

УДК 577.152: 582.736

О. Ф. Чечуй

**ВПЛИВ ІОНІВ КОБАЛЬТУ НА ФЕРМЕНТАТИВНУ АКТИВНІСТЬ
ІЗОЦИТРАТЛІАЗИ ТА ЇЇ РЕГУЛЯЦІЯ ПРИ ПРОРАСТАННІ НАСІННЯ
GLYCINE MAX L.**

Харківський національний педагогічний університет імені Г.С. Сковороди

Досліджено активність ізоцитратліази в насінні *Glycine max* L. на першу, третю, п'яту та сьому добу проростання, а також вплив іонів кобальту на активність ферменту у зазначені терміни експерименту. Доведено збільшення активності ізоцитратліази за дії іонів кобальту на третю добу експерименту зі зберіганням показників ферментативної активності на п'яту добу; однією з причин підвищення активності ключового ферменту гліоксилатного циклу під впливом іонів кобальту може бути збільшення вмісту перекисного окиснення ліпідів. Крім того, в експериментах з використанням актиномицину *D* показано, що підвищення активності ізоцитратліази за дії іонів кобальту відбувається шляхом індукції ферменту.

Ключові слова: *Glycine max* L., ізоцитратліаза, актиномицин *D*, ліпіди, гліоксилатний цикл

Е. Ф. Чечуй

**ВЛИЯНИЕ ИОНОВ КОБАЛЬТА НА ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ
ИЗОЦИТРАТЛИАЗЫ И ЕЕ РЕГУЛЯЦИЯ ПРИ ПРОРАСТАНИИ СЕМЯН
GLYCINE MAX L.**

*Харьковский национальный педагогический университет имени Г. С.
Сковороды*

Исследовали активность изоцитратлиазы в семенах *Glycine max* L. на первые, третьи и пятые сутки прорастания, а также влияние ионов кобальта на активность фермента в данные сроки эксперимента. Доказано увеличение активности исоцитратлиазы под влиянием ионов кобальта на третьи сутки эксперимента с сохранением показателей ферментативной активности на пятые сутки; одной из причин увеличения активности ключевого фермента глиоксилатного цикла под влиянием ионов кобальта может быть повышение содержания перекисного окисления липидов. Кроме того, в экспериментах с использованием актиномицина *D* показано, что повышение активности исоцитратлиазы под влиянием ионов кобальта осуществляется путем индукции фермента.

Ключевые слова: *Glycine max* L., исоцитратлиаза, актиномицин *D*, липиды, глиоксилатный цикл

O. F. Chechui

**INFLUENCE OF COBALT IONS ON ENZYME ACTIVITY OF ISOCITRIATE LYASE
AND ITS REGULATION IN CONDITION OF SEED GERMINATION OF GLYCINE
MAX L.**

H. S. Skovoroda Kharkiv National Pedagogical University



We investigated the activity of isocitrate lyase in seeds of *Glycine max* L. after 24, 72, and 120 hours of germination and effect of cobalt ions on the activity of the enzyme in time limit of the experiment. We fixed the increase in the activity of isocitrate lyase under influence of cobalt ions occurs by means of enzyme induction on third day of experiment while maintaining performance of enzyme activity on the fifth day; one of the reasons caused the increased activity of the key enzyme of the glyoxylate cycle under the influence of cobalt ions can be increasing of the concentration of lipid peroxidation. In addition, during experiments with usage of actinomycin D we determined the increasing of activity of isocitrate lyase under the influence of cobalt ions by enzyme induction.

Key words: Glycine max L., isocitrate lyase, actinomycin D, lipids, glyoxylate cycle

Гліоксилатний цикл є скороченим циклом трикарбонових кислот і ланкою процесу глюконеогенезу, що функціонує у олійних рослин на ранніх стадіях проростання насіння. Ізоцитратліаза (трео-Ds-ізоцитрат-гліоксилатліаза, КФ 4.1.3.1) є ключовим ферментом гліоксилатного циклу, який каталізує реакцію альдольного розщеплення ізоцитрату на сукцинат та гліоксилат (Красильнікова, 2007). Для вивчення механізмів регуляції ферментів гліоксилатного циклу у даній роботі використана модельна система – насіння *Glycine max* L. в умовах проростання.

Внаслідок розширення сфери господарської діяльності й збільшення антропогенного тиску спостерігається значне забруднення довкілля речовинами техногенного походження. Серед найбільш вагомих забруднювачів довкілля є іони важких металів (Трахтенберг, 1994). Есенціальні елементи, зокрема кобальт, в оптимальних концентраціях відіграють важливу роль як кофактори ферментативних реакцій, але у разі надлишкової їх кількості можуть завдавати шкