

УДК: 577.15:632.15

**Влияние солей тяжелых металлов на активность аминотрансфераз и интенсивность перекисного окисления липидов в прорастающих семенах сои (*Glicine max* L.)
Е.Ф.Бездудная**

Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)

Изучена активность аланин- и аспаратаминотрансферазы и содержание продуктов тиобарбитуровой кислоты (ТБК-активных продуктов) в семядолях и проростках сои сорта Clark на ранних этапах прорастания. Установлено повышение аланин- и аспаратаминотрансферазной активности в семядолях на третьи сутки прорастания и высокая активность этих ферментов в проростках. CdCl_2 оказал стимулирующее действие на аланинаминотрансферазную, а CoCl_2 – аспаратаминотрансферазную активность в семядолях через сутки. CdCl_2 стимулировал аланинаминотрансферазную активность в проростках на третьи сутки, по сравнению с контролем, и тормозил аспаратаминотрансферазную активность. CoCl_2 стимулировал аспаратаминотрансферазную активность в проростках на пятые сутки. Установлено повышение содержания ТБК-активных продуктов в семядолях и проростках через пять суток. CoCl_2 активировал свободнорадикальное окисление в семядолях и проростках, а CdCl_2 – только в семядолях. Обсуждается роль солей тяжелых металлов и процессов свободнорадикального окисления в регуляции реакций трансаминирования при прорастании семян сои.

Ключевые слова: *аланинаминотрансфераза, аспаратаминотрансфераза, ТБК-активные продукты, хлорид кобальта, хлорид кадмия, семядоли и проростки сои.*

Введение

В связи с все возрастающими масштабами добычи и переработки сырья, содержащего тяжелые металлы, и их применением в различных сферах человеческой деятельности значительно возросло загрязнение окружающей среды. Концентрации тяжелых металлов в почве, воде, осадках в настоящее время значительно превышают предельно допустимые нормы и стали угрожающими для живых организмов (Сидоров, 1995).

Изучение влияния солей тяжелых металлов на активность ферментов азотистого обмена и накопление биомассы в семенах сои представляет как теоретический, так и практический интерес.

Среди различных солей тяжелых металлов имеются высокотоксичные, условнотоксичные и эссенциальные. Однако, при избыточном поступлении в организм солей даже эссенциальных микроэлементов они оказывают токсическое действие. Например, ионы кобальта необходимы для образования ряда кобальт-содержащих макромолекул (Калиман и др., 2001) и являются необходимыми микроэлементами для роста сои (Ahmed, Evans, 1960). Однако, при избыточном поступлении этих солей в клетки, они вытесняют ионы железа из металлоферментов, а свободное железо активирует процессы свободнорадикального окисления (Калиман и др., 2001; Сидоров, 1995), что сопровождается повреждением ряда макромолекул и надмолекулярных структур – белков, нуклеиновых кислот и биологических мембран. Некоторые токсические ионы, например, кадмия, блокируют SH-группы белков и небелковых соединений, в том числе компонентов антиоксидантной защиты, что сопровождается активацией свободнорадикального окисления и последующего повреждения макромолекул (Калиман и др., 2001). Конечный результат и в том, и другом случае – повреждающее действие, хотя механизмы его формирования различные.

С другой стороны, существуют представления об активных метаболитах кислорода как сигнальных молекулах (Schopfer et al., 2001).

Однако, влияние солей кобальта и кадмия на прорастание семян на ранних стадиях изучено недостаточно. Известны данные, что при прорастании семян активируется мобилизация запасенных соединений, в том числе протеолиз и липолиз, с последующей утилизацией образовавшихся соединений (Muntz et al., 2001). При распаде липидов семян сои высвобождается большое количество ненасыщенных кислот, которые могут пополнять фонд субстратов перекисного окисления.

Исходя из вышеизложенного, в работе было изучено влияние солей CdCl_2 и CoCl_2 на активность аланин- и аспаратаминотрансфераз и интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) на ранних этапах прорастания семян сои.

