

УДК 581.17

## ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ ACER PLATANOIDES L. НА СТРЕСС, ВЫЗВАННЫЙ ЗАГРЯЗНЕНИЕМ СРЕДЫ ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ

Гарифзянов А.Р., Иванищев В.В.

ГОУ ВПО «Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого», Тула,  
e-mail: Garifzyanov86@yandex.ru

Проведена комплексная оценка ответных физиологических реакций *Acer platanoides* L. в составе санитарно-защитных насаждений металлургических предприятий. Показано, что аккумуляция Mn, Zn и Cd в листьях *A. platanoides* не сопровождалась развитием в клетках окислительного стресса, что подтверждалось количеством H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, интенсивностью перекисного окисления липидов и соотношением разных групп фотосинтетических пигментов. В листьях происходило накопление глутатиона и фенольных соединений, а также увеличение активности гваяколовой пероксидазы и каталазы.

**Ключевые слова:** *Acer platanoides*, тяжелые металлы, стресс, активные формы кислорода, антиоксидантная система

## ACER PLATANOIDES L. PHYSIOLOGICAL EFFECTS ON THE STRESS CAUSED BY ENVIRONMENT POLLUTION WITH HEAVY METALS

Garifzyanov A.R., Ivanishchev V.V.

The Tula state pedagogical university of L.N.Tolstoy, Tula, e-mail: Garifzyanov86@yandex.ru

The complex estimation of *Acer platanoides* L. physiological effects as a part of the metallurgical enterprises sanitary-protective plantings was carried out. It was shown that the accumulation of Mn, Zn and Cd in *A. platanoides* leaves was not accompanied by oxidizing stress increase in cells that proved to be true the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quantity, intensity of lipids oxidations and a parity of photosynthetic pigment groups. In leaves the accumulation of glutathione and phenolic compounds, and the peroxidases and catalases activity increase were observed.

**Keywords:** *Acer platanoides*, heavy metals, stress, active oxygen forms, antioxidizing system

Высокая токсичность тяжелых металлов (ТМ) обуславливает внимание исследователей к загрязнению ими компонентов окружающей среды. Известно, что значительную роль в процессах миграции ТМ играют растения. Аккумуляция ТМ может приводить к развитию в их клетках окислительного стресса, сопряженного с избыточной генерацией активных форм кислорода (АФК). К числу последних относят производные кислорода радикальной природы (супероксид-радикал (анион-радикал) O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, гидроперекисный радикал HO<sub>2</sub><sup>•</sup>, гидроксил-радикал HO<sup>•</sup>), а также его реактивные производные (перекись водорода H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, синглетный кислород <sup>1</sup>O<sub>2</sub> и пероксинитрит) [10].

В последнее время большое количество исследований посвящено изучению влияния ТМ на продукцию АФК. Доказано, что активная генерация АФК наблюдается при действии ионов железа, меди, цинка, никеля, алюминия, кадмия, свинца и др. [9]. В результате повышенной генерации АФК в клетках может произойти окисление липидов, углеводов, белков, повреждение ДНК и РНК, дезорганизация цитоскелета [5].

Важнейшим механизмом устойчивости растений в условиях загрязнения среды ТМ является активизация системы антиоксидантной защиты (АОС). Наибольшее значение придается роли, выполняемой низкомолекулярными метаболитами (аскорбиновая кислота, глутатион, пролин, каротиноиды,

флавоноиды и др.) и антиоксидантными ферментами (СОД, каталаза, пероксидазы) [10]. Исследований, в которых были бы одновременно представлены отмеченные реакции антиоксидантной системы в пределах одного биологического объекта, мало. Древесные растения представляют в этом аспекте особый интерес, поскольку обладают высоким биологическим потенциалом при способности длительно депонировать токсичные соединения в многолетних органах.

В связи с этим было проведено исследование, целью которого являлось изучение физиологических реакций *Acer platanoides* L. на стресс, инициируемый загрязнением среды тяжелыми металлами.

### Материал и методы исследования

Для исследования были выбраны 3 постоянные модельные площадки, 2 из которых располагаются в пределах санитарно-защитных насаждений (СЗН) крупнейших металлургических предприятий г. Тулы: I точка пробоотбора – ОАО «Косогорский металлургический завод»; II точка пробоотбора – комплекс предприятий ОАО СП АК «Тулачермет», ОАО «Ванадий-Тулачермет», ОАО «Палема». Ранее проведенное исследование позволило установить в почвах санитарно-защитных насаждений превышение ПДК (или ОДК) по Mn (в 4,7 раза), Pb (в 1,5 раза) и Zn (в 2 раза) и фонового уровня по Fe, Mn, Ti, Sc, V, Cr, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Rb, Sr, Zr, Ba и Pb [2]. За условно контрольную (чистую или фоновую) зону была принята территория Центрального парка культуры и отдыха (ЦПКиО) им. П.П. Белоусова (контроль).

