

Дніпропетровський національний університет
імені Олеся Гончара

¹Науково-дослідний інститут біології

²Кафедра фізіології та інтродукції рослин
пр. Гагаріна, 72, м. Дніпропетровськ, 49010

РЕАКЦІЯ ГЛУТАТІОНОВОЇ СИСТЕМИ *PHRAGMITES AUSTRALIS* L. ТА *ТУРНА ANGUSTIFOLIA* L. НА ЗАБРУДНЕННЯ ВОДОЙМИ

Рогіз, очерет, токсиканти, забруднення водойм, глутатіон-залежна система, адаптація.

Антропогенне забруднення водойм України внаслідок скидання неочищених стічних вод, сільськогосподарського поверхневого стоку, розсіювання шкідливих викидів через атмосферу призвело до загрози існуванню водної рослинності [1; 2; 3]. Вищі водні рослини різних таксономічних рангів проявляють стійкість до підвищеного вмісту у водоймах біогенних елементів, хлоридів, сульфідів, важких металів [1; 4; 5], що обумовлює важливу роль рослин у процесах самоочищення водойм та у системі очищення стічних вод [6]. У деяких видів водних рослин виявлено метаболічні системи детоксикації антропогенних забруднювачів, в яких головне значення мають ферменти, здатні до окислення фенолів, пестицидів тощо [4; 7; 8]. Проведені на культурних рослинах дослідження дозволили встановити, що біодеградація токсикантів у клітинах відбувається поетапно за участю багатьох ферментів: у першій фазі процесу за допомогою монооксигеназ активуються функціональні групи у молекулах ксенобіотиків, у другій отримані метаболіти піддаються кон'югації з ендogenous компонентами клітин, що зменшує їхню токсичність, а в третій фазі кон'югати переводяться у вакуолю або тонопласт [9]. У випадку кон'югації з глутатіоном уся глутатіон-залежна ферментна система відіграє ключову роль у запобіганні окисному стресу та формуванні резистентності рослин до впливу токсикантів.

У модельних експериментах виявлено активацію глутатіонового циклу у клітинах *Ceratophyllum demersum* L. у відповідь на вплив іонів кадмію [10; 11] та арсенату [12], у клітинах *Elodea Nuttallii* (Planch) H. St. John – на вплив іонів заліза [13], у клітинах мікроводоростей – за дії важких металів [4]. Участь захисної глутатіон-залежної системи в адаптації вищих водних рослин до впливу комплексу різних забруднювачів водойм у доступній науковій літературі майже не досліджено.

Метою роботи було виявлення особливостей функціонування метаболічного циклу глутатіону у вищих водних рослинах за умов антропогенного забруднення водойми, для чого визначали рівні активності глутатіон-трансферази, глутатіон-редуктази та вміст відновленого глутатіону в коренях і стеблах водних рослин.

Матеріал і методика досліджень

Очерет звичайний, або південний (*Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud), та рогіз вузьколистий (*Typha angustifolia* L.) належать до видів, які широко розповсюджені у малих річках Дніпропетровщини [1; 14]. Зразки рослинного матеріалу відбирали наприкінці сезону вегетації у річці Оріль (найменш забруднена водойма в регіоні, умовний контроль) та у річці Самара поблизу викидів хімічного комбінату (забруднена водойма).

Рослинний матеріал розтирали з натрій-фосфатним буфером (рН 8,0), центрифугували (20 хв., 16000 об/хв.), в отриманому екстракті на фотоелектроколориметрі

КФК-2МП визначали активність глутатіон-залежних ферментів. Активність глутатіон-S-трансферази (GST, ЕС 2.5.1.18) і глутатіон-редуктази (GR, ЕС 1.8.1.7) проводили згідно методик, модифікованих В.М. Гришко [15]. Для визначення активності GST субстратом служив 2,4-динітрохлорбензол (ДНХБ). Реакційну суміш (1 мл фосфатного буфера, 0,1 мл розчину відновленого глутатіона й 0,2 мл зразка) витримували 10 хвилин при 30° С. Реакцію ініціювали додаванням 0,1 мл розчину ДНХБ і протягом 4 хв. реєстрували зміни оптичної густини суміші при довжині хвилі 340 нм. Активність ферменту виражали в наномоль ДНХБ, перетвореного за 1 секунду (нанокатал).

