазы – Р1-Р12) [8]. Содержание малонового диальдегида (МДА) определяли с помощью тиобарбитуровой кислоты [17].

Биохимические исследования проводили в 2 биологических и 3 аналитических повторностях. Статистическая обработка материала и расчет коэффициентов корреляций проведены по методу Плохинского [18].

Результаты и обсуждение. Выявленный нами повышенный уровень МДА под влиянием тяжелых металлов указывает на то, что токсичность этих поллютантов проявилась через стимуляцию образования АФК, что привело к развитию окислительного стресса (рис. 1). Его негативные последствия выражаются в

комплексе системных перестроек мембранных структур клетки (ПОЛ), дестабилизации и нарушении ее генома. Данные наших исследований позволяют сделать вывод о том, что аккумуляция тяжелых металлов приводит к стимуляции адаптационно-детоксикационных возможностей биохимических систем.

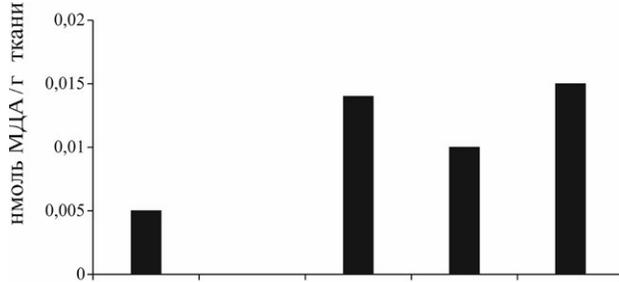


Рис. 1. Содержание МДА в проростках сои, выращенных на питательной среде: К – контроль (без солей тяжелых металлов), 1 – CuSO₄, 2 – ZnSO₄, 3 – CdSO₄.

Ранее установлено, что тяжелые металлы связываются с сульфгидрильными группами белков [18]. Это в свою очередь приводит к нарушению структуры белков и ингибированию активности ферментов. Полученные нами результаты свидетельствуют о снижении активности пероксидаз, что, возможно, связано с ингибированием данного фермента ионами кадмия (рис. 2).

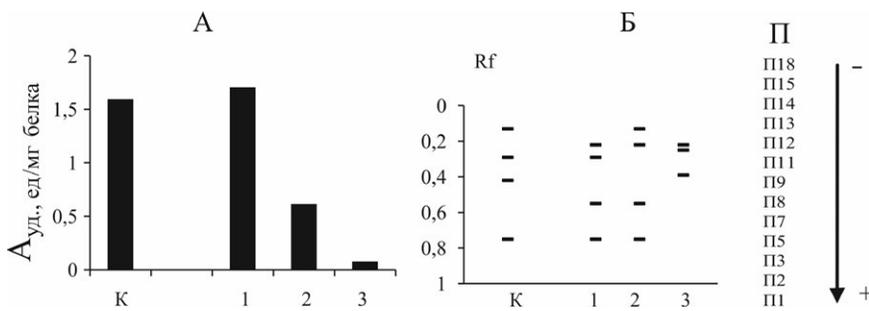


Рис. 2. Удельная активность (А) и множественные формы (Б) пероксидаз проростков сои, выращенных на питательной среде: К – контроль (без солей тяжелых металлов), 1 – CuSO₄, 2 – ZnSO₄, 3 – CdSO₄. Стрелка – направление электрофореза от катода к аноду.

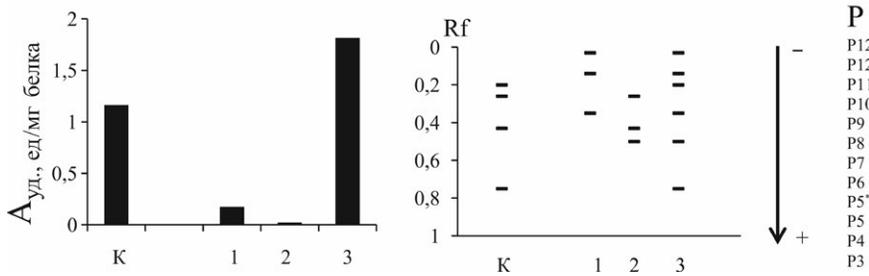


Рис. 3. Удельная активность (А) и множественные формы (Б) рибонуклеаз проростков сои, выращенных на питательной среде: К – контроль (без солей тяжелых металлов), 1 – CuSO₄, 2 – ZnSO₄, 3 – CdSO₄. Стрелка – направление электрофореза от катода к аноду.