Листья *Acer platanoides* L. отбирали с ветвей 1–2 года жизни на расстоянии 2–3 м от поверхности грунта по периметру кроны деревьев типичного габитуса одного возраста. Содержание перекиси водорода оценивали по количеству образующегося окрашенного комплекса пероксида титана [7]. Степень перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли по методу, основанному на определении количества соединений, взаимодействующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-реагирующих соединений), в пересчете на малоновый диальдегид (МДА) [6]. Содержание фотосинтетических пигментов (хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов) определяли спектрофотометрически в этанольных экстрактах [8]. Определение содержания аскорбиновой кислоты и восстановленного глутатиона проводили титриметрическим методом с 0,001 н раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола (аскорбиновая кислота) и йодата калия (восстановленный глутатион) [3]. Содержание фенольных соединений оценивали спектрофотометрически в этанольных экстрактах: с реактивом Фолина-Дениса (сумма водорастворимых фенольных соединений) и 2%-м спиртовым раствором хлорида алюминия (флавоноиды) [4]. Определение активности ферментов проводили в фосфатно-буферных экстрактах, как описывали ранее [1]: каталазы – манометрическим методом с использованием модифицированного аппарата Варбурга, гваяковой пероксидазы – спектрофотометрическим методом с пирогаллолом.

Каждый опыт проводили в трех биологических и трех аналитических повторностях. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью пакета прикладных компьютерных программ MS Excel 2003 и SigmaStat 3.1. В таблицах и на рисунках представлены средние арифметические значения определяемых величин и их стандартные ошибки ( $P > 0,95$ ). К полученным данным применен стандартный однофакторный дисперсионный анализ с использованием для оценки достоверности при множественном сравнении фактического значения  $q$ -критерия Ньюмена–Кейлса (критическое значение критерия при уровне значимости 0,05 в нашем исследовании равнялось 3,461).

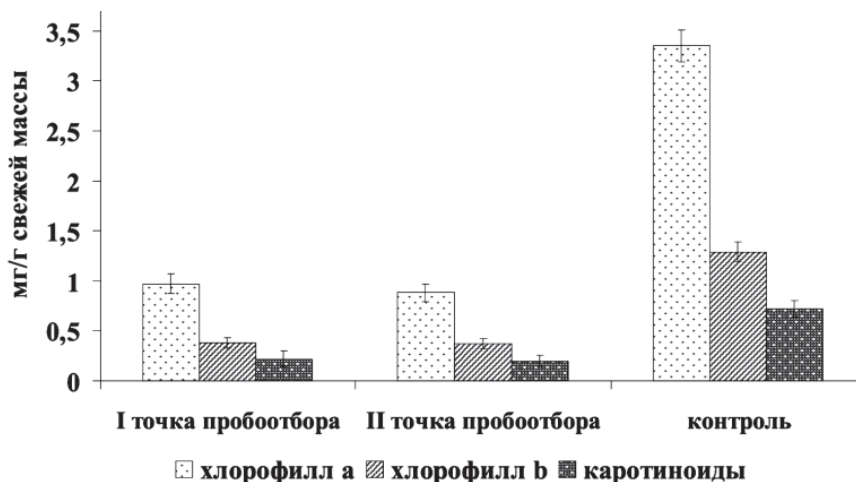
### Результаты исследований и их обсуждение

Произрастание *A. platanoides* на загрязненной тяжелыми металлами территории

СЗН обуславливает процессы сорбции, перераспределения и аккумуляции ТМ в различных тканях и органах. Ранее проведенное исследование показало, что в листьях *A. platanoides* в значительном количестве аккумулируются Mn (180–260 мг/кг сухого вещества), Zn (20–40 мг/кг) и Cd (0,11–0,16 мг/кг) [2]. При этом аккумуляция ТМ из окружающей среды сопряжена с развитием окислительного стресса, обязательным условием которого является генерация избыточных количеств АФК. Поскольку перекись водорода является относительно стабильной АФК (время жизни около 1 мс), способной диффундировать от места образования [10], то изучение ее генерации в стрессовых условиях особенно актуально.