Для визначення активності GR реакційну суміш, яка містила 1 мл фосфатного буфера, 0,1 мл розчину ЕДТА, 0,3 мл розчину окисленого глутатіону (GSSG) та 0,2 мл розчину NADPH, інкубували протягом 10 хв при 37° С. Реакцію починали додаванням 0,2 мл проби і реєстрували зменшення концентрації NADPH при довжині хвилі 340 нм. Активність ферменту виражали у нмоль NADPH, переробленого за 1 сек (нанокатал).

Вміст відновленого глутатіону (GSH) визначали згідно [16] у реакційній суміші, яка містила 2 мл трис-НCl буфера, рН 7,8, та 1 мл екстракту. При довжині хвилі 400 нм вимірювали оптичну густину суміші (A_0) проти контролю, до проб додавали 0,05 мл реактиву Елмана, інкубували протягом 1 години при 37° С, після чого знов вимірювали оптичну густину (A_1). Для розрахунків використовували різницю показників оптичної густини реакційної суміші ($A_1 - A_0 = A$) та калібрувальний графік, побудований для розчинів відновленого глутатіону з відомою концентрацією. Вміст GSH виражали в нмоль/г ваги зразка.

Дослідження проведені у 3-разовій повторності, результати оброблено за допомогою програми Microsoft Statistica 6.0 при 95% вірогідності.

Результати досліджень та їх обговорення

Одержані результати виявили видо- та тканино-специфічність функціонування глутатіонової системи у клітинах досліджених водних рослин. Так, у рослинах з чистої водойми активність глутатіон-S-трансферази для коренів була більшою в очерету, для стебел – у рогозу (рис. 1), при цьому в обох видів рослин активність ферменту у стеблах перевищувала показник для коренів: в очерету в 1,8, а в рогозу – в 4,8 рази.

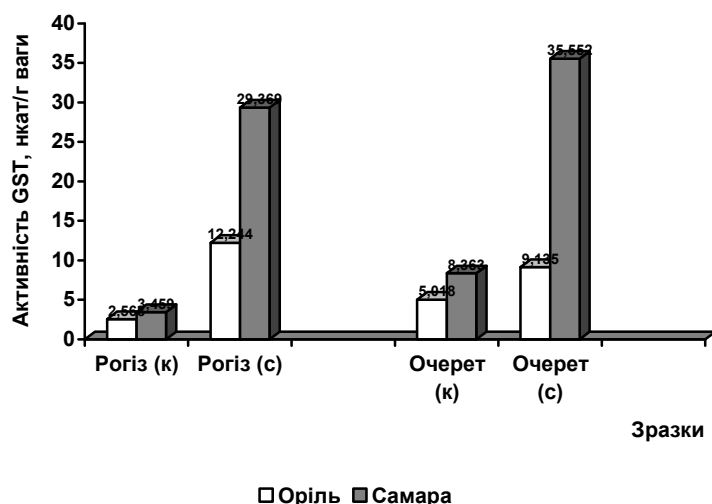


Рис. 1. Активність GST (нкатал/г ваги) у коренях (к) та стеблах (с) водних рослин у чистій (Оріль) та забрудненій (Самара) водоймах

Реакція водних рослин обох видів на вплив токсикантів у забрудненій водоймі відбилась у суттєвій активації GST як у клітинах коренів, так і стебел. У рослин із Самари активність ферменту становила для стебел рогозу 240,1 % до контрольного рівня, а для стебел очерету – 391,5 % до контролю. У коренях рослин збільшення глутатіон-S-трансферазної активності було менш значним і становило 134,7 та 166,7 % до контролю відповідно для рогозу та очерету. Для обох видів рослин із Самари встановлено ту саму закономірність, що й для чистої водойми: активність GST була значно вищою у стеблах, ніж у коренях, причому для рогозу рівень перевищений у 8,5 рази, тоді як для очерету – у 4,3 рази.

Літературні дані свідчать про високу здатність рослин *Ph. australis*, які вирощували за умов високих концентрацій іонів кадмію, до активації ферментів циклу глутатіону, у тому числі GST, що пов'язують із індукцією процесів детоксикації важкого металу [11]. Суттєве зростання активності глутатіон-S-трансферази у рослин *C. demersum*, які зазнали сумісного впливу іонів кадмію та цинку, також пояснюють активацією процесів знешкодження важких металів, у яких GST бере активну участь [10].

