

## Вміст вільного проліну та активність антиоксидантного захисту у мохоподібних за стресових умов

ОКСАНА ВАСИЛІВНА ЛОБАЧЕВСЬКА

LOBACHEVSKA O.V. 2008: **Content of free proline and activity of antioxidant protection in mosses under stress conditions.** *Chornomors'k. bot. z.*, vol. 4., №2: 230-236

The effect of heavy metals  $Zn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  and  $Ni^{2+}$  on free proline content and superoxide dismutase activity in mosses *Hylocomium splendens*, *Pleurozium schreberi* and *Rhytidiadelphus squarrosus*. The effect of  $Cu^{2+}$  and  $Cr^{6+}$ , low and high temperatures and osmotic stress in relation to proline content and catalase activity were estimated in liverwort *Marchantia polymorpha*. It was found that proline accumulation was more pronounced under high temperatures and osmotic stress than in the presence of heavy metals. It is concluded that in tolerant species stress conditions may enhance protective processes such as accumulation of free proline and increase in the activities of detoxifying enzymes superoxide dismutase and catalase.

*Key words: heavy metals, osmotic stress, PEG-6000, temperature, content of free proline, activity of superoxide dismutase, catalase, mosses Hylocomium splendens, Pleurozium schreberi and Rhytidiadelphus squarrosus, liverwort Marchantia polymorpha.*

ЛОБАЧЕВСЬКА О.В. 2008: **Вміст вільного проліну та активність антиоксидантного захисту у мохоподібних за стресових умов.** *Чорноморськ. бот. ж.*, т. 4, №2: 230-236.

Досліджено вплив важких металів  $Zn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  і  $Ni^{2+}$  на вміст вільного проліну та активність супероксиддисмутази у мохів *Hylocomium splendens*, *Pleurozium schreberi* і *Rhytidiadelphus squarrosus*. Визначено вплив  $Cu^{2+}$  і  $Cr^{6+}$ , низької й високої температур та осмотичного стресу на вміст вільного проліну та активність каталази у печіночника *Marchantia polymorpha*. Виявлено, що акумуляція проліну значно посилюється під впливом високих температур та осмотичного стресу, ніж за присутності важких металів. Зроблено висновок, що в толерантніших видів стресові умови можуть підвищувати захисні процеси, а саме акумуляцію вільного проліну та активацію детоксикаційних ферментів супероксиддисмутази й каталази.

*Ключові слова: важкі метали, осмотичний стрес, ПЕГ-6000, температура, вміст проліну, активність супероксиддисмутази, каталази, мохи Hylocomium splendens, Pleurozium schreberi і Rhytidiadelphus squarrosus, печіночник Marchantia polymorpha.*

У відповідь на дію стресових факторів різноманітної природи клітини вищих рослин можуть акумулювати осмотично активні амінокислоти. До амінокислот, які відіграють важливу роль у стійкості рослин до стресу, належить пролін [KAVI KISHOR et al., 2005]. Вільний пролін – найпоширеніший осмоліт, який акумулюється не лише вищими рослинами, а й бактеріями, водоростями, найпростішими [БРИТИКОВ, 1975]; як складова білка, це – постійний компонент рослинних клітин [ШЕВЯКОВА, 1983].

Щодо зв'язку між рівнем акумуляції проліну та стійкістю рослин до стресів, літературні відомості неоднозначні [КОЛУПАЄВ, 1995; 2001]: розрізняють дію у фазі помірному стресу, коли ця амінокислота нагромаджується в межах фізіологічної норми, і в фазі незворотних пошкоджень, коли її кількість може досягати токсичного порогу. В результаті адаптації рослин вміст внутрішньоклітинного проліну зменшується [КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ..., 2003]. Це свідчить про те, що сам пролін, напевно, не є медіатором пошкоджень [СУН и др., 2005].

В останні роки отримані принципово нові дані про біологічну роль проліну [КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ..., 2003], згідно з якими пролін дестабілізує подвійну спіраль ДНК, знижуючи температуру її плавлення та підвищуючи чутливість до нуклеази. Цей ефект проліну може мати істотне значення у виживанні організму за дії стресу, регулюючи активність генетичного апарату, полегшує процеси реплікації, транскрипції і, як припускають [КУЗНЕЦОВ, ШЕВЯКОВА, 1989], репарації ДНК. Крім стабілізуючого впливу на структуру макромолекул, пролін проявляє антиоксидантну активність [PANDA, KHAN, 2004; PANDA, CHOUDHURY, 2005; SHARMA, DIETZ, 2006], інактивує гідроксильні радикали, які індуються під впливом стресових факторів і сповільнюють транспорт електронів в хлоропластах та мітохондріях.

