

УДК 546.74:546.48:633.15

Тетяна Андріївна Артющенко, Віталій Миколайович Гришко
**СУМІСНИЙ ВПЛИВ КАДМІЮ ТА НІКЕЛЮ
НА ФУНКЦІОНУВАННЯ АСКОРБАТЗАЛЕЖНОЇ ЛАНКИ
АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ ГОРОХУ**

*Криворізький ботанічний сад Національної академії наук України
вул. Маршака, 50, м. Кривий Ріг, 50089, Україна
e-mail: t-a-art@yandex.ru*

Досліджена динаміка змін вмісту різних форм аскорбінової кислоти та активності аскорбатпероксидази у вегетативних органах гороху, як компонентів системи антиоксидантного захисту за сумісної дії кадмію та нікелю. Встановлено, що на ранніх етапах онтогенезу важкі метали індукують зростання вмісту як аскорбінової кислоти, так і її окислених форм в коренях протягом перших 7 годин. Після 12-годинного стресу кількість аскорбату знижувалась, в той час як дегідроаскорбінової і 2,3-дікетогулонової кислот продовжувала збільшуватись. Порушення про-/антиоксидантної рівноваги також супроводжувалось підвищенням активності аскорбатпероксидази. На початку стресової дії, зумовленої сполуками кадмію і нікелю в листках не відбувалось змін активності аскорбатпероксидази, хоча 7-годинний вплив призводив до статистично достовірного підвищення активності зазначеної оксидоредуктази. За дії важких металів у низькій концентрації вміст аскорбінової кислоти в листках гороху зростав на 14%. За високого вмісту у середовищі хоча б одного з металів вже з 7 години відбувається вичерпання антиоксидантних ресурсів, про що свідчить зменшення кількості аскорбінової кислоти в асиміляційних органах. На 24 годину експерименту спостерігалось уповільнення темпів зростання активності аскорбатпероксидази, яке може бути пов'язане з недостатньою кількістю субстрату.

Ключові слова: Pisum sativum L., кадмій, нікель, аскорбінова кислота, аскорбатпероксидаза

Татьяна Андреевна Артющенко, Виталий Николаевич Гришко
**СОВМЕСТНОЕ ВЛИЯНИЕ КАДМИЯ И НИКЕЛЯ
НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ АСКОРБАТЗАВИСИМОГО ЗВЕНА
АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ ГОРОХА**

*Криворожский ботанический сад Национальной академии наук Украины
ул. Маршака, 50, г. Кривой Рог, 50089, Украина
e-mail: t-a-art@yandex.ru*

Исследована динамика изменения содержания различных форм аскорбиновой кислоты и активности аскорбатпероксидазы в вегетативных органах гороха, как компонентов системы антиоксидантной защиты при совместном действия кадмия и никеля. Установлено, что на ранних этапах онтогенеза тяжелые металлы индуцируют повышение содержания как аскорбиновой кислоты, так и ее окисленных форм в корнях



гороха в течение первых 7 часов. После 12 - часового стресса количество аскорбата снижалось, тогда как дегидроаскорбиновой и 2,3 - дикетогулоновой кислот продолжало увеличиваться. Нарушение про-/антиоксидантного равновесия также сопровождалось повышением активности аскорбатпероксидазы. В начале стрессового воздействия, обусловленного соединениями кадмия и никеля в листьях не происходило изменений активности аскорбатпероксидазы, хотя 7-часовое влияние приводило к статистически достоверному повышению активности указанной оксидоредуктазы. При действии тяжелых металлов в низкой концентрации содержание аскорбиновой кислоты в листьях гороха повышалось на 14%. При высокой концентрации в среде хотя бы одного из металлов уже с 7-го часа происходило исчерпание антиоксидантных ресурсов, о чем свидетельствует уменьшение количества аскорбиновой кислоты в ассимиляционных органах. На 24 час эксперимента наблюдалось замедление темпов повышения активности аскорбатпероксидазы, которое может быть связано с недостатком субстрата.

Ключевые слова: *Pisum sativum L.*, кадмий, никель, аскорбиновая кислота, аскорбатпероксидаза

Tetiana A. Artiushenko, Vitalii M. Gryshko

**CADMIUM AND NICKEL COMBINED EFFECT ON ASCORBATE-DEPENDENT
MECHANISM OF ANTIOXIDATIVE DEFENSE SYSTEM OF PEA**

Kryvyi Rig Botanic Garden of the National Academy of Sciences of Ukraine

50 Marshak St., Kryvyi Rig, 50089, Ukraine

e-mail: t-a-art@yandex.ru

The dynamics of changes in the content of different forms of ascorbic acid and ascorbate peroxidase activity in pea vegetative organs as components of antioxidant protection for the cadmium and nickel combined effect is investigated. It was established, that in assimilation tissues of pea the seedlings amount of ascorbic acid reduced form was more higher compared to the roots by 9 times. Using of toxicants in high concentration in the first hour of exposure, probably resulted a significant activation of the ascorbic acid synthesis in pea roots, as indicated by the increase in its quantity by 44%. In the early stages of ontogeny with increasing duration of cadmium and nickel compounds stress action to 7 hours in pea roots showed a trend towards increase in ascorbic acid at 23-68% in all the variants of the experiments. The aforementioned was accompanied by significant increase of the level of dehydroascorbate acid and product of ascorbate irreversible oxidation – 2,3-diketogulonic acid.

By contrast in the leaves under the toxicants influence at low concentrations is not the case of ascorbate amount changes. However we registered the increasing of dehydroascorbate acid amount by almost 20% compared to control, which may indicate the induction of the antioxidant synthesis. In other cases, there was a tendency to decrease in the ascorbic acid content. The study content of ascorbic acid various metabolites in the pea roots to 12 hours stressful action of cadmium and nickel compounds showed violations in pro-/antioxidant balance. This was confirmed by a decrease content of reduced ascorbate regards control level.