Виявлена нами висока активність GST у коренях та стеблах *Ph. australis* і *T. angustifolia* із забрудненої водойми свідчила, безсумнівно, про інтенсивне знешкодження комплексу тих токсикантів, які потрапляли у клітини рослин із середовища зростання. Ймовірно, процеси детоксикації більш інтенсивно відбувались у стеблах рослин, ніж у коренях.

Індуковане впливом токсикантів зростання глутатіон-S-трансферазної активності реалізувалось за наявності у клітинах рогозу й очерету достатнього фонду відновленого глутатіону. Для обох видів рослин загальною рисою виявився більш високий вміст відновленого глутатіону у клітинах стебел, ніж коренів: для рогозу майже вдвічі в обох водоймах, а для очерету на 19 та 17 % відповідно у чистій та забрудненій водоймі (таблиця). Специфічність досліджених видів рослин проявилась у переважному накопиченні пулу відновленого глутатіону у клітинах одного з органів. Так, у коренях очерету вміст GSH перевищував значення для коренів рогозу на 40 % в умовно чистій водоймі та на 29 % у забрудненій водоймі. У стеблах рослин виявлено протилежну залежність: вміст відновленого глутатіону у стеблах рогозу перебільшував показники для стебел очерету на 28 та 29 % відповідно у чистій та забрудненій водоймах.

Таблиця.

Вміст GSH (нмоль/г ваги) в органах рогозу та очерету

Зразки	Вміст GSH (нМ/г ваги), $M \pm m$	p	До контролю, %
<i>Оріль (умовно чиста водойма)</i>			
Корені рогозу	973,8±31,1	-	-
Стебла рогозу	2074,58±33,9	-	-
Корені очерету	1363,5±58,6	-	-
Стебла очерету	1623,5±31,3	-	-
<i>Самара (забруднена водойма)</i>			
Корені рогозу	1034,6±31,1	0,191	106,2
Стебла рогозу	2052,0±128,3	0,742	98,9
Корені очерету	1354,3±69,5	0,270	99,3
Стебла очерету	1587,3±104,2	0,160	97,8

Примітка. Розбіжності між вибірками достовірні при $p \leq 0,05$.

Дослідники [17; 18] вважають, що рівень GSH у тканинах рослин відбиває інтенсивність метаболічних процесів за його участю, тому одержані результати доцільно порівняти з даними літератури. Виявлений у наших дослідженнях вміст GSH у коренях *Ph. australis* і *T. angustifolia* близький до показника (600-800 нМоль/г тканини), встановленого для адаптованої до впливу токсикантів металоакумулюючої рослини *Erica andevalensis* Cabezudo and Rivera [19]. Крім того, одержані нами результати за рівнем співпали з показниками умісту GSH, установленими для коренів та листків рослин *Ph. australis*, які вирощували гідропонним методом на середовищі, забрудненому сполуками кадмію [11].

Збереження високого рівня відновленого глутатіону у рослинах рогозу й очерету на фоні значної активації GST свідчить про функціонування механізмів підтримання пулу GSH, зокрема, процесу відновлення окисленого глутатіону, який каталізується глутатіон-редуктазою. У досліджених рослинах із чистої водойми рівні активності ферменту у коренях відрізнялись несуттєво, тоді як у стеблах очерету активність GR перебільшувала показник для рогозу в 3,4 рази (рис. 2).