На думку багатьох авторів [BOWLER et al., 1992; КОЛУПАЕВ, 2001; KAVI KISHOR et al., 2005], акумуляція проліну в клітинах у відповідь на дію стресових факторів пов'язана з його синтезом *de novo*. Синтез проліну, очевидно, регулюється як на трансляційному, так і транскрипційному рівнях, значення яких може змінюватися залежно від природи та тривалості дії стресового чинника. Нагромадження проліну під впливом стресу внаслідок синтезу, напевно, найважливіший спосіб, але не єдиний. У літературі багатьма авторами [КОЛУПАЕВ, 2001; KAVI KISHOR et al., 2005] пропонується розрізняти пролін “синтетичного походження” за умов помірного стресу та пролін, який утворюється в результаті активації протеаз та деградації білків і є ознакою жорсткого стресу. Крім того, відзначено [ДМИТРИЕВ, 2003], що акумуляція проліну сприяє підвищенню стійкості організму до дії несприятливих факторів, проте спричиняє зниження осмотичного і водного потенціалів, а також збільшення водоутримуючої здатності клітин, що призводить до гальмування росту тканин та рослини в цілому [ФРАНКО, МЕЛО, 2000]. Але це не означає, що він не причетний до реалізації адаптивних реакцій. Підтвердженням цього є мутантні клітинні лінії і трансгенні рослини, які інтенсивно акумулюють пролін та мають підвищену стійкість до стресових факторів. У зв'язку з пошуком суперпродукцентних генів вільного проліну толерантні до водного дефіциту, осмотичного шоку та засолення мохи привертають увагу багатьох дослідників.

З огляду на дискусійний характер свідчень про протекторно-адаптаційну роль низькомолекулярних сполук нашою метою було дослідження зміни вмісту вільного проліну й активності ферментів антиоксидантного захисту у мохоподібних на дію різних стресових чинників.

### Матеріали та методи дослідження

Вплив важких металів  $Zn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  і  $Ni^{2+}$  ( $ZnSO_4$ ,  $PbCl_2$  та  $NiSO_4 \cdot 7H_2O$  концентраціями 1, 10 і 100 мкМ) на вміст вільного проліну й активність ферменту антиоксидантного захисту – супероксиддисмутази (СОД) досліджували у мохів *Hylocomium splendens* (Hedw.) Schimp., *Pleurozium schreberi* (Willd. ex Brid.) Mitt. та *Rhytidiadelphus squarrosus* (Hedw.) Warnst. на 2, 4 і 8 добу.

Особливості акумуляції вільного проліну у *Marchantia polymorpha* Hedw. визначали під впливом 0,1; 1; 10; 100 мкМ розчинів  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  і  $K_2Cr_2O_7$ . Для з'ясування впливу осмотичного шоку слань печіночника занурювали в 5, 10, 20 і 30 % розчин поліетиленгліколю (ПЕГ-6000). Контрольні рослини витримували в чашках Петрі на розчині Кнопу без додавання солей важких металів та ПЕГ. Холодовий та тепловий шок створювали, витримуючи рослини у ванні термостату за 4, 35 і 40° С. Рослини, які інкубували в розчині Кнопу за кімнатної температури (23°С), слугували контролем. Зміну вмісту вільного проліну аналізували на 2, 4, 6 годину.

Пролін екстрагували та визначали за методикою Бейтса з співробітниками [BATES et al., 1973]. Зразки гомогенізували в 3 % сульфосаліциловій кислоті. Гомогенат суспензували 5 хв. До 1 мл супернатанту додавали 1 мл льодяної оцтової кислоти і 1 мл нінгідринового реагента (нінгідрин, льодяна оцтова кислота і 6 М фосфорна кислота), який готували перед дослідом. Суміш ретельно перемішували та інкубували на

кип'ячій водянній бані 1 год. Реакцію припиняли внаслідок охолодження проб у льодяній бані. У реакційну суміш додавали 2 мл толуолу та енергійно змішували. Після 30 сек. відстоювання відбирали верхній шар і фотометрували за довжини хвилі 520 нм. Вміст проліну визначали за калібрувальною кривою, побудованою з використанням стандартних водних розчинів амінокислоти з концентрацією 0,005 – 0,1 мг/2 мл розчину.