К.С. Волковым [19] обнаружена индукция ионами меди и цинка экспрессии генов металлотионеинов у растений. Причем адаптация растений к окислительному стрессу сопровождалась снижением токсического эффекта меди [20]. Роль металлотионеина состоит в регуляции концентрации таких микроэлементов, как цинк и медь в клетке [21, 22]. В наших исследованиях в присутствии сульфата меди удельная активность пероксидаз проростков незначительно повышалась относительно контроля, а число множественных форм сохранялось на начальном уровне. Интересно отметить, что в среде тяжелых металлов выявлена форма П14, отсутствующая в контроле. Возможно, она появляется в ответ на окислительный стресс растений сои. В среде с сульфатом кадмия отсутствуют формы пероксидаз с высокой электрофоретической подвижностью, что существенно сужает диапазон физико-химических условий экспрессии генов этого фермента. Данный факт, вероятно, и отразился на удельной активности пероксидазы, которая была минимальной и составила 0,1 ед./мг белка.

Активность рибонуклеазы проростков под влиянием сульфата кадмия увеличилась в 1,5 раза по сравнению с контролем (рис. 3). Так, удельная активность РНКаз проростков возросла с 1,2 до 1,8 ед./мг белка, а число множественных форм фермента – с 4 до 6. В то же время удельная активность рибонуклеаз под влиянием сульфата цинка снизилась почти до критического значения (0,02 ед./мг белка), а число множественных форм фермента – с 9 до 3.

Известно, что кадмий может замещать цинк во многих биохимических процессах, нарушая работу большого количества ферментов [1]. Цинк необходим для стабилизации структуры нуклеиновых кислот и играет важную роль в процессе трансляции и экспрессии генов [22, 23]. Комплексы меди (II) ингибируют рибонуклеазную активность растений [24]. Данные, полученные в наших исследованиях, также показывают, что в среде с сульфатом меди рибонуклеазная активность проростков снижается почти в 10 раз. При этом число множественных форм фермента сократилось до 3, и не обнаружены формы со средней и высокой электрофоретической активностью фермента, что значительно уменьшает его гетерогенность.

Таким образом, выявлена зависимость активности рибонуклеазы от вида тяжелого металла. Биогенные элементы Cu и Zn снижали, а Cd значительно повышал ее за счет появления новых форм фермента, что указывает на способность клеток проростков сои противостоять воздействию тяжелого металла кадмия – стрессору растений. В то же время активация перекисного окисления липидов служит сигналом, который переключает геном на новый режим экспрессии, реализация которого в комплексе с пероксидазой и ри-

бонуклеазой обеспечивает защиту растительной клетки от стрессового воздействия.