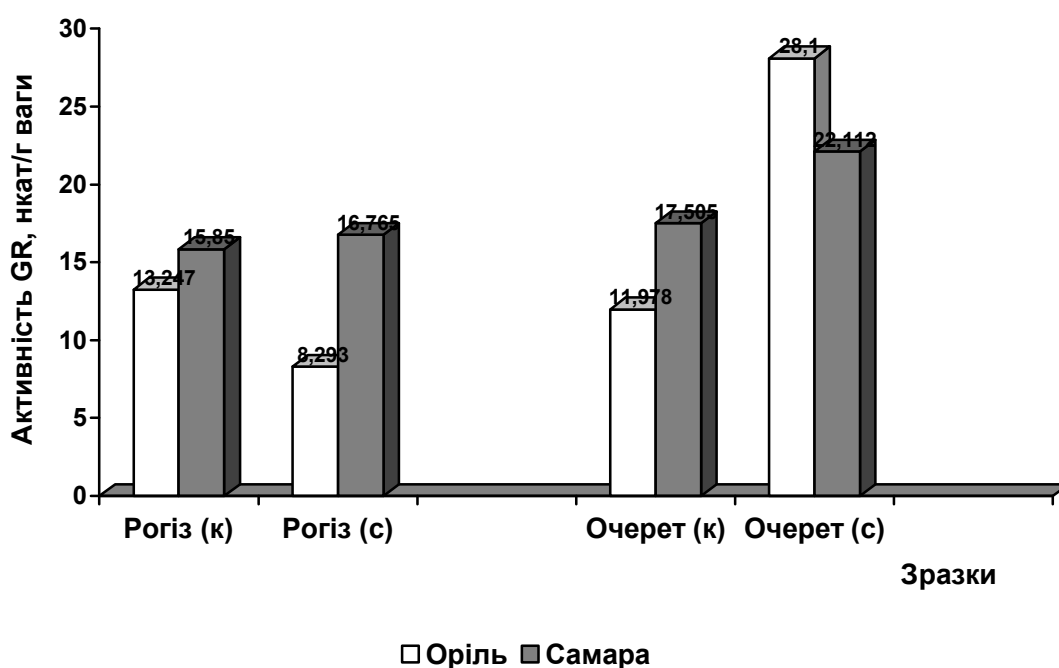


Рис. 2. Активність GR (нкатал/г ваги) у коренях (к) та стеблах (с) водних рослин у чистій (Оріль) та забрудненій (Самара) водоймах

За умов антропогенного забруднення водойми у рослин рогозу активність GR у коренях зростає порівняно з контролем на 19,6 %, у стеблах на 102 %. У рослин очерету виявлено різнобічні зміни активності ферменту у порівнянні з контролем: якщо у коренях активність глутатіон-редуктази зростає на 46 %, то у стеблах вона знижується на 21 %. Проте, слід зазначити, що при цьому рівень активності GR у стеблах очерету перевищує показник для стебел рогозу в 1,3 рази. Тобто, при відносному зниженні активності GR у стеблах очерету, рівень активності залишається достатньо високим для забезпечення реакцій відновлення окисленого глутатіону. Якщо врахувати наведені раніше дані про незначне зниження вмісту відновленого глутатіону у рослинах за умов забруднення (див. табл.), то вони підтверджують зроблене припущення.

Зростання глутатіон-редуктазної активності, а також індукцію синтезу нових молекулярних форм ферменту показано за токсичної дії іонів кадмію на рослини *S.*

demersum [10]. Участь ферменту у відновних процесах у коренях, стеблах та листках *Ph. australis* відмічено за дії сполук кадмію [11]. Виявлені нами закономірності змін активності GR вказували на посилення процесів відновлення глутатіону у коренях та стеблах рогозу й очерету за дії комплексу токсикантів.

Відомо, що за дії несприятливих чинників середовища глутатіон-залежна система рослин одночасно забезпечує відновлення клітинного гомеостазу та знешкодження токсичних молекул. Наприклад, вважається, що металотолерантність рослин *Ph. australis* асоційована з ефективністю функціонування метаболічного циклу глутатіону [11]. При вивченні механізмів адаптації до впливу іонів кадмію у зрощених гідропонним методом молодих рослин *Ph. australis* та *T. latifolia* виявлено більш значне накопичення тіолових сполук у рослин рогозу, тоді як для рослин очерету було характерним посилення активності глутатіон-редуктази [17].

Висновки

Отримані нами результати дозволяють дійти висновку, що за умов антропогенного забруднення водойми високі рівні накопичення відновленого глутатіону та суттєва активація глутатіон-залежних ферментів у коренях та стеблах рослин *Ph. australis* і *T. angustifolia* вказували на пристосувальну спрямованість метаболічних змін. Видова специфічність адаптивної стратегії полягала у тому, що рослинам рогозу властива порівняно більш значна активація процесів відновлення глутатіону та накопичення його пулу, тоді як рослинам очерету – посилення процесів знешкодження токсикантів. Вивчені особливості рогозу й очерету цілком узгоджуються з даними про ефективність використання вказаних видів у процесах самоочищення водойм [6] та обумовлюють доцільність подальших досліджень захисних метаболічних механізмів стійких до впливу токсикантів водних рослин.