Объекты и методы исследования

В опытах использовали семена сои сорта Clark (любезно предоставленные В.В.Жмурко, зав. каф. физиологии и биохимии растений ХНУ). Проращивание проводили в чашках Петри при температуре $23 \pm 2^\circ\text{C}$ на фильтровальной бумаге, смоченной дистиллированной водой (контроль). При исследовании влияния солей тяжелых металлов среда проращивания содержала CoCl_2 или CdCl_2 в концентрациях 10^{-4} М. При этом мы исходили из данных литературы (Костишин та ін., 2001), что соли тяжелых металлов, в концентрациях от 10^{-7} до 10^{-4} М активировали свободнорадикальное окисление в проростках гороха. Для анализа брали неповрежденные семядоли через 1, 3 и 5 суток проращивания, а проростки (осевые органы без семядолей) через 3 и 5 суток. Через сутки после замачивания семян появление проростков практически не отмечено.

Из семядолей и проростков выделяли фракцию водорастворимых белков путем растирания образца в 0,01М трис-глициновом буфере (рН 8,3) и последующего центрифугирования. Фракция водорастворимых белков служила для определения ферментативной активности и содержания белка. Белок определяли методом Лоури в модификации Миллера и выражали в мг/г ткани. Все операции по выделению белков проводили при $0-4^\circ\text{C}$ (Полевой, Максимов, 1978).

Активность аминотрансфераз определяли по накоплению пирувата или оксалоацетата соответственно, как описано (Полевой, Максимов, 1978). Калибровочную кривую строили с использованием стандартных растворов пирувата или оксалоацетата. Ферментативную активность выражали в мкмоль субстрата, превращенного 1 мг белка за 1 час инкубирования. Учитывая, что аспаратаминотрансфераза локализована преимущественно в митохондриях, при определении активности фермента образцы предварительно подвергали повторному замораживанию–оттаиванию.

О скорости ПОЛ судили по накоплению ТБК-активных продуктов в безбелковых центрифугатах по реакции с тиобарбитуровой кислотой с последующим определением оптической плотности при 532 нм (Арутюнян и др., 2001).

Статистическую обработку результатов проводили методами вариационной статистики ANOVA, с использованием пакета программ "Statistica 6.0".

Результаты и обсуждение

Как видно из табл. 1, аланинаминотрансферазная активность в семядолях изменялась в процессе прорастания. Высокая активность фермента, наблюдаемая через сутки и трое суток проращивания, снижается к пятым суткам. Соли металлов не оказали влияния на ферментативную активность по сравнению с контролем и только в среде, содержащей CdCl_2 , наблюдалось незначительное повышение активности через сутки. Поскольку в это время практически не наблюдалось появления проростков, такое повышение можно рассматривать как проявление адаптивной реакции, направленной на образование пирувата и активацию синтеза глюкозы для формирования проростка.

Аспаратаминотрансферазная активность в семядолях, изначально низкая, значительно повышалась на 3-и сутки с последующим возвращением к величинам первых суток. CoCl_2 заметно активировал аспаратаминотрансферазу в семядолях через сутки. CdCl_2 не оказал влияния на ферментативную активность во все сроки проращивания (табл. 1).

Таблица 1.

Влияние тяжелых металлов на активность аминотрансфераз в семядолях сои при прорастании (мкмоль/мг белка/1 час; $n=4-5$)

Сутки прорастания	Вариант		
	Контроль (вода)	CoCl_2	CdCl_2
Аланинаминотрансфераза			
Первые	$3,6 \pm 0,18$	$4,0 \pm 0,24$	$5,6 \pm 0,3^\#$
Третьи	$5,4 \pm 0,24^*$	$6,6 \pm 0,36$	$4,8 \pm 0,12$
Пятые	$1,0 \pm 0,7^*$	$1,3 \pm 0,12$	$1,1 \pm 0,12$
Аспаратаминотрансфераза			
Первые	$1,8 \pm 0,42$	$3,4 \pm 0,24$	$2,0 \pm 0,12$
Третьи	$5,7 \pm 0,56^*$	$6,6 \pm 0,42$	$6,0 \pm 0,18$
Пятые	$1,7 \pm 0,17$	$2,0 \pm 0,18$	$2,1 \pm 0,16$

В этой и последующих таблицах:

* – достоверные отличия ($p \leq 0,05$) относительно 1-х суток для семядолей и 3-х суток для проростков;

– достоверные отличия ($p \leq 0,05$) относительно контроля.

Оказалось, что уровень активности аминотрансфераз в проростках сои выше, чем в семядолях, особенно на пятые сутки прорастания (табл. 2).