After a 12-hour of stress the ascorbate amount decreased, whereas dehydroascorbate and 2,3-diketogulonic acids continued to increase. Existing experimental data allows conclude that the 12 hour exposure of pea plants in a medium with a low concentration of the cadmium and nickel compounds the ascorbic acid content in the leaves increased towards control level, i.e. there is a significant induction of the synthesis process. In addition, the amount of ascorbate oxidized forms, as in previous research period, continued to increase. After 24 hours of experiment we registered similar to 12 hours trend of changes in the content of ascorbic acid metabolites.

Violation of pro-/antioxidant balance also accompanied by increased ascorbate peroxidase activity. In the pea root system there is the tendency to increase the ascorbate peroxidase activity and this is in concordance with the increasing content of ascorbic and dehydroascorbate acids. At the beginning of stressful activities caused by cadmium and nickel compounds in the leaves is not the case of ascorbate peroxidase activity changes, although 7-hour influence resulted in a statistically significant increase in activity specified oxidoreductase. By the action of heavy metals in low concentrations the content of ascorbic acid in pea leaves increased by 14%. High content in the medium of at least one of the metals since 7-hour exposure caused the depletion of antioxidant resources, as evidenced by the decrease of ascorbic acid in the assimilation organs. After 24 hours of experiment we observed a slowdown in ascorbate peroxidase activity, which could be explained by the lack of ascorbic acid under prolonged stress exposure.

Keywords: Pisum sativum L., cadmium, nickel, ascorbic acid, ascorbate peroxidase.

Фундаментальна роль в адаптації рослин до дії несприятливих факторів, в тому числі важких металів, належить антиоксидантним системам, які активуються за стресових умов (Gill, Tuteja, 2010; Smirnoff, 2012). У зв'язку з цим важливого значення набуває з'ясування особливостей метаболізму низькомолекулярних антиоксидантів (найбільш широко представленою з яких в клітині є аскорбінова кислота), що приймають активну участь в біохімічних процесах захисту рослинної клітини при стресовому впливі різноманітних абіотичних чинників (Сищиков, Гришко, 2003; Сищиков, Гришко, 2006; Foyer, Noctor, 2009).

У рослинній клітині функціонують низькомолекулярні антиоксиданти та антиоксидантні ферменти, які перешкоджають надмірному накопиченню активних форм кисню. Провідну роль в елімінації кисневих радикалів та перериванні вільнорадикальних реакцій відіграє аскорбінова кислота, вміст якої характеризує резервні властивості антиоксидантної системи (Matamoros et al., 2006).

Співвідношення між окисленими та відновленими формами антиоксиданту відіграє ключову роль у відповіді на оксидативний стрес і певною мірою свідчить про ефективність функціонування антиоксидантних систем. Ендогенний рівень аскорбінової кислоти в тканинах визначається як за рахунок біосинтезу de novo так і шляхом відновлення її окислених форм. Пул аскорбату в рослинних клітинах може вичерпуватись при його окисленні з



утворенням дегідроаскорбінової та 2,3-дікетогулонової кислоти. Однак відомості щодо зміни функціонування аскорбатзалежної антиоксидантної системи, спрямованої на послаблення дії оксидативного стресу, у рослин досить обмежені і неоднозначні. Підвищення рівня дегідроаскорбінової та 2,3-дікетогулонової кислот, що супроводжувалось зменшенням вмісту відновленого аскорбату в коренях та асиміляційних органах соняшника при експозиції рослин за високих концентрацій ацетату свинцю, відмічається в роботах І.М.Микієвич (2003). Дослідженнями Liu et al. (2007) також продемонстровано підвищення рівня аскорбату за дії іонів кадмію у *Bechmeria nivea*. Таким чином, зважаючи на вищевикладене, основною метою даної роботи було встановити роль аскорбінової кислоти у адаптації гороху посівного до стресу, зумовленого спільною дією кадмію і нікелю.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Насіння гороху посівного (*Pisum sativum* L.) сорту Харківський янтарний пророщували протягом 3 діб на зволоженому дистильованою водою фільтрувальному папері. Далі проростки переносили у вегетаційні пластикові посудини з дистильованою водою. Модельні досліди проводили за схемою повного двофакторного експерименту з двома рівнями факторів (Єгоршин, Лісовий, 2005). У дослідах використовували розчини CdSO_4 і NiSO_4 в концентраціях 3 і 30 мг $\text{Cd}^{2+}/\text{л}$ та 4 і 40 мг $\text{Ni}^{2+}/\text{л}$. Через 10 діб середовище вирощування замінювали зазначеними вище розчинами важких металів. Рослини вирощували за природного рівня освітленості. Визначення концентрації аскорбінової кислоти та активності аскорбатпероксидази проводили у 14-добових проростків. Рослинний матеріал відбирали через 1, 7, 12 та 24 години після внесення важких металів. Активність аскорбатпероксидази визначали за Nakano Y. і Asada K. (1981), концентрацію білка – за Greenberg Ch.S. (1982). Визначення аскорбінової, дегідроаскорбінової та дікетогулонової кислот проводили за методом, який ґрунтується на взаємодії 2,4-динітрофенілгідразину з дегідроаскорбіновою та 2,3-дікетогулоновою кислотами з утворенням у 42,5% розчині H_2SO_4 відповідних озонів, які дають червоне забарвлення (Специальный..., 1981). Кількість аскорбінової, дегідроаскорбінової та 2,3-дікетогулонової кислот розраховували за різницею поглинання при 520 нм. Для побудови калібрувальної кривої використовували стандартні розчини відновленої аскорбінової кислоти.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У фізіологічній адаптації рослинного організму до сумісної дії важких металів поряд з такими антиоксидантами як глутатіон та токофероли активну участь приймає аскорбінова кислота. В тканинах асиміляційних органів проростків гороху кількість відновленої форми аскорбінової кислоти була у 9 разів вищою порівняно з коренями (табл.1), оскільки її синтез тісно пов'язаний

з вуглецевим обміном, зокрема такими продуктами фотосинтезу, як глюкоза та галактоза (Matamoros et al., 2006; Foyer, Noctor, 2009; Smirnoff, 2012).