Для визначення активності СОД гаметофори мохів гомогенізували в 0,15 М фосфатному буфері рН=7,8 і після 30 хв. інкубації за кімнатної температури центрифугували. До супернатанту додавали інкубаційну суміш (ЕДТА, нітросиній тетразолій, феназинметасульфат, НАДФН). Активність фермента визначали спектрофотометрично за довжини хвилі 540 нм та виражали в умовних одиницях на мг білка за хв. [ЧВАРИ и др., 1991]. Концентрацію білка визначали за методом Бредфорда [BREFORD, 1976].

Для екстракції каталази зразки гаметофорів гомогенізували в 0,05 М трис-НСІ буфері рН=7,8. Екстракт центрифугували 15 хв. за 5000 г. Активність фермента визначали спектрофотометрично у супернатанті після 10 хв. реакції з 4 % розчином молібдату амонію за довжини хвилі 410 нм та виражали в мкат/л [КОРОЛЮК и др., 1986].

Усі досліди проводили не менше 3-5 раз, отримані дані опрацьовували методами статистичного аналізу [ПЛОХИНСКИЙ, 1970].

### Результати дослідження та їх обговорення

Відомо, що рослини утворюють активні форми кисню під впливом всіх без винятку стресових факторів. У відповідь на дію стресу відбувається активація різних систем захисту, спрямованих на підтримку гомеостазу. Ключові функції організму забезпечують окисно-відновні реакції, нормальний перебіг яких забезпечується великою групою ферментів: супероксиддисмутазою (СОД), каталазою, пероксидазами та трансферазами. Ферментативні антиоксиданти, на відміну від низькомолекулярних (проліну, аскорбінової кислоти, глутатіону, каротиноїдів,  $\alpha$ -токоферолу), характеризуються високою специфічністю дії до певних форм кисню [БАРАБОЙ, 1991].

За результатами досліджень з'ясовано, що проаналізовані мохи (*Hylocomium splendens*, *Pleurozium schreberi*, *Rhytidiadelphus squarrosus*) та печіночник *Marchantia polymorpha* у нормі характеризуються невисоким вмістом проліну (Табл. 1, 2).

У *Pleurozium schreberi* вміст проліну хоч і зростав з підвищенням концентрації  $\text{Ni}^{2+}$  (Табл. 1), проте й через 8 діб на високій концентрації 100,0 мкМ не досягав рівня контролю (0,43 мкМ/г порівняно з 0,55 мкМ/г у контролі). З підвищенням концентрації іонів свинцю у середовищі вміст проліну в пагонах знижувався, тоді як під впливом іонів цинку не відзначено істотних різниць між вмістом вільного проліну у дослідних пробах.

Під впливом важких металів активність СОД у *Pleurozium schreberi* знижувалася, порівняно з контролем. Лише на помірних (10,0 мкМ) концентраціях усіх іонів металів активність ферменту була дещо вищою. На 8 добу найвищий рівень активності СОД був відзначений у дослідях з  $\text{Ni}^{2+}$  (163 – 215 відн. од.  $\cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ ), а найнижчий (105 – 175 відн. од.  $\cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ ) – за наявності у середовищі  $\text{Zn}^{2+}$ .

У *Hylocomium splendens* іони цинку та свинцю індукували пропорційне зростання вмісту вільного проліну (Табл. 1), на високих концентраціях цих іонів металів вміст амінокислоти у 2,0 – 2,2 рази перевищував контрольні показники. За наявності нікелю у середовищі лише під впливом найнижчої концентрації (1,0 мкМ)  $\text{Ni}^{2+}$  в 1,3 рази відзначено зростання кількості проліну в пагонах, на вищих концентраціях іонів металу його кількість різко знижувалася. Встановлено досить високу активність СОД у *Hylocomium splendens* на низьких концентраціях усіх досліджених металів, особливо 1,0 мкМ  $\text{Ni}^{2+}$ , яка неістотно знижувалася з підвищенням їх вмісту у середовищі.