Литература

1. Бездудная Е.Ф., Калиман П.А. Влияние тяжелых металлов на активность ключевых ферментов гликозилатного цикла и содержание ТБК-активных продуктов в семенах сои *Glycine max* L. при проращивании // Украинський біохімічний журнал. – 2008. – Т.80. – № 1 – С. 83-88.
2. Дзугоева Ф.С., Можяева И.В., Дзугоев С.Г., Маргиева О.И., Тедтоева А.И., Отиев М.А. Окислительный стресс и биохимические маркеры эндотелиальной дисфункции и повреждения внутренних органов в условиях интоксикации тяжелым цветным металлом в эксперименте // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины: международный научно-теоретический журнал. – М.: Издательство РАНМ, 2016. – № 8. – С.161-164.
3. Чупахина Г.Н., Масленников П.В., Скрыпник Л.Н. Природные антиоксиданты (экологический аспект): монография. – Калининград: Изд-во БФУ им. И. Канта, 2011. – 111 с.
4. Бегун С.А. Способы приема изучения и отбора эффективности клубеньковых бактерий сои. Методы аналитической селекции – Благовещенск: Изд-во «Зея», 2005. – 70 с.
5. Рогожин В.В. Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов. – СПб.: ГИОРД, 2004. – 240с.
6. Regoli F., Gorbi S., Frenzilli G. Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach // *Mar. Environ. Res.* – 2002. – V. 54. – P. 419-423.
7. Цветков И.Л., Коничев А.С. Биохимические и молекулярно-генетические аспекты адаптации гидробионтов: монография. – М.: Изд-во МГОУ, 2013. – 122 с.
8. Иваченко Л.Е., Коничев А.С. Роль биологически активных веществ сои в адаптации к условиям выращивания: монография. – М.: ИИУ МГОУ, 2016. – 154 с.
9. Тильба В.А., Лаврентьева С.И., Бегун А.С., Якименко М.В., Иваченко Л.Е., Коничев А.С. Влияние солей тяжелых металлов на активность и множественные формы РНКаз проростков сои после инокуляции *Bradyrhizobium japonicum* и *Sinorhizobium fredii* // Доклады Россельхозакадемии. – № 3. – 2013. – С. 19-21.
10. Блехман Г.И. Причины изменения и особенности проявления рибонуклеазной активности при обезвоживании растений // Физиология растений. – 1979. – Т.26. – № 5. – С. 932-942.
11. Сангаев С.С., Трифонова Е.А., Титов С.Е., Романова А.В., Колодяжная Я.С., Сапоцкий М.В., Малиновский В.И., Кочетов А.В. Инактивация гена *Nkl* в растениях табака *Nicotiana tabacum* SRI за счет РНК-интерференции // Генетика. – 2010. – Т. 46. – № 1. – С. 131-134.
12. Петухов А.С., Петухова Г.А. Биохимические механизмы защиты при накоплении тяжелых металлов в организмах // Гигиена и санитария. – 2017. – № 2. – С.114-117.
13. Rassel W.E. The precipitation of polyribonucleotides with magnesium salte and etanol // *J. Biol. Chem.* – 1963. – V. 238. – № 9. – P. 3053-3057.
14. Малый практикум по физиологии растений: Учеб. пособие / Под ред. А.Т. Мокроносова. – М.: Изд-во МГУ, 1994. – 184 с.
15. Buege J.A., Aust S.D. Microsomal lipid peroxidation / *Methods in Enzymology* // Eds. By S. Fleischer, L. Packer. New York: Academic Press, 1978. – P. 302-310.
16. Плохинский Н.А. Биометрические методы / Под ред. Н.А. Плохинский. – М.: Изд-во МГУ, 1970. – 367 с.
17. Van Assche F., Clijsters H. Effects of metals on enzyme activity in plants // *Plant Cell Environment.* – 1990. – V. 13. – P. 195. – 206.
18. Холодова В.П., Абдеева А.Р., Волков К.С., Кузнецов В.С., Кузнецов Вл. В. Экспрессия генов аквапоринов при адаптации растений к хлоридному засолению и солям тяжелых металлов // Тезисы докладов, Международная конференция «Физиологические и молекулярно-генетические аспекты сохранения биоразнообразия». – Вологда, 2005. – С.175.
19. Kholodov V., Volkov K., Abdeyeva A., Kuznetsov V.] Water status in Mesembryanthemum crystallinum under heavy metal stress // *Environmental and Experimental Botany.* – 2011. – Т. 71. – № 3. – С. 382-389.
20. Рыспекова Н.Н., Нурмухамбетов А.Н., Балабекова М.К., Аканов А.А. Металлотионеины и их роль в адаптации к действию повреждающих факторов (обзор литературы) // Вестник КазНМУ. – 2014. – №1. – С. 298-303.
21. Скугорева С.Г. Роль металлсвязывающих белков и пептидов в детоксикации тяжелых металлов растениями // Вестник института биологии Коми научного центра уральского отделения РАН. – 2005. – № 8(94). – С. 28-30.
22. Vallee B.L., Falchuk K.H. Zinc and gene expression. // *Philos Trans R Soc B* 294, 1981. – P. 185-197.
23. Vallee B.L., Galdes A. The metallobiochemistry of Zn enzymes. // *AdvEnzymol.* – 1984. – 56. – P. 283-430.
24. Debi Ranjan Tripathy, AtanuSingha Roy, Swagata Dasgupta Complex formation of rutin and quercetin with copper alters the mode of inhibition of Ribonuclease A // *FEBS Letters.* – 2011. – 585. – P. 3270-3276.

Поступила в редакцию 26.02.19
После доработки 10.03.19
Принята к публикации 04.06.19