В аланинаминотрансферазной реакции образуется пируват – ключевой субстрат глюконеогенеза, и повышение его содержания способствует активации синтеза углеводов, необходимых для дальнейшего роста корешков.

Под влиянием CdCl_2 в трехсуточных проростках наблюдалось повышение аланинаминотрансферазной и снижение аспартатаминотрансферазной активностей. CoCl_2 заметно активировал аспартатаминотрансферазу в пятисуточных проростках (табл. 2).

Таблица 2.
Влияние тяжелых металлов на активность аминотрансфераз в проростках сои при прорастании (мкмоль/мг белка/1 час; n=5–6)

Сутки прорастания	Вариант		
	Контроль (вода)	CoCl_2	CdCl_2
Аланинаминотрансфераза			
Третьи	$4,3 \pm 0,35$	$3,6 \pm 0,54$	$7,2 \pm 0,42^{\#}$
Пятые	$12,7 \pm 1,4^*$	$16,2 \pm 3,0$	$11,4 \pm 0,6$
Аспартатаминотрансфераза			
Третьи	$9,0 \pm 0,6$	$7,8 \pm 0,54$	$5,4 \pm 0,54^{\#}$
Пятые	$8,4 \pm 0,7$	$11,4 \pm 0,6^{\#}$	$6,6 \pm 0,54$

Как видно из данных табл. 3, на пятые сутки прорастания семян на воде (контроль) повышалось содержание ТБК-активных продуктов как в семядолях, так и в проростках. В среде прорастания, содержащей CoCl_2 , в ходе опыта отмечено повышение содержания ТБК-активных продуктов как в семядолях, так и в проростках, по сравнению с контролем. В среде, содержащей CdCl_2 , наблюдалось повышение количества ТБК-активных продуктов только через 3 суток, сохранившееся на этом уровне и через пять суток. В трехсуточных проростках CdCl_2 не оказал влияния на содержание ТБК-активных продуктов по сравнению с контролем, а через пять суток оно несколько повысилось (табл. 3).

Таблица 3.
Содержание ТБК-активных продуктов в семядолях и проростках сои (нмоль/г ткани, n=5–6).

Вариант опыта			
Семядоли			
Сутки проращивания	Контроль	CoCl_2	CdCl_2
Первые	$20,43 \pm 1,52$	$39,9 \pm 3,72^{\#}$	$24,98 \pm 2,47$
Третьи	$19,83 \pm 0,74$	$56,14 \pm 3,12^{\#*}$	$41,23 \pm 3,26^{\#*}$
Пятые	$25,25 \pm 1,82^*$	$68,21 \pm 3,90^{\#*}$	$52,08 \pm 4,02^{\#*}$
Проростки			
Третьи	$31,40 \pm 4,01$	$54,17 \pm 4,33^{\#}$	$23,50 \pm 2,26$
Пятые	$45,00 \pm 3,43^*$	$67,80 \pm 3,34^{\#*}$	$39,60 \pm 4,32^*$

Следует отметить, что в среде, содержащей CoCl_2 , наблюдалось более интенсивное, по сравнению с контролем, прорастание семян, отдельные проростки появлялись уже через сутки. В последующем этот показатель увеличивался. В среде, содержащей CdCl_2 , в первые сутки практически не отмечено появления проростков – они появлялись через двое-трое суток. Эти данные согласуются с представлениями о том, что ионы кобальта стимулируют свободнорадикальное окисление в клетках и являются необходимыми микропищевыми компонентами (Ahmed, Evans, 1960), а активные металлы кислорода стимулируют ростовые процессы (Del Rio et al., 2006; Schopfer et al., 2001).

Если исходить из представлений о том, что аланин- и аспартатаминотрансфераза играют ключевую роль в метаболизме аланина, аспарата и глутамата, а аспарат и глутамат используются для синтеза аспарагина и глутамина, повышение их активности можно рассматривать как необходимое условие накопления соответствующих амидов – запаса NH_4^+ . Следовательно, указанные соединения могут служить донорами NH_4^+ , необходимого для синтеза и самообновления белков, в том числе и ферментов, катализирующих отдельные реакции метаболизма в прорастающих семенах. Известно, что синтез аминокислот в растениях за счет α -кетокислот осуществляется в реакциях, катализируемых

системой глутаминсинтаза/оксалоацетатаминотрансфераза (Гудвин, Мерсер, 1986; Землянухин, Иванов, 1988; Lancien et al., 2000).