Таблиця 1.

Вплив важких металів на вміст вільного проліну та активність супероксиддисмутази в пагонах мохів

Table 1.

The effect of heavy metals on free proline content and activity of superoxide dismutase in shoots of mosses

Показники		Тривалість інкубації, доби					
		2		4		8	
		Вміст проліну, мкМ/г	Активність СОД, відн.од./мг білка/хв	Вміст проліну, мкМ/г	Активність СОД, відн.од./мг білка/хв	Вміст проліну, мкМ/г	Активність СОД, відн.од./мг білка/хв.
<i>Pleurozium schreberi</i>							
Концентрація металу, мкМ	0	0,56 ± 0,03	321,7 ± 0,5	0,59 ± 0,09	318,0 ± 0,7	0,55 ± 0,09	311,9 ± 0,9
Ni <sup>2+</sup>	1	0,35 ± 0,05	150,7 ± 0,3	0,24 ± 0,04	143,8 ± 0,3	0,18 ± 0,07	163,0 ± 0,6
	10	0,40 ± 0,03	206,3 ± 0,8	0,32 ± 0,03	204,1 ± 0,3	0,29 ± 0,03	215,4 ± 0,7
	100	0,40 ± 0,06	200,8 ± 0,7	0,40 ± 0,07	189,5 ± 0,7	0,43 ± 0,06	202,2 ± 0,4
Pb <sup>2+</sup>	1	0,40 ± 0,07	120,9 ± 0,6	0,43 ± 0,09	122,7 ± 0,9	0,45 ± 0,05	125,1 ± 0,7
	10	0,37 ± 0,08	151,5 ± 0,6	0,33 ± 0,03	139,7 ± 0,8	0,34 ± 0,03	177,5 ± 0,7
	100	0,29 ± 0,05	127,0 ± 0,4	0,20 ± 0,03	130,0 ± 0,8	0,15 ± 0,03	143,4 ± 0,9
Zn <sup>2+</sup>	1	0,26 ± 0,03	100,8 ± 0,3	0,20 ± 0,05	102,8 ± 0,4	0,21 ± 0,03	105,2 ± 0,6
	10	0,30 ± 0,03	151,1 ± 0,3	0,24 ± 0,08	159,2 ± 0,7	0,33 ± 0,05	175,5 ± 0,5
	100	0,25 ± 0,07	143,6 ± 0,9	0,21 ± 0,05	150,1 ± 0,5	0,24 ± 0,09	159,8 ± 0,5
<i>Hylocomium splendens</i>							
Контроль	0	0,32 ± 0,09	274,1 ± 0,3	0,36 ± 0,03	270,8 ± 0,9	0,36 ± 0,09	265,9 ± 0,5
Ni <sup>2+</sup>	1	0,44 ± 0,06	280,5 ± 0,2	0,40 ± 0,05	272,7 ± 0,7	0,45 ± 0,07	273,0 ± 0,5*
	10	0,38 ± 0,06	272,2 ± 0,3	0,27 ± 0,09	264,6 ± 0,7	0,16 ± 0,08	262,2 ± 0,3
	100	0,22 ± 0,05	260,9 ± 0,3	0,15 ± 0,07	259,0 ± 0,3	0,35 ± 0,05	255,2 ± 0,7
Pb <sup>2+</sup>	1	0,30 ± 0,09	269,3 ± 0,9	0,33 ± 0,05	269,4 ± 0,5	0,34 ± 0,04	265,3 ± 0,6
	10	0,39 ± 0,03	261,2 ± 0,5	0,49 ± 0,03*	260,7 ± 0,5	0,38 ± 0,08	254,0 ± 0,6
	100	0,55 ± 0,03	243,2 ± 0,6	0,61 ± 0,04*	251,0 ± 0,9	0,79 ± 0,08	240,8 ± 0,4
Zn <sup>2+</sup>	1	0,36 ± 0,09	256,0 ± 0,7	0,30 ± 0,09	240,8 ± 0,8	0,34 ± 0,05	218,9 ± 0,2
	10	0,60 ± 0,09	260,7 ± 0,4	0,44 ± 0,09	255,4 ± 0,8	0,43 ± 0,09	273,3 ± 0,1*
	100	0,54 ± 0,06	262,4 ± 0,5	0,63 ± 0,07	251,3 ± 0,9	0,71 ± 0,09	262,0 ± 0,7
<i>Rhytidiadelphus squarrosus</i>							
Контроль	0	0,38 ± 0,04	451,9 ± 0,7	0,37 ± 0,07	455,1 ± 0,3	0,35 ± 0,05	450,0 ± 0,8
Ni <sup>2+</sup>	1	0,40 ± 0,05	450,0 ± 0,8	0,51 ± 0,08	450,0 ± 0,8	0,54 ± 0,07	465,0 ± 0,3*
	10	0,42 ± 0,09	457,6 ± 0,8*	0,33 ± 0,08	457,1 ± 0,8	0,28 ± 0,05	488,1 ± 0,3*
	100	0,21 ± 0,09	442,3 ± 0,9	0,32 ± 0,05	442,3 ± 0,9	0,43 ± 0,03	431,7 ± 0,5
Pb <sup>2+</sup>	1	0,49 ± 0,06	499,1 ± 0,5*	0,52 ± 0,04	499,0 ± 0,5*	0,50 ± 0,01	492,6 ± 0,7*
	10	0,53 ± 0,07	491,0 ± 0,3*	0,50 ± 0,07	491,8 ± 0,6*	0,48 ± 0,07	495,0 ± 0,8*
	100	0,19 ± 0,03	470,3 ± 0,8*	0,27 ± 0,07	470,6 ± 0,3*	0,32 ± 0,03	478,2 ± 0,2*
Zn <sup>2+</sup>	1	0,34 ± 0,04	487,5 ± 0,6*	0,38 ± 0,05	487,7 ± 0,8*	0,37 ± 0,04	504,2 ± 0,4*
	10	0,57 ± 0,09	519,6 ± 0,4*	0,50 ± 0,03	519,1 ± 0,4*	0,59 ± 0,09	522,3 ± 0,5*
	100	0,60 ± 0,08	476,2 ± 0,9*	0,59 ± 0,06	476,3 ± 0,3*	0,69 ± 0,07*	484,7 ± 0,5*