Таблиця 1. Вміст різних форм аскорбінової кислоти у вегетативних органах гороху за сумісної дії іонів кадмію та нікелю (мкг/г сирової речовини)

Варіант досліджу	Корінь			Листок		
	Аскорбінов а кислота	Дегідро-аскорбінов а кислота	2,3-дікетогулонова кислота	Аскорбінов а кислота	Дегідро-аскорбінов а кислота	2,3-дікетогулонова кислота
1 година						
Контроль	17,9±0,28	112,0±2,61	10,3±0,13	161,3±4,76	154,4±5,90	87,9±1,46
3 мг Cd ²⁺ /л+4 мг Ni ²⁺ /л	16,6±0,55	119,8±0,94*	11,7±0,18*	164,0±7,43	151,5±2,55	87,6±1,29
3 мг Cd ²⁺ /л+40 мг Ni ²⁺ /л	23,8±0,91*	130,0±4,80*	12,1±0,43*	161,4±4,00	144,3±5,17	83,7±3,32
30 мг Cd ²⁺ /л+4 мг Ni ²⁺ /л	22,3±0,14*	144,0±2,19*	15,2±0,62*	155,5±0,22	151,0±5,66	93,3±5,56*
30 мг Cd ²⁺ /л+40 мг Ni ²⁺ /л	25,8±1,50*	156,6±2,00	23,0±0,68*	160,9±8,75	152,6±0,71	85,7±1,93
7 годин						
Контроль	17,9±0,28	112,0±2,61	10,3±0,13	161,3±4,76	154,4±5,90	87,9±1,46
3 мг Cd ²⁺ /л+4 мг Ni ²⁺ /л	22,1±0,99*	129,0±4,53*	15,6±0,31*	148,7±12,61	184,4±7,27*	92,3±2,00
3 мг Cd ²⁺ /л+40 мг Ni ²⁺ /л	24,7±0,90*	137,7±2,54*	17,4±0,28*	102,1±3,02*	181,2±4,70*	86,2±1,70
30 мг Cd ²⁺ /л+4 мг Ni ²⁺ /л	26,6±0,42*	174,3±6,4*	27,2±0,87*	98,8±4,27*	193,1±7,32*	108,2±5,80*
30 мг Cd ²⁺ /л+40 мг Ni ²⁺ /л	30,0±1,57*	191,6±0,33*	39,6±0,61*	93,8±5,26*	228,3±10,14*	106,4±2,52*
12 годин						
Контроль	17,9±0,28	112,0±2,61	10,3±0,13	161,3±4,76	154,4±5,90	87,9±1,46



3 мг Cd ²⁺ /л+4 мг Ni ²⁺ /л	17,8±0,58*	143,4±1,65*	24,7±0,88 *	168,2±1,57	203,0±1,93*	125,1±1,47 *
3 мг Cd ²⁺ /л+40 мг Ni ²⁺ /л	19,9±0,95*	139,7±3,33*	36,4±0,91 *	97,9±2,61*	207,4±8,14*	130,4±7,25 *
30 мг Cd ²⁺ /л+4 мг Ni ²⁺ /л	19,6±0,40*	175,2±1,05	41,1±1,06 *	76,8±1,60*	214,9±3,33*	163,5±5,08 *
30 мгCd ²⁺ /л+4 0 мгNi ²⁺ /л	17,3±0,65*	206,9±10,9*	43,8±0,70 *	71,8±2,73*	281,7±8,63*	185,4±5,87 *
24 години						
Контроль	17,9±0,28	112,0±2,61	10,3±0,13	161,3±4,76	154,4±5,90	87,9±1,46
3 мг Cd ²⁺ /л+4 мг Ni ²⁺ /л	15,3±1,22*	153,6±2,23*	32,5±0,30 *	185,6±5,48 *	197,3±5,94*	224,9±3,11 *
3 мг Cd ²⁺ /л+40 мг Ni ²⁺ /л	12,7±0,77*	149,0±2,64*	35,7±0,05 *	63,4±2,88*	230,9±12,10 *	216,3±4,17 *
30 мг Cd ²⁺ /л+4 мг Ni ²⁺ /л	12,7±0,85*	165,9±3,89	39,6±0,61 *	56,4±2,84*	240,6±8,83*	262,8±2,86 *
30 мгCd ²⁺ /л+4 0 мгNi ²⁺ /л	13,4±0,52*	200,2±2,54*	56,1±1,74 *	56,2±0,84*	306,9±13,46 *	321,3±7,00 *

Примітка.* - статистично достовірна відмінність від контролю при $p < 0,05$.

Як видно з даних, представлених у таблиці на початковому етапі стресової дії за низького вмісту обох металів у середовищі вирощування концентрація аскорбінової кислоти в коренях гороху статистично достовірно не змінювалась відносно контролю. Разом з цим рівень окислених форм зазначеного антиоксиданту збільшувався. Для кореневої системи проростків гороху, які зазнавали одногодинного спільного впливу металів з високим вмістом хоча б одного з них, відмічено підвищення рівня аскорбінової кислоти. Кількість антиоксиданту на 34 та 24% при переважанні нікелю та кадмію відповідно перевищувала таку у контрольних рослин. Поряд з цим необхідно відмітити, що за сумісної дії токсикантів при переважанні іонів кадмію спостерігалось більш інтенсивне використання аскорбату, ніж при переважанні нікелю на фоні низького вмісту іонів кадмію. Вищезазначене підтверджується зростанням окислених форм аскорбінової кислоти за високого вмісту сполук кадмію. Так, у

вищезазначеному варіанті концентрація дегідроаскорбату і 2,3-дікетогулонової кислоти були на 28 та 47% вище за контрольні значення, тоді як за високого вмісту іонів нікелю на фоні низького кадмію – перевищення складало лише 16-17%.