Синтез новых белков требует постоянного пополнения фонда свободных аминокислот и аммиака. Ключевыми субстратами для синтеза всех протеиногенных аминокислот в прорастающих семенах являются пируват, оксалоацетат, α -оксоглутарат (Гудвин, Мерсер, 1986; Lancien et al., 2000). Перечисленные кетокислоты образуются в обратимых реакциях, катализируемых аминотрансферазами. Активность фермента и направление реакции зависят от скорости утилизации образующихся продуктов (Кретович, 1986). Продукты реакций трансаминирования могут использоваться в нескольких метаболических путях. Среди них: синтез белков, новообразование аминокислот путем аминирования кетокислот (Гудвин, Мерсер, 1986), накопление глутамин и аспарагина (Медведев, 2004; Lancien et al., 2000), окисление в цикле трикарбоновых кислот с образованием АТФ и восстановительных эквивалентов. Учитывая вышеизложенное, можно считать, что направление трансаминазных реакций в условиях прорастания семян протекает преимущественно по пути образования кетокислот, которые, по данным некоторых авторов (Гудвин, Мерсер, 1986), являются одними из основных компонентов, необходимых для формирования и роста проростка, а также энергообеспечения синтетических процессов.

Источником аммиака при синтезе аминокислот из кетокислот могут служить аспарагин и глутамин. В растениях очень высокая активность аспарагиназы и глутаминазы. NH_4^+ для синтеза аминокислот в фотосинтезирующих растениях образуется из нитратов почвы или в результате работы нитрогеназы клубеньковых бактерий (Кретович, 1986; Медведев, 2004; Lancien et al., 2000).

В семенах сои на исследуемых нами этапах прорастания нет запасов нитратов и соответствующих систем их превращения и клубеньков, в которых клубеньковые бактерии фиксируют атмосферный азот. Поэтому единственными донорами аммиака могут служить аспарагин и глутамин, которые накапливаются в реакциях, катализируемых аспартатаминотрансферазой. В литературе имеются также указания, что источником аммиака для новообразования аминокислот могут служить реакции дезаминирования аминокислот, образующихся в процессе распада белков, в том числе дезаминирование фенилаланина и тирозина, катализируемые фенилаланин-аммиак лиазой и тирозин-аммиак лиазой соответственно, высокая активность которой установлена рядом авторов (Гудвин, Мерсер, 1986; Кретович, 1986; Aerts, Bauman, 1994). Последняя реакция представляет особый интерес, поскольку при этом образуется п-кумаровая кислота – предшественник полифенолов: кофейной, феруловой, п-гидроксиферуловой и синаповой кислот. Кофейная кислота утилизируется для синтеза хлорогеновой кислоты – одного из компонентов системы полифенол \leftrightarrow полифенолоксидаза, в которой происходит активное дезаминирование аминокислот (Кретович, 1986; Aerts, Bauman, 1994).

Акцептором H_2 в реакциях дезаминирования аминокислот в анаэробных условиях у растений служат хиноны, которые в системе полифенолы \leftrightarrow полифенолоксидаза генерируют активные формы кислорода и, в частности, H_2O_2 .

Таким образом, анализ полученных результатов и данных литературы свидетельствует, что ионы CoCl_2 и CdCl_2 в концентрациях 10^{-4} М являются стрессорными факторами, которые влияют на активность аминотрансфераз, а также активируют свободнорадикальное окисление.

Список литературы

- Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма. – СПб.: ИКФ «Фолиант», 2001. – 232с.
- Гудвин Т., Мерсер Э. Введение в биохимию растений: В 2-х т. Пер. с англ. – Т.1. – М.: Мир, 1986. – 393с.
- Землянухин А.Н., Иванов Б.Ф. Биохимия гипоксического метаболизма растений. – Воронеж: Изд-во ВГУ, 1988. – 192с.
- Калиман П.А., Никитченко И.В., Сокол О.А., Стрельченко Е.В. Регуляция гемоксигеназной активности в печени крыс при оксидативном стрессе, вызванном хлоридом кобальта и хлоридом ртути // Биохимия. – 2001. – Т.66, №1. – С. 98–104.
- 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. Т.2. – Київ, 2001. – С. 52–66.
- Кретович В.Л. Биохимия растений. – М.: Высш. шк., 1986. – 503с.
- Медведев С.С. Физиология растений. – СПб: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2004. – 336с.
- Полевой В.В., Максимов Г.Б. Методы биохимического анализа растений. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1978. – 192с.
- Сидоров Н.Ф. Проблема тяжелых металлов в сельском хозяйстве. – Иваново, 1995. – 59с.
- Aerts R.J., Bauman T.W. Distribution and utilization of chlorogenic acid in *Coffea* seedlings // J. of Experimental Botany. – 1994. – Vol.45, №4. – P. 497–503.