Примітка: \* – різниця порівняно до контролю статистично достовірна при p<0,05.

Істотне зростання (в 1,5 рази) концентрації проліну у клітинах виявлено під впливом 1,0 мкМ розчину Ni<sup>2+</sup> і Pb<sup>2+</sup> та в 1,7–2,0 рази на високих концентраціях Zn<sup>2+</sup> – для *Rhytidiadelphus squarrosus*, у якого відзначено і найвищий рівень активності антиоксидантного захисту СОД (табл. 1). У *Rhytidiadelphus squarrosus* встановлено активацію активності СОД лише під впливом невисоких концентрацій (1,0 і 10,0 мкМ) Zn<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> та Ni<sup>2+</sup>.

У слані печіночника *Marchantia polymorpha* вміст проліну під впливом низьких концентрацій (1,0 мкМ) K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> знижувався, порівняно з контролем. Проте на 10 і 100 мкМ концентраціях металу відзначено незначне зростання вмісту амінокислоти. У дослідях з Cu<sup>2+</sup>, навпаки, вміст проліну істотно знижувався зі збільшенням концентрації металу (Табл. 2).

Каталазна активність у *Marchantia polymorpha* спочатку (через 2 год.) різко знижувалася з підвищенням концентрації іонів хрому та міді, а через 6 год. зростала, особливо під впливом високих концентрацій K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (табл. 2).

Отримані результати можуть свідчити, що під впливом важких металів рівень акумуляції проліну може істотно змінюватися залежно від виду мохів та його адаптивної спроможності. Очевидно, внаслідок стрес-реакцій концентрація внутрішньоклітинного проліну регулюється двома протилежними процесами синтезу та розпаду, реалізація яких забезпечується зміною ферментативної та генної активності акумуляції амінокислоти.

У зв'язку з нез'ясованою поліфункціональністю й можливістю легкого взаємоперетворення низькомолекулярних сполук кореляція між стійкістю рослин і рівнем акумуляції проліну не завжди виявляється із-за складних взаємозв'язків цих процесів на рівні організму. Мінливість вмісту вільного проліну у клітинах проаналізованих видів можна тлумачити як свідчення його протекторно-адаптаційної ролі або ж як результат деструктивних процесів, що супроводжують стрес. Окрім цього, пролін може використовуватися як джерело енергії та відновних еквівалентів, з чим, мабуть, пов'язане зниження його вмісту у клітинах під впливом важких металів.