ЛІТЕРАТУРА

1. Барановський Б. О. Фіторізноманіття ландшафтного заказника Богуславський (Павлоградський р-н Дніпропетровської обл.) / Б. О. Барановський // Вісник Дніпропетровського ун-ту. Сер. Біологія. Екологія. – 2006. – № 3. – С. 6-11.
2. Відновна гідроекологія порушених річкових та озерних систем (гідрохімія, гідроекологія, гідрологія, управління): [навч. посіб.] / [Гриб Й. В., Клименко М. О., Сондак В. В., Волкова Л. А.] – Рівне: ППФ “Волинські обереги”, 1999. – Т. 1. – 348 с.
3. Гриб И.В. Индикация санитарно-экологического состояния притоков р. Припяти по ценозам высших водных растений / И.В. Гриб, Ю.Р. Гроховская // Гидробиол. журнал. – 2001. – Т. 37, № 2. – С. 44-57.
4. Саванина Я.В. Значение глутатионовой системы в накоплении и детоксикации тяжелых металлов в клетках цианобактерий и микроводорослей / Я.В. Саванина, А.Ф. Лебедева, Е.Л. Барский // Вестник Московского университета. Серия Биология. – 2003. – № 3. – С. 29-35.
5. Shtemenko N. Investigation of surface lipids of water plants grown on contaminated water. Analytical methods to characterize the composition of surface lipids of helophytes exposed to VOC contaminant water / N. Shtemenko, M. Moeder, P. Kusch // Counteraction to Chemical and Biological Terrorism at National and Local Level in the East Europe Countries. NATO Science for Peace and Security Series – A: Chemistry and Biology. – 2009. – P. 101-108.
6. Крот Ю. Г. Использование высших водных растений в биотехнологиях очистки поверхностных и сточных вод / Ю.Г. Крот // Гидробиологический журнал. – 2006. – Т. 42, № 1. – С. 47-61.
7. Лукина Л. Ф. Физиология высших водных растений: [монографія] / Л.Ф. Лукина, Н.Н. Смирнова. – К.: Наукова думка, 1988. – 188 с.

8. Осінна О. І. Вплив нонілфенолу на склад жирних кислот і вуглеводнів поверхневих ліпідів водних рослин / О.І. Осінна, Н.І. Штеменко // Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Екологія. – 2009. – Вип. 17, т. 3. – С. 62-65.
9. Дурмишидзе С. В. Биотрасформация ксенобиотиков в растениях: [монографія] / С.В. Дурмишидзе, Т.В. Девдариани, Х.А. Кахнашвили. – Тбилиси: Мецниереба, 1988. – 287 с.
10. Aravind P. Modulation of cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* by zinc involves ascorbate-glutathione cycle and glutathione metabolism / P. Aravind, M. N. V. Prasad // *Plant Phys. and Biochem.* – 2005. – V. 43. Is. 2. – P. 107-116.
11. Iannelli M. A. Antioxidant response to cadmium in *Phragmites australis* plants / M.A. Iannelli, F. Petrelli, L. Fiore // *Plant Phys. and Biochem.* – 2002. – Vol. 40, Issue 11. – P. 977-982.
12. Mishra S. Thiol metabolism and antioxidant systems complement each other during arsenate detoxification in *Ceratophyllum demersum* L. / S. Mishra, S. Srivastava, R. D. Tripathi // *Aquatic Toxicology.* – 2008. – V. 86. Is. 2. – P. 205-215.
13. Wei X. Antioxidative responses of *Elodea Nuttallii* (Planch) H. St. John to short-term iron exposure / X. Wei, L. Dunbai, L. Guihua // *Plant Physiol. and Biochem.* – 2010. – V. 48. Is. 10-11. – P. 873-878.
14. Барановский Б. А. Влияние режима освещенности прибрежной зоны озера Княгиня на состав макрофитных биогидроценозов / Б. А. Барановский, И. А. Иванько // Вісник Дніпропетровського ун-ту. Серія Біологія. Екологія. – 2005. – № 3/2. – С. 3-7.
15. Гришко В. Н. Пероксидное окисление липидов и функционирование некоторых антиокислительных ферментных систем у кукурузы и овса при остром поражении фтористым водородом / В.Н. Гришко, Д.В. Сыщиков // Укр. биохим. журн. – 1999. – Т. 71, № 3. – С. 51-57.
16. Некрасова Г.Ф. Экологическая физиология растений: [руков. к лаб. занятиям] / Г.Ф. Некрасова, И.С. Киселева. - Уральский гос. ун-т им. А. М. Горького. – Екатеринбург, 2008. – 157 с.
17. Fediuc E. Physiological and biochemical aspects of cadmium toxicity and protective mechanisms induced in *Phragmites australis* and *Typha latifolia* / E. Fediuc, L. Erdei // *J. Plant Physiol.* – 2002. – Vol. 159, Is. 3. – P. 265-271.
18. Chen K.-M. Up-regulation of glutathione metabolism and changes in redox status involved in adaptation of reed (*Phragmites communis*) ecotypes to drought-prone and saline habitats / K.-M. Chen, H.-J. Gong, G.-C. Chen // *J. Plant Physiol.* – 2003. – Vol. 160. Is. 3. – P. 302-309.
19. Marquez-Garsia B. Antioxidants in *Erica andevalensis*: A comparative study between wild plants and cadmium-exposed plants under controlled conditions / B. Marquez-Garsia, N. Horemans, A. Cuypers // *Plant Physiology and Biochemistry.* – 2011. – Vol. 49, Is. 1. – P. 110-115.