Ahmed S., Evans H.J. Cobalt: a micronutrient element for the growth of soybean plants under symbiotic conditions // Biochem. and Biophys. res. commun. – 1960. – Vol.58, №3. – P.377.

Del Rio L.A., Sandalio L.M., Corpas F.J. et al. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling // Plant Physiol. – 2006. – Vol.141. – P. 330–335.

Lancien M., Gadal P., Hodges M. Enzyme redundancy and the importance 2-oxoglutarate in higher plant ammonium assimilation // Plant. Physiol. – 2000. – Vol.123. – P. 817–824.

Muntz K., Belozersky M.A., Dunaevsky Y.E. et al. Stored proteinases and the initiation of protein mobilization in seeds during germ and seedling growth // J. of Experimental Botany. – 2001. – Vol.52, №362. – P. 1741–1752.

Schopfer P., Plachy C., Frahry G. Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid // Plant Physiol. – 2001. – Vol.125. – P. 1591–1602.

Вплив солей важких металів на активність амінотрансфераз та інтенсивність перекисного окислення ліпідів при проростанні насіння сої (*Glicine max* L.)

О.Ф.Бездудна

Вивчена активність аланін- і аспаратамінотрансферази і вміст продуктів тіобарбітурової кислоти (ТБК-активних продуктів) в сім'ядолях і паростках сої сорту Clark на ранніх етапах пророщування. Встановлено підвищення аланін- та аспаратамінотрансферазних активностей в сім'ядолях на третю добу пророщування і висока активність згаданих ферментів в паростках. CdCl₂ виявив стимулюючу дію на аланінамінотрансферазну, а CoCl₂ – на аспаратамінотрансферазну активність в сім'ядолях через добу. CdCl₂ стимулював аланінамінотрансферазну активність в паростках на третю добу, порівняно з контролем, і гальмував аспаратамінотрансферазну активність. CoCl₂ стимулював аспаратамінотрансферазну активність в паростках на п'яту добу. Встановлено підвищення вмісту ТБК-активних продуктів в сім'ядолях і паростках через п'ять діб. CoCl₂ активував вільнорадикальне окислення в сім'ядолях і паростках, а CdCl₂ – лише в сім'ядолях. Обговорюється роль солей важких металів і процесів вільнорадикального окислення в регуляції реакцій трансамінування при проростанні насіння сої.

Ключові слова: аланінамінотрансфераза, аспаратамінотрансфераза, ТБК-активні продукти, хлорид кобальту, хлорид кадмію, сім'ядолі і паростки сої.

Effect of salts of heavy metals on activity of aminotransferases and intensity of peroxidation of lipids during germination of soybean seeds (*Glicine max* L.)

E.F.Bezdudna

The activity of alaninaminotransferase and aspartataminotransferase in seeds and seedlings of soybean Clark at beginning of germination was studied. The content of MDA-active products was detected also. The increasing of alaninaminotransferase and aspartataminotransferase activity in seeds and high activity of both enzymes in seedlings on the third day of germination was detected. CdCl₂ stimulated aspartataminotransferase activity on the first day of germination in seedlings. CoCl₂ stimulated aspartataminotransferase activity on the first day of germination in seeds and on the fifth day of germination in seedlings. The increasing of MDA-active products in seeds and seedlings on the fifth day of germination was detected. CoCl₂ activated the reactions of free radical oxidation in seeds and seedlings, but CdCl₂ only in seeds. The role of heavy metal salts and free radicals in the reactions of transamination during of soybean seeds germination is discussed.

Key words: alaninaminotransferase, aspartataminotransferase, MDA-active products, cobalt chloride, cadmium chloride, soybean seeds and seedlings.

Представлено В.І.Жуковим

Рекомендовано до друку Л.О.Красильниковою