Із літературних джерел відомо [Коршиков, 2001], що стійкість організму до несприятливих факторів прямо корелює із підвищеним рівнем активності компонентів антиоксидантної системи захисту. У стрес-реакціях резистентних видів відбувається підвищення активності СОД, каталази і пероксидази, тобто у них ефективніші захисні антиоксидантні механізми, які гальмують та запобігають паталогічним змінам клітин, тоді як нестійкі характеризуються лише незначним підвищенням ферментативної активності або навіть її зниженням. Слід відзначити, що клітинні системи, які забезпечують детоксикацію активних форм кисню, характеризуються високою пластичністю в умовах зміни факторів природного середовища і тому їх вважають основними факторами фенотипної адаптації рослин.

Таблиця 2.

Вплив іонів хрому і міді, ПЕГ-6000 та температури на вміст вільного проліну та активність каталази у слані печіночника *Marchantia polymorpha*

Table 2.

The effect of chromium, copper, PEG-6000 and temperature on free proline content and activity of catalase in the thallus of liverwort *Marchantia polymorpha*

Фактор впливу		Тривалість інкубації, год.					
		2		4		6	
		Вміст проліну, мкМ/г	Активність каталази, мкат/л	Вміст проліну, мкМ/г	Активність каталази, мкат/л	Вміст проліну, мкМ/г	Активність каталази, мкат/л
Конт- роль	0	0,060 ± 0,003	28,6 ± 0,5	0,061 ± 0,005	29,9 ± 0,9	0,057 ± 0,002	32,6 ± 0,9
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	0,1 мкМ	0,046 ± 0,005	65,3 ± 0,6*	0,045 ± 0,003	23,9 ± 0,5	0,047 ± 0,003	38,6 ± 0,8*
	1 мкМ	0,048 ± 0,006	69,3 ± 0,9*	0,041 ± 0,006	31,9 ± 0,3	0,045 ± 0,007	73,3 ± 0,9*
	10 мкМ	0,050 ± 0,003	45,3 ± 0,7*	0,048 ± 0,008	69,3 ± 0,3*	0,019 ± 0,009	55,9 ± 0,3*
	100 мкМ	0,050 ± 0,009	19,9 ± 0,3	0,044 ± 0,009	57,3 ± 0,6*	0,040 ± 0,007	69,3 ± 0,6*
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,1 мкМ	0,054 ± 0,003	58,6 ± 0,4*	0,037 ± 0,004	42,6 ± 0,4*	0,050 ± 0,003	42,6 ± 0,5*
	1 мкМ	0,050 ± 0,003	71,9 ± 0,6*	0,047 ± 0,004	51,9 ± 0,7*	0,045 ± 0,004	42,6 ± 0,3*
	10 мкМ	0,047 ± 0,004	49,3 ± 0,3*	0,039 ± 0,003	30,9 ± 0,9	0,044 ± 0,003	62,6 ± 0,4*
	100 мкМ	0,044 ± 0,009	9,2 ± 0,3	0,004 ± 0,009	27,9 ± 0,3	0,036 ± 0,008	33,3 ± 0,7*
ПЕГ-6000	5 %	0,13 ± 0,07	32,1 ± 0,5*	0,17 ± 0,03*	37,4 ± 0,4*	0,12 ± 0,09	38,1 ± 0,5*
	10 %	0,17 ± 0,03	47,0 ± 0,3*	0,12 ± 0,03	52,5 ± 0,4*	0,17 ± 0,07	50,9 ± 0,7*
	20 %	0,17 ± 0,05	45,6 ± 0,7*	0,22 ± 0,07	65,1 ± 0,9*	0,12 ± 0,07	67,3 ± 0,8*
	30 %	0,22 ± 0,08	67,3 ± 0,8*	0,22 ± 0,09	71,1 ± 0,6*	0,36 ± 0,03	79,5 ± 0,4*
Темпе- ратура	4° С	0,26 ± 0,03	28,0 ± 0,3	0,26 ± 0,05*	29,9 ± 0,3	0,31 ± 0,05	33,8 ± 0,5
	23° С	0,19 ± 0,04	28,6 ± 0,5	0,20 ± 0,03*	30,7 ± 0,5	0,20 ± 0,08	34,3 ± 0,3
	35° С	0,12 ± 0,03	52,2 ± 0,5*	0,26 ± 0,09	55,3 ± 0,7*	0,49 ± 0,09	60,7 ± 0,3*
	40° С	0,41 ± 0,03	67,5 ± 0,7*	0,26 ± 0,09	63,3 ± 0,9*	0,31 ± 0,05	57,8 ± 0,9*