Використання токсикантів у високій концентрації в першу годину експозиції, скоріш за все, зумовлювало істотну активацію синтезу аскорбінової кислоти в коренях гороху, на що вказує зростання її кількості на 44%. На користь цього припущення свідчить також і збільшення вмісту окислених форм – дегідроаскорбату майже на 40%, а 2,3-дікетогулонової кислоти більш, ніж вдвічі відносно контрольного рівня. Отримані дані добре узгоджуються з результатами Huang G.Y. et al (2010), які відмічали підвищення рівня аскорбату в коренях *Kandelia candel* та *Bruguiera gymnorhiza* за дії 0,1-1,5 мг л⁻¹ Cd²⁺.

Зі збільшенням тривалості стресової дії сполук кадмію та нікелю до 7 годин в коренях гороху спостерігалась тенденція до зростання кількості аскорбінової кислоти на 23-68% у всіх варіантах дослідів (табл. 1). Сумісна дія токсикантів за низької концентрації іонів кадмію призводила до збільшення вмісту дегідроаскорбінової кислоти на 15-22%, тоді як за комплексного впливу металів у варіанті 30 мг Cd²⁺/л+4 мг Ni²⁺/л та за високого рівня іонів обох токсикантів – на 55 та 70% відносно контролю. Вищезазначене супроводжувалось досить суттєвим зростанням рівня продукту незворотного окислення аскорбату – 2,3-дікетогулонової кислоти. Так, її вміст у варіантах з використанням металів, коли хоча б один з елементів був у низькій концентрації перевищував контрольний в 1,5-2,7 рази, а за дії 30 мг Cd²⁺/л+40 мг Ni²⁺/л – в 4 рази. Цей факт може бути пов'язаний із запуском процесів синтезу антиоксиданту та посиленням використання останнього в реакціях знешкодження вільних радикалів, що утворюються за комплексного впливу іонів металів.

Дослідження вмісту різних метаболітів аскорбінової кислоти в коренях гороху на 12 годину стресової дії сполук кадмію і нікелю засвідчило порушення про-/антиоксидантної рівноваги. Встановлений факт підтверджується зниженням вмісту відновленого аскорбату до контрольного рівня, окрім випадків з використанням високої концентрації одного металу на фоні низької іншого, коли це зниження було статистично недостовірним. Разом з цим за низького рівня обох металів кількість дегідроаскорбінової кислоти продовжувала зростати на 10% порівняно з 7-годинною експозицією, а 2,3-дікетогулонової кислоти – більш ніж на 30% (табл. 1). В решті випадків відмічена стабілізація вмісту дегідроаскорбату на рівні 7 годин експерименту. Втім кількість 2,3-дікетогулонової кислоти збільшувалась суттєвіше. Зокрема, у випадках з використанням токсикантів з низькою концентрацією одного металу на фоні високої іншого рівень кінцевого продукту окислення аскорбату вдвічі перевищував такий після 7 годин експозиції, тоді як за дії 30 мг Cd²⁺/л+40 мг Ni²⁺/л – лише на 10%. Таке уповільнення темпів зростання концентрації



окислених форм аскорбінової кислоти, ймовірно, відбувалося за рахунок деградації 2,3-дікетогулонової кислоти за тривалого стресового впливу іонів кадмію і нікелю, особливо за високого рівня останніх.

На 24-ту годину сумісної дії токсикантів була встановлена аналогічна тенденція до зниження вмісту аскорбінової кислоти в коренях гороху. Такза низького рівня кадмію та нікелю в середовищі, кількість аскорбату була на 15% нижчою за контрольну. Кількість 2,3-дікетогулонової кислоти в цьому випадку зростала на 30% порівняно з 12-ою годиною стресового впливу, що більш ніж втричі перевищує контроль (табл. 1). Аналіз даних, отриманих у варіантах дослідів з використанням сполук кадмію та нікелю за низької концентрації останнього, показав статистично достовірне підвищення вмісту дегідроаскорбінової кислоти в коренях гороху лише на 6-7% порівняно з попереднім дослідним періодом.

Поряд з цим більш істотне накопичення іонів кадмію та нікелю призводило до суттєвішого зниження концентрації антиоксиданту – за дії металів з високим рівнем хоча б одного з них вміст аскорбату зменшувався вже на 25-30% відносно контролю. Встановлений факт вказує на вичерпання антиоксидантного ресурсу в коренях гороху, оскільки вміст дегідроаскорбінової кислоти за дії 30 мг $Cd^{2+}/л+4$ мг $Ni^{2+}/л$ дещо знижувався (на 6%), а 2,3-дікетогулонової – не змінювався порівняно з попереднім дослідним періодом. Встановлене, скоріш за все, вказує не лише на інтенсивне використання антиоксиданту, а й на його вичерпання за рахунок деградації кінцевого продукту окислення. В даному випадку нестача аскорбінової кислоти, ймовірно, компенсується інтенсифікацією виключення іонів металів з активного клітинного метаболізму, зокрема за рахунок їх взаємодії з фітохелатинами, внаслідок чого, скоріш за все, вирішального значення у фізіологічній адаптації рослинного організму набуває глутатіонзалежна ланка антиоксидантного захисту (Гришко, Сыщиков, 2012).

Представлені в табл. 1 дані свідчать, що на 24-ту годину комплексного впливу сполук кадмію і нікелю у високих концентрації вміст дегідроаскорбату в коренях гороху не змінювався порівняно з попереднім терміном експозиції, в той час як 2,3-дікетогулонової кислоти – зростав на 30%.

Зі збільшенням тривалості стресової дії сполук важких металів до 7 годин, в листках гороху спостерігалась тенденція до зниження вмісту аскорбінової кислоти. Поряд з цим простежувалась чітка залежність кількості даного антиоксиданту від накопичення іонів кадмію та нікелю. Під впливом токсикантів у низькій концентрації не було встановлено збільшення рівня аскорбату. Втім кількість дегідроаскорбату зростала майже на 20% відносно контролю, що може вказувати на індукцію процесів синтезу даного антиоксиданту.