Проведенное исследование показало, что при произрастании *A. platanoides* в составе СЗН, содержание  $H_2O_2$  в листьях было на уровне контрольного значения ( $0,104 \pm 0,010$  ммоль/г). При этом анализ результатов количественного определения МДА, являющегося продуктом перекисного окисления фосфолипидов мембран, подтвердил низкую интенсивность окислительных процессов. Количество МДА в листьях *A. platanoides* было в пределах  $0,88 \pm 0,14$  нмоль/г свежей массы и не превосходило таковой показатель для растений в контроле.

Известно, что одним из наиболее чувствительных аппаратов растений к индуцированному ТМ окислительному стрессу является фотосинтетический. Важное условие его эффективной работы – поддержание стабильного количества и соотношения разных групп пигментов. Проведенное исследование показало, что в условиях промышленного загрязнения содержание пигментов в листьях *A. platanoides* было ниже, чем в контроле. В частности, количество хлорофилла *a* оказалось меньше в 3,4–3,8 раз, хлорофилла *b* – в 3,5 раза, каротиноидов – в 3,6 раз (рисунок).



Содержание фотосинтетических пигментов в листьях *A. platanoides* при стрессе

По своим функциональным свойствам молекулы пигментов различаются, поэтому критичным для поддержания нормального уровня фотосинтеза и сопряженных энергетических процессов является соотношение разных фотосинтетических пигментов. Соотношение пигментов меняется в течение онтогенеза пластид, листа и всего организма, но оно относительно определенно и генетически детерминировано. Проведенное исследование показало, что отношение количества двух форм хлорофилла («Хл *a*/Хл *b*») в листьях *A. platanoides*, а также количества общего хлорофилла (*a + b*) к содержанию каротиноидов в контроле было в пределах 2,6 и 6,44 соответственно (см. рисунок). Такое соотношение фотосинтетических пигментов является типичным для здоровых, хорошо функционирующих зеленых растений. В условиях техногенного загрязнения соотношение пигментов не изменялось.

Поскольку в листьях *A. platanoides* соотношение фотосинтетических пигментов оставалось на уровне контрольного значения, то общее снижение их содержания, по-видимому, отражает не столько характер поврежденности аппарата фотосинтеза, сколько переход его на новый физиологический уровень функционирования, что позволяет ему относительно стабильно работать, но, возможно, с меньшей эффективностью.

Таким образом, можно заключить, что в листьях *A. platanoides* под действием ТМ не происходило развитие окислительно-го стресса. Это подтверждается анализом

результатов по накоплению  $H_2O_2$  и МДА, а также поддержанием стабильного соотношения разных групп фотосинтетических пигментов. Невыраженность окислительных процессов может свидетельствовать о функционировании в листьях *A. platanoides* мощной антиоксидантной системы.

Специфической группой антиоксидантов являются специализированные ферменты (СОД, пероксидазы, каталаза и др.). Проведенное исследование показало, что в листьях *A. platanoides*, произрастающего в условиях повышенного содержания ТМ в окружающей среде, активность гваяколовой пероксидазы была выше, чем в контроле, в 11–14 раз, достигая максимальной величины ( $0,336 \pm 0,053$  мкмоль/мин·г) во II точке пробоотбора (таблица). Анализ результатов определения активности каталазы не позволил установить однозначной реакции данного компонента АОС на загрязнение среды ТМ. В частности, активность фермента в листьях *A. platanoides* I точки пробоотбора ( $140 \pm 5$  мкмоль/мин·г) была выше контрольной величины на 14%. Отсутствие достоверного повышения активности каталазы по II точке пробоотбора может быть следствием ее ингибирования перекисью. В этом случае пероксидазы становятся главными ферментами, катализирующими разложение  $H_2O_2$ . Это утверждение согласуется с результатами по определению активности гваяколовой пероксидазы, активность которой была максимальной во II точке пробоотбора.

Компоненты антиоксидантной системы *A. platanoides* при стрессе

Точка пробоотбора	Содержание				Активность, мкмоль/мин·г	
	аскорбиновой кислоты, мг/г свежей массы	глутатиона, мг/г свежей массы	суммы фенольных соединений, мг/г сухой массы	флавоноидов, мг/г сухой массы	гваяколовой пероксидазы	каталазы
I	$0,56 \pm 0,05$	$0,54 \pm 0,06$	$37,0 \pm 1,1$	$3,0 \pm 0,1$	$0,266 \pm 0,048$	$140 \pm 5$
II	$0,60 \pm 0,06$	$0,59 \pm 0,07$	$43,2 \pm 1,5$	$39,8 \pm 2,5$	$0,336 \pm 0,053$	$107 \pm 3$
Контроль	$0,65 \pm 0,07$	$0,26 \pm 0,06$	$32,6 \pm 1,8$	$30,6 \pm 3,2$	$0,024 \pm 0,005$	$121 \pm 11$