Примітка: \* – різниця порівняно до контролю статистично достовірна при  $p < 0,05$

Протягом інкубації зразків у середовищах з різними концентраціями важких металів рівень активності антиоксидантних ферментів у проаналізованих видів мохоподібних змінювався. Це свідчить про адаптивну природу досліджуваних ферментів до стресового стану, який виникає у клітинах у результаті нагромадження перекису водню – інгібітора СОД й активатора каталази. Антиоксидантна активність СОД і каталази в екстремальних умовах змінювалася по-різному: в одних випадках вона активувалася, в інших – інгібувалася, що залежало від сили дії металу та рівня чутливості організму моху.

На підставі отриманих результатів щодо підвищення рівня внутрішньоклітинного проліну та активності антиоксидантних ферментів можна стверджувати, що з проаналізованих мохів *Rhytidiadelphus squarrosus* і *Hylocomium splendens* виявилися стійкішими до впливу цинку та свинцю, крім того для *Rhytidiadelphus squarrosus* встановлено підвищення активності СОД на невисоких концентраціях досліджених іонів металів.

У *Marchantia polymorpha* акумуляція проліну посилювалася під впливом осмотичного шоку, істотне підвищення вмісту амінокислоти виявлено під дією 30% ПЕГ: за 6 год. вміст проліну зростав у 6 разів (0,36 мкМ/г порівняно з 0,06 мкМ/г у контролі). Вміст амінокислоти в інтервалі 23 – 40° С змінювався залежно від часового діапазону й інтенсивності прогрівання. Максимальну акумуляцію проліну (0,41 мкМ/г) встановлено у разі прогрівання до 40° вже через 2 год. У досліді з 35° С найвищий вміст амінокислоти (0,49 мкМ/г) було виявлено лише після 6 год. Під впливом 4° С вміст вільного проліну протягом 6 год. не змінювався, тобто його акумуляція відбувалася набагато повільніше за низької температури, ніж за високих.

Отже, в екстремальних умовах температурного й осмотичного шоку, які ініціюють зниження водного потенціалу клітин, встановлено істотне підвищення акумуляції проліну. Таким чином, отримані результати підтверджують ключову роль проліну в осморегуляторному механізмі завдяки високій здатності розчинятися й утворювати на поверхні білкових молекул гідрофільні колоїди, які збільшують об'єм цитоплазми та утримують клітинний гомеостаз, а також запобігають денатурації та зниженню активності основних ферментних систем.

### Висновки

Отримані дані свідчать про те, що нагромадження проліну в клітинах мохоподібних має переважно неспецифічний характер і є, напевно, складовою загальних клітинних захисних систем, функціонування яких проявляється на етапі первинної стрес-реакції. Роль проліну в розвитку толерантності мохоподібних може змінюватися залежно від фази адаптивної реакції, природи, інтенсивності та тривалості дії фактора. Незважаючи на неспецифічність нагромадження проліну рослинами у відповідь на стрес, існують значні відмінності у здатності нагромаджувати пролін у різних видів мохів у випадку одного й того стресового навантаження і в одного виду за неоднакових типів стресу. Це може свідчити про генетично детерміновану норму реакції на стрес у різних видів і відмінності в конкретних механізмах забезпечення підвищеної акумуляції проліну.

### Список літератури

- БАРАБОЙ В.А. Механизмы стресса и перекисное окисление липидов // Успехи соврем. биологии. – 1991. – Т. 111. – С. 923-931.
- БРИТИКОВ Е. А. Биологическая роль пролина. – М.: Наука, 1975. – 88 с.
- ДМИТРИЕВ А.П. Сигнальные молекулы растений для активации защитных реакций в ответ на биотический стресс // Физиология растений. – 2003. – Т. 50, №3. – С. 465-474.
- КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ адаптации растений к неблагоприятным воздействиям экологических факторов в естественных условиях // Под ред. Е.Л. Кордюм. – К.: Наукова думка, 2003. – 277 с.