При 7-годинній експозиції рослин на середовищі із низьким вмістом сполук одного з металів на фоні високого іншого концентрація аскорбінової кислоти зменшувалась на 37-39%, і відповідно зростав рівень її окислених форм. Зокрема вміст дегідроаскорбату збільшувався на 17-25%, тоді як 2,3-дікетогулонової кислоти при переважанні нікелю не змінювався, а у варіанті 30 мг $Cd^{2+}/л$ +4 мг $Ni^{2+}/л$ – зростав на 23% (табл.). Встановлений факт підтверджує більшу токсичність кадмію, оскільки при переважанні нікелю не відбувається нагромадження продукту незворотного окислення антиоксиданту, а дегідроаскорбінова кислота, ймовірно, відновлюється до аскорбінової. Під впливом сполук кадмію та нікелю у високій концентрації кількість аскорбінової кислоти в листках знижувалась вже більш, ніж на 40% відносно контрольного рівня, що супроводжувалось істотним збільшенням дегідроаскорбінової і 2,3-дікетогулонової кислот (на 47 та 21% відповідно). Аналогічне зниження концентрації аскорбінової кислоти за поодинокі дії іонів кадмію відмічене в листках *Pisum sativum* (Romero-Puertas et al., 2007) та *Brassica campestris* (Anjum et al., 2008).

Наявні експериментальні дані дозволяють констатувати, що на 12-ту годину експозиції рослин гороху на середовищі з низькою концентрацією сполук кадмію і нікелю вміст аскорбінової кислоти в листках збільшувався до контрольного рівня, тобто відбувається істотна індукція процесів її синтезу. Поряд з цим кількість окислених форм аскорбату, як і в попередній дослідний період, продовжувала зростати. Так, рівень дегідроаскорбату та 2,3-дікетогулонової кислоти збільшився на 10 та 35% порівняно з 7-годинною експозицією і перевищував контроль на 30 і 42% відповідно (табл. 1). Отримані нами дані узгоджуються з результатами досліджень Сищикова Д.В. та Гришка В.М. (2003, 2006), якими встановлено, що за дії сполук кадмію в концентрації 10^{-6} М відбувається зниження вмісту відновленої форми глутатіону в органах проростків гороху, тоді як у рослин, вирощених на середовищі із 10^{-5} М $Cd^{2+}/л$ – рівень трипептиду статистично достовірно не відрізнявся від контрольного. Встановлений факт автори пов'язують з більш пізнім запуском процесів синтезу антиоксиданту низькими концентраціями кадмію. При обговоренні отриманих результатів також необхідно враховувати, що низький рівень відновленого глутатіону активує інші компоненти антиоксидантної системи рослин (Foyer, Noctor, 2009), що і може пояснювати передбачувану вище інтенсифікацію синтезу аскорбінової кислоти в листках гороху за низької концентрації токсикантів.

За високого вмісту в середовищі хоча б одного з токсикантів, в листках гороху відмічена тенденція до суттєвого зниження вмісту відновленої форми антиоксиданту. Зокрема, при переважанні іонів нікелю кількість аскорбату збільшувалась на 40% відносно контрольних рослин, в той час як в решті варіантів – більш ніж вдвічі. Поряд з цим, вміст окиснених форм



антиоксиданту також продовжував зростати (табл. 1). Так, при переважанні сполук одного з металів у середовищі вирощування, кількість дегідроаскорбінової кислоти в середньому на 30% перевищувала контроль, тоді як 2,3-дікетогулонової – на 48-86%, а за високої концентрації сполук кадмію і нікелю – на 80% для першої та більш ніж вдвічі для останньої.

На 24-ту годину експерименту встановлена аналогічна до 12-ої години тенденція зміни вмісту метаболітів аскорбінової кислоти. Так, за низької концентрації сполук кадмію та нікелю кількість аскорбату в листках гороху збільшувалась на 10%, а дегідроаскорбату - не змінювалась відносно попереднього дослідного періоду (табл. 1). Натомість вміст кінцевого продукту окислення антиоксиданту збільшувався в 1,7 рази, що в 2,5 рази перевищує такий у інтактних рослин. У всіх інших варіантах концентрація аскорбату продовжувала знижуватись. Найнижчий його вміст відмічений за дії високої концентрації токсикантів – лише 56,2 мкг/г сирової речовини, що майже втричі нижче за контроль. Поряд з цим, рівень дегідроаскорбату статистично достовірно зростав (на 11%) лише за дії 30 мг $Cd^{2+}/л+4$ мг $Ni^{2+}/л$. Комплексний вплив сполук важких металів призводив до збільшення вмісту 2,3-дікетогулонової кислоти в листках у всіх варіантах вегетаційних дослідів. Наприклад, при використанні нікелю і кадмію за низької концентрації останнього її кількість збільшувалась в 2,5 рази, тоді як за високої – в 3-3,7 рази відносно контролю.

Низькомолекулярні антиоксиданти в системі антиоксидантного захисту діють не автономно, а функціонують, кооперуючи один з одним, в складі ферментативних редокс-циклів. Зокрема аскорбінова кислота може виступати в якості редокс-кофактора ферментативних окисно-відновних циклів, наприклад, у аскорбат-глутатіоновому циклі. В хлоропластах та цитозолі вищих рослин для переривання каскадів неконтрольованого окислення відбувається завдяки аскорбатпероксидазі (КФ 1.11.1.11), яка належить до гемпероксидаз і каталізує нейтралізацію пероксиду водню.

Наявні дані свідчать, що в кореневій системі гороху рівень активності аскорбатпероксидази також залежить від концентрації іонів кадмію і нікелю в тканинах (рис. 1). Так, на початковому етапі сумісної дії сполук кадмію і нікелю у низькій концентрації, активність аскорбатпероксидази в коренях перевищувала контрольну на 18%. Поряд з цим, під впливом більшого рівня токсикантів активність ферменту відрізнялась від контролю в 2-2,2 рази.

У кореневій системі гороху із збільшенням тривалості стресового впливу до 7 годин відмічена тенденція до подальшого підвищення активності аскорбатпероксидази, що добре узгоджується зі зростанням вмісту як аскорбінової, так і дегідроаскорбінової кислот в коренях.