Н.А. Хромых, Ю.В. Лихолат

РЕАКЦИЯ ГЛУТАТИОНОВОЙ СИСТЕМЫ *PHRAGMITES AUSTRALIS* L. И *TYPHA ANGUSTIFOLIA* L. НА ЗАГРЯЗНЕНИЕ ВОДОЕМА

В корнях и стеблях *Ph. australis* и *T. angustifolia* из антропогенно загрязненного водоема, в сравнении с растениями из чистого водоема, установлено возрастание активности глутатион-S-трансферазы в 2,4-3,9 раза, глутатион-редуктазы в 1,3-2,1 раза и накопление высокого содержания восстановленного глутатиона (1034-2052 нМоль/г сухого веса). Сделано заключение об адаптивной реакции глутатион-зависимой системы водных растений на действие комплекса токсикантов.

N.A. Khromykh, U.V. Lykholat

REACTION OF GLUTATHIONE-DEPENDENT SYSTEM OF *PHRAGMITES AUSTRALIS* L. AND *TYPHA ANGUSTIFOLIA* L. TO CONTAMINATED WATER

In roots and stalks of *Ph. australis* and *T. angustifoliae* from contaminated reservoir in comparison with plants from clear reservoir the 2,4-3,9-fold increasing of glutathione-S-transferase and 1,3-2,1-fold of glutathione-reductase activity and accumulation of 1034-2052 nMol/g d. w. of reduced glutathione were estimated. An adaptive reaction of water plants glutathione-dependent system to influence of toxicant's complex was concluded.

Надійшла 10.02.2012 р.

УДК 57.083.3:615.322:504.054(045)

К.А. Довгопола, К.Г. Гаркава

Національний авіаційний університет,
пр. Космонавта Комарова 1, м. Київ, 03058

ВПЛИВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА ІМУНОТРОПНІ ВЛАСТИВОСТІ *HYPERICUM PERFORATUM* L., *TARAXACUM OFFICINALE* W., *CICHORIUM INTYBUS* L.

Важкі метали, лікарська рослинна сировина, гранично допустимі концентрації

Незважаючи на бурхливий розвиток хімії та фармакології і створення нових, ефективніших синтетичних лікарських препаратів, лікарські рослини продовжують займати значне місце в арсеналі лікувальних засобів, адже вони рідше спричиняють до побічних ефектів та порушення в обмінних процесах організму.

Великого значення надається пошукам лікарських рослин як нових джерел біологічно активних речовин для отримання фітопрепаратів.

Проводячи збір лікарських рослин, необхідно враховувати не лише строки їх збирання, але й екологічний стан території, адже кількісно-якісний склад діючих речовин у рослинах залежить від умов, у яких вони розвиваються, передусім від ґрунту, ґрунтових вод, та ступення антропогенного впливу на біосферу, що часто призводить до деградації середовища життя людини.

В усіх компонентах біосфери інтенсивно накопичуються викинуті шкідливі речовини (рідкі і розсіяні хімічні елементи, їх сполуки) у кількостях, що значно перевищують їх природній вміст. Вагомим джерелом забруднення є важкі метали. Вони мають здатність до накопичення у значних кількостях у ґрунтах, що може призвести до погіршення їх якості та зменшення продуктивності. Ця проблема відображена в Національній доповіді "Про стан навколишнього природного середовища в Україні 1996 року" [1].