- КОЛУПАЄВ Ю.С. Низькомолекулярні сполуки азоту в рослинах за умов стресів: особливості метаболізму та можливе фізіологічне значення // Физиология и биохимия культ. растений – 1995. – Т. 27, № 5-6. – С. 324–335.
- КОЛУПАЄВ Ю.Е. Стресові реакції рослин (молекулярно-клітинний рівень). – Харків: Харків. держ. аграр. ун-т., 2001. – 173 с.
- КОРОЛЮК М.А., ИВАНОВА Л.И., МАЙОРОВА И.Г., ТОКАРЕВ В.Е. Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. – 1986. – № 1. – С. 16-20.
- КОРШИКОВ И.И. Адаптация растений к условиям техногенно загрязненной среды. – К.: Наук. думка. – 1996. – 238 с.
- КУЗНЕЦОВ ВЛ.В., ШЕВЯКОВА Н.И. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция // Физиология растений. – 1999. – Т. 46, № 2. – С. 321-336.
- ПЛОХИНСКИЙ Н.А. Биометрия. – М.: Изд-во МГУ, 1970. – 367 с.
- СУН С.К., ЛЕН Е.Б., ТЯН К.Р. Метаболизм пролина и перекрестная устойчивость к засолению и тепловому стрессу у прорастающих семян пшеницы // Физиология растений. – 2005. – Т. 52, № 6. – С. 897-904.
- ФРАНКО О.Л., МЕЛО Ф.Р. Осмопротекторы: ответ растений на осмотический стресс // Физиология растений. – 2000. – Т. 47, № 1. – С. 152-159.
- ЧВАРИ С., АНДЯЛ Т., ШТРЕНГЕР Я. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте // Лабораторное дело. – 1991. – № 3. – С. 95-99.
- ШЕВЯКОВА Н.И. Метаболизм и физиологическая роль пролина в растениях при водном и солевом стрессе // Физиология растений. – 1983. – Т. 30, вып. 4. – С. 768-783.
- BATES L.S., WALDEN R.P., TEAR G.D. Rapid Determination of Free Proline for Water Stress Studies // Plant Soil. – 1973. – Vol. 39. – P. 205-210.
- BOWLER C., MONTAGU M.V., INZE D. Superoxide dismutase and stress tolerance // Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol. – 1992. – Vol. 43. – P. 83-116.
- BREDFORD W. A simple method for protein test // Annal. Biochem. – 1976. – № 72. – P. 248-252.
- KAVI KISHOR P.B., SANGAM S., AMRUTHA R.N., SRI LAXMI P., NAIDU K.R., RAO K.R.S.S., RAO SREENATH, REDDY K.J., THERIAPPAN P., SREENIVASULU N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance // Current Science. – 2005. – Vol. 88, № 3. – P. 424-435.
- PANDA S K., CHOUDHURY S. Changes in nitrate reductase activity and oxidative stress response in the moss *Polytrichum commune* subjected to chromium, copper and zinc phytotoxicity // Braz. J. Plant Physiol. – 2005. – Vol. 17, № 2. – P. 191-197.
- PANDA S K., KHAN M.H. Changes in growth and superoxide dismutase activity in *Hydrilla verticillata* L. under abiotic stress // Braz. J. Plant Physiol. – 2004. – Vol. 16, № 2. – P. 115-118.
- SHARMA S. SHANTI, DIETZ KARL-JOSEF The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress // Journal of Experimental Botany. – 2006. – Vol. 57, № 4. – P. 711-726.

Рекомендує до друку  
А.П. Орлюк

Отримано 14.07.2008 р.

Адреса автора:

О.В. Лобачевська  
Институт екології Карпат  
НАН України,  
вул. Стефаника, 11  
м. Львів, 79000  
Україна  
e-mail: [morphogenesis@mail.lviv.ua](mailto:morphogenesis@mail.lviv.ua)

Author's address:

O.V.Lobachevska  
Institute of Ecology of the Carpathians  
National Academy of Sciences of Ukraine  
11, Stefanyka Str.  
Lviv, 79000  
Ukraine  
e-mail: [morphogenesis@mail.lviv.ua](mailto:morphogenesis@mail.lviv.ua)