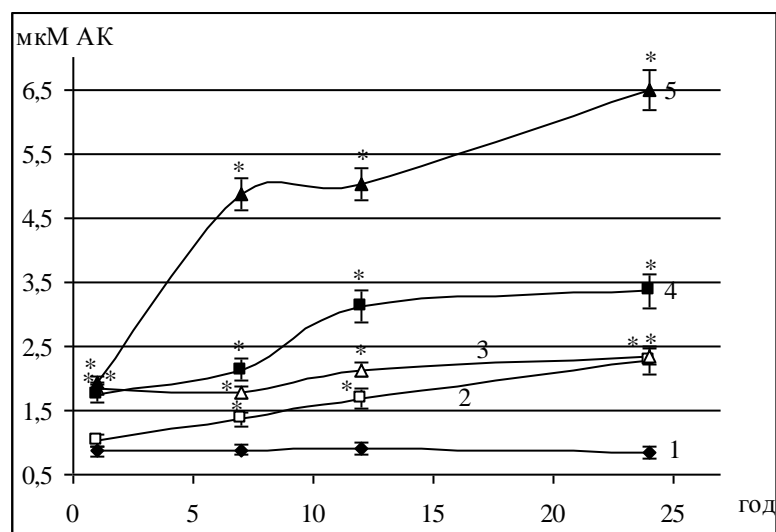


Рис. 1. Активність аскорбатпероксидази в коренях гороху за сумісної дії іонів кадмію та нікелю (мкмоль аскорбінової кислоти/мг білка за хв). Тут і на рис. 2: 1 — контроль, 2 – 3 мг Cd²⁺/л+4 мг Ni²⁺/л; 3 – 3 мг Cd²⁺/л+40 мг Ni²⁺/л; 4 – 30 мг Cd²⁺/л+4 мг Ni²⁺/л; 5 – 30 мг Cd²⁺/л+40 мг Ni²⁺/л; * – різниця статистично достовірна відносно контролю, $p < 0,05$.

Необхідно відмітити, що за дії сполук важких металів при переважанні нікелю активність ферменту не змінювалась відносно попереднього дослідного періоду. Найбільш суттєво вона збільшувалась за комплексного впливу сполук кадмію і нікелю у високих концентраціях – в 2,5 рази порівняно з першою годиною стресової дії. В решті випадків оксидоредуктаза функціонувала на 20-34% активніше, ніж на початковому етапі інтоксикації. Поряд з цим необхідно зауважити, що в даному випадку передбачувана активація процесів синтезу аскорбату, відбувається інтенсифікація функціонування ферменту за умов достатньої кількості субстрату реакції.

Дані, представлені на рис. 1, дозволяють стверджувати, що після 12-годинної інтоксикації сполуками нікелю і кадмію у варіантах за низької концентрації останнього, в коренях гороху рівень збільшення активності аскорбатпероксидази перевищував відповідні показники після 7-годинної експозиції на 20-23%. Поряд з цим, при високому рівні кадмію на фоні низької концентрації нікелю у середовищі вирощування спостерігалась істотніша активація функціонування зазначеного ферменту – майже в 1,5 рази. В коренях проростків гороху, за сумісної дії сполук металів у високій концентрації, активність аскорбатпероксидази статистично достовірно не відрізнялась від такої в попередній дослідний період, що, пояснюється, зокрема, зниженням кількості відновленої аскорбінової кислоти.

На 24-ту годину експерименту в коренях гороху спостерігалось уповільнення темпів зростання активності аскорбатпероксидази. Так, за низької

та високої концентрації сполук обох металів її абсолютні значення збільшувались на 35 і 28% відповідно, в той час як в інших варіантах – не змінювались порівняно з 12-годинною експозицією. Встановлена тенденція зміни ферментативної активності може пояснюватись підвищенням концентрації іонів кадмію і нікелю у тканинах коренів, що призводить до відповідної інтенсифікації утворення інтермедіатів стресової дії, зокрема продуктів ПОЛ, та використанням значної кількості вітаміну С для переривання вільнорадикальних процесів.

Сумісна дія сполук кадмію і нікелю протягом першої години не спричиняла змін активності аскорбатпероксидази в листках гороху, що узгоджується і з відсутністю відмінностей в концентрації аскорбінової кислоти у дослідних та контрольних рослин (рис. 2). На відміну від короткочасного, 7-годинний стресовий вплив призводив до статистично достовірного підвищення активності аскорбатпероксидази в листках на 25-44% за комплексного впливу токсикантів з низькою концентрацією хоча б одного з них. Поряд з цим, за сумісної дії кадмію і нікелю у високих концентраціях, інтенсивність функціонування даного ферменту була майже вдвічі вищою за контрольну. Така індукція активності антиоксидантного ферменту може бути зумовлена розвитком оксидативного стресу за умов надлишку важких металів (Gill, Tuteja, 2010).

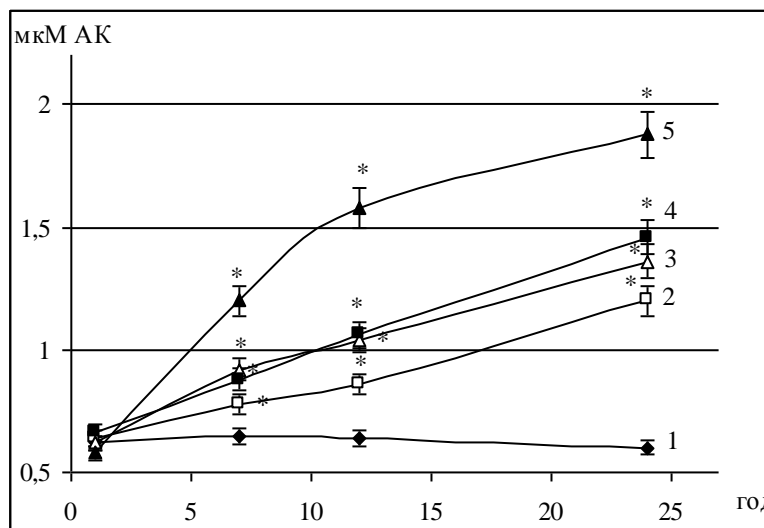


Рис. 2. Активність аскорбатпероксидази в листках гороху за сумісної дії іонів кадмію та нікелю (мкмоль аскорбінової кислоти/мг білка за хв).