Ферменты расположены в различных тканевых структурах и клеточных компонентах, имеют разную субстратную специфичность и сродство к АФК. При действии стрессоров наблюдается быстрая инактивация конститутивного пула антиоксидантных ферментов. Эти данные обусловили появление точки зрения о том, что низкомолекулярные органические антиоксиданты в ряде случаев способны более эффективно осуществлять защиту метаболизма от АФК [5]. Проведенное исследование показало, что произрастание *A. platanoides* в среде с по-

вышенным содержанием ТМ в почве приводит к изменению количества накопленных в листьях низкомолекулярных соединений, проявляющих антиоксидантные свойства (см. таблицу). В частности показано, что в листьях *A. platanoides* содержание глутатиона в 2 раза, а суммы водорастворимых фенольных соединений на 12–26% было выше, чем в контроле.

Для листьев *A. platanoides* II точки пробоотбора было отмечено также накопление флавоноидов, превышающее таковой уровень в контроле в 1,3 раза, но 10-кратное пониже-

ние его в I точке. Подобная особенность может определяться расходом флавоноидов, как компонентов АОС, для поддержания на низком уровне концентрации АФК. Достоверных изменений в содержании аскорбиновой кислоты в листьях *A. platanoides* СЗН не происходило (см. таблицу).

### Выводы

Таким образом, можно заключить, что, аккумуляция Mn, Zn и Cd в листьях *A. platanoides* не сопровождалась развитием в клетках окислительного стресса: уровень перекиси водорода, интенсивность ПОЛ и соотношение разных групп фотосинтетических пигментов оставалось на уровне контроля. Это становилось возможным благодаря функционированию в листьях данного вида мощной антиоксидантной системы. Было отмечено, что при произрастании *A. platanoides* в составе СЗН в его листьях происходило накопление глутатиона и фенольных соединений, а также увеличение активности гваяколовой пероксидазы и каталазы.

### Список литературы

1. Сравнительный анализ активности компонентов антиоксидантной системы древесных растений в условиях техногенного стресса / А.Р. Гарифзянов, С.В. Горелова, В.В. Иванищев, Е.Н. Музафаров // Известия Тульского государственного университета. Естественные науки. – 2009. – С. 45–48.
2. Оценка возможности использования древесных растений для биоиндикации и биомониторинга выбросов предприятий металлургической промышленности / С.В. Горелова, А.Р. Гарифзянов, С.М. Ляпунов, А.В. Горбунов,

О.И. Окينا, М.В. Фронтасьева // Проблемы биохимии и геохимической экологии. – 2010. – № 1(12). – С. 155–163.

3. Грязнов В.П. Руководство к лабораторным и экспериментальным работам по физиологии растений. – Белгород: БелГУ, 2006. – 120 с.

4. Запрометов М.Н. Фенольные соединения и методы их исследования // Биохимические методы в физиологии растений. – М.: Наука, 1971. – С. 185–197.

5. Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivative stress: a review // Annals of Botany. – 2003. – Vol. 91. – P. 179–194.

6. Heath R.L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation // Arch. Biochem. Biophys. – 1968. – Vol. 125(1). – P. 189–198.

7. Kumar G.N., Knowles N.R. Changes in Lipid Peroxidation and Lipolytic and Free-Radical Scavenging Enzyme during Aging and Sprouting of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Seed-Tubers // Plant Physiol. – 1993. – Vol. 102. – P. 115–124.

8. Lichtentaller H.K., Welburn A.R. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents // Biochem. Soc. Trans. – 1983. – Vol. 11, № 6. – P. 591–592.

9. Prasad K.V.S.K., Saradhi P. P., Sharmila P. Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in *Brassica juncea* // Environmen. and Experimen. Botany. – 1999. – Vol. 42. – P. 1–10.

10. Scandalios J.G. The rise of ROS // Trends Biochem. Sci. – 2002. – Vol. 27. – P. 483–486.

### Рецензенты:

Кособрухов А.А., д.б.н., с.н.с., руководитель группы экологии и физиологии фототрофных организмов, г. Пушкино;

Субботина Т.И., д.м.н., профессор, зав. кафедрой медико-биологических дисциплин ТулГУ медицинского института, г. Тула.

Работа поступила в редакцию 04.05.2011.