Аналогічна тенденція зміни активності аскорбатпероксидази спостерігалась і у варіантах дослідів з подовженням тривалості інтоксикації сполуками важких металів до 12 годин. Наприклад, під впливом токсикантів у низькій концентрації відбувалось підвищення інтенсифікації функціонування

оксидоредуктази на 10% порівняно з попереднім варіантом, тоді як за сумісної дії металів у високих концентраціях – на 30%, що в 2,5 рази перевищувало контроль.

Збільшення тривалості експозиції гороху на розчинах сірчанокислого кадмію та нікелю до 24 годин спричинювало подальше зростання активності аскорбатпероксидази в листках. Зокрема у варіантах з низьким вмістом у середовищі вирощування хоча б одного з металів, активність ферменту перевищувала відповідну після 12-годинного стресу на 32-39%. Поряд з цим, необхідно зазначити, що у варіанті за дії високої концентрації обох токсикантів аскорбатпероксидазна активність збільшувалась лише на 18% відносно аналогічного варіанту на 12-ту годину експозиції. На нашу думку, цей факт може свідчити про недостатню для нормального функціонування ферменту кількість аскорбінової кислоти, яка використовується аскорбатпероксидазою в якості специфічного субстрату.

ВИСНОВКИ

У результаті аналізу отриманих даних була виявлена тенденція щодо зростання вмісту як аскорбінової кислоти, так і її окислених форм в коренях гороху протягом перших 7 годин сумісної дії сполук кадмію і нікелю, що, ймовірно, вказує на інтенсифікацію синтезу даного антиоксиданту. Після 12-годинного стресового впливу кількість аскорбату знижується, в той час як кількість дегідроаскорбінової і 2,3-дікетогулонової кислот продовжує збільшуватись. В листках гороху за дії сполук металів у низькій концентрації вміст аскорбінової кислоти зростає на 14%. За комплексного впливу токсикантів у високих концентраціях вже з 7-ої години відбувається вичерпання антиоксидантних ресурсів. За низького вмісту у середовищі одного з металів кількість аскорбінової кислоти в асиміляційних органах гороху зменшувалась, починаючи з 7-ої години. Поряд з цим, токсична дія сполук кадмію та нікелю проявляється в суттєвому порушенні прооксидантно-антиоксидантної рівноваги, що підтверджується відповідним підвищенням активності аскорбатпероксидази. В коренях гороху на 24-ту годину експерименту спостерігалось уповільнення темпів зростання активності зазначеного ферменту, яке може бути пов'язане з недостатньою кількістю аскорбінової кислоти. На початковому етапі стресового впливу, зумовленого сумісною дією сполук кадмію і нікелю, в листках проростків не відбувалось змін активності аскорбатпероксидази. В листках гороху 7-годинний стресовий вплив призводив до статистично достовірного підвищення активності оксидоредуктази у всіх варіантах дослідів.

Робота виконана за проектом № 36-1 «Транслокація важких металів і фтору в системі "грунт-рослина" та підвищення стійкості рослин за дії абіотичних факторів» цільової комплексної міждисциплінарної програми



наукових досліджень НАН України з проблем сталого розвитку, раціонального природокористування та збереження навколишнього середовища.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Гришко В.Н. Функционирование глутатионзависимой антиоксидантной системы и устойчивость растений при действии тяжелых металлов и фтора / В.Н. Гришко, Д.В. Сыщиков. – К.: Наукова думка, 2012. – 240.
- Специальный практикум по биохимии и физиологии растений / [Под ред. М.М. Окунцова]. – Калининград: КГУ, 1981. – 37 с.
- Сищиков Д.В. Глутатіонзалежна антиоксидантна система проростків гороху та кукурудзи за дії сполук нікелю / Д.В. Сищиков, В.М. Гришко // Укр. біохім. журн. – 2003. – Т. 75, № 4. – С. 131-138.
- Сищиков Д.В. Накопичення нікелю вегетативними органами проростків гороху та кукурудзи / Д.В. Сищиков, В.М. Гришко // Доповіді Національної академії наук України. – 2006. – № 1. – С. 167-172.
- Єгоршин О.О. Математичне планування польових дослідів та статистична обробка експериментальних даних // О.О. Єгоршин, М.В. Лісовий. – Харків: ННЦ Інститут ґрунтознавства та агрохімії УААН, 2005. – 194с.
- Микієвич І.М. Роль аскорбінової кислоти та ферментів її метаболізму в адаптації рослин до токсичної дії іонів свинцю: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.12 «Фізіологія рослин» / І.М. Микієвич – Львів, 2003. – 20с.
- Anjum N.A. Sulfur protects mustard (*Brassica campestris* L.) from cadmium toxicity by improving leaf ascorbate and glutathione / N.A. Anjum, S. Umas, A. Ahmad, M. Iqbal, N.A. Khan // Plant growth regul. – 2008. – 54. – P. 271-279.
- Foyer C.H. Redox regulation in photosynthetic organisms: Signaling, acclimation and practical implications / C.H. Foyer, G. Noctor // Antioxidants and Redox Signaling – 2009. – 11. – P. 862-905.
- Ghasemi F. Effects of Ni²⁺ toxicity on Hill reaction and membrane functionality in maize / F. Ghasemi, R. Heidari, R. Jameii, L. Purakbar // Journal of Stress Physiology & Biochemistry. – 2012. – 8, N. 4. – P. 55-61.
- Gill S.S. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants / S.S. Gill, N. Tuteja // Plant physiol. biochem. – 2010. – 48. – P. 909-930.
- Greenberg Ch.S. Rapid single step membrane protease assay / Ch.S. Greenberg, Rh.R. Gaddock // Clin. Chem. – 1982. – 28, N 7. – P. 1726-1728.
- Huang G.Y. The effect of multiple heavy metals on ascorbate, glutathione and related enzymes in two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorhiza*) / G.Y. Huang, Y.S. Wang, C.C. Sun, J.D. Dong, Z.X. Sun // Int. J. oceanography and hydrobiology. – 2010. – XXXIX, N.1. – P. 11-25.

- Liu Y.G. Cadmium-induced oxidative stress and response of the ascorbate–glutathione cycle in *Bechmeria nivea* (L.) / Y.G. Liu, X. Wang, G.M. Zeng, D. Qu, J.J. Gu, M. Zhou, L. Chai // *Chemosphere*. – 2007. – 69. – P. 99-107.
- Matamoros M.A. Biosynthesis of ascorbic acid in legume root nodules / M.A. Matamoros, J. Loscos, M.J. Coronado, J. Ramos, S. Sato, P.S. Testillano, S. Tabata, M. Becana // *Plant Physiol*. – 2006. – 141. – P. 1068-1077.
- Nakano Y. Hydrogen peroxide is scavenger by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts / Y. Nakano, K. Asada // *Plant and Cell Physiol*. – 1981 –22, N 5. – P.867-880.
- Romero-Puertas M.C. Differential expression and regulation of antioxidative enzymes by cadmium in pea plants / M.C. Romero-Puertas, F.J. Corpas, M. Rodriguez-Serrano, M. Gomez, L.A. del Rio, L.M. Sandalio // *J. plant physiol*. – 2007. – 164. – P.1346-1357.
- Smirnoff N. The role of ascorbate in the acclimation of leaves to high light / N. Smirnoff // *Pharmaceutical Biology* – 2012. – 50, N 5 – P. 634-634.

REFERENCES

- Gryshko, V.N., Syshchykov, D.V. (2012). Mechanism of glutathione dependent antioxidant system and plant resistance under action of various heavy metals and fluorine. Kiev: Naukova dumka.
- Practicum on Plant Biochemistry and Physiology. (1981). Okuntsov, M.M. (Ed.). Kaliningrad: Kaliningrad National University.
- Syshchykov, D.V., Gryshko, V.M. (2003). Glutathione dependent antioxidant system of pea and maize growths under the action of nickel substances. *Ukrainian Biochemistry Journal*. 75(4), 131-138.
- Syshchykov, D.V., Gryshko, V.M. (2006). Nickel accumulation by the vegetative parts of pea and maize growths. *Reports of National Academy of Science of Ukraine*. 1, 167-172.



Yehorshyn, O.O., Lisoviy, M.V. (2005). Mathematical prediction of field experiments and statistical processing of experimental data. Kharkiv: Research and Educational Center, Institute of Soil Sciences and Agrochemistry.

Mykievych, I.M. (2003). Role of ascorbic acid and its metabolism ferments in plant adaptation towards toxic action of lead ions. Thesis of Doctoral Dissertation. Lviv.

Anjum, N.A. Sulfur protects mustard (*Brassica campestris* L.) from cadmium toxicity by improving leaf ascorbate and glutathione / N.A. Anjum, S. Umas, A. Ahmad, M. Iqbal, N.A. Khan // Plant growth regul. – 2008. – 54. – P. 271-279.

Foyer C.H. Redox regulation in photosynthetic organisms: Signaling, acclimation and practical implications / C.H. Foyer, G. Noctor // Antioxidants and Redox Signaling – 2009. – 11. – P. 862-905.

Ghasemi, F., Heidary, R., Jameii, R., Parakbar, L. (2012). Effects of Ni²⁺ toxicity on Hill reaction and membrane functionality in maize. Journal of Stress Physiology & Biochemistry. 8(4), 55-61.

Gill, S.S., Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant physiol. biochem. 48, 909-930.

Greenberg, Ch.S., Gaddock, Ch.S. (1982). Rapid single step membrane proteine assay. Clin. Chem. 28(7), 1726-1728.

Huan, G.Y., Wang, Y.S., Sun, C.C., Dong, J.D., Sun, X. (2010). The effect of multiple heavy metals on ascorbate, glutathione and related enzymes in two mangrove

- plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorrhiza*). *Int. J. oceanography and hydrobiology*. XXXIX(1), 11-25.
- Liu, Y.G., Wang, X., Zeng, G.M., Qu, D., Gu, J.J., Zhou, M., Chai, L. (2007). Cadmium-induced oxidative stress and response of the ascorbate–glutathione cycle in *Beckmeria nivea* (L.). *Chemosphere*. 69, 99-107.
- Matamoros, M.A., Loscos, J., Coronado, M.J., Ramos, J., Sato, S., Testillano, P.S., Tabata, S., Becana, M. (2006). Biosynthesis of ascorbic acid in legume root nodules. *Plant Physiol*. 141, 1068-1077.
- Nakano, Y., Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenger by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiol*. 22(5), 867-880.
- Romero-Puertas, M.C., Corpas, F.J., Rodriguez-Serrano, M., Gomez, M., L.A. del Rio, L.A., Sandalio, L.M. (2007). Differential expression and regulation of antioxidative enzymes by cadmium in pea plants. *J. plant physiol*. 164, 1346-1357.
- Smirnoff, N. (2012). The role of ascorbate in the acclimation of leaves to high light. *Pharmaceutical Biology*. 50(5), 634-634.

Поступила в редакцию 30.03.2013

**Как цитировать:**

Артюшенко, Т.А., Гришко, В.М. (2014). Сумісний вплив кадмію та нікелю на функціонування аскорбатзалежної ланки антиоксидантного захисту гороху. *Биологический вестник Мелитопольского государственного педагогического университета имени Богдана Хмельницкого*, 4 (1), 141-158.

crossref <http://dx.doi.org/10.7905/bbmstu.v4i1.816>

© Артюшенко, Гришко, 2014

Users are permitted to copy, use, distribute, transmit, and display the work publicly and to make and distribute derivative works, in any digital medium for any responsible purpose, subject to proper attribution of authorship.



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution 3.0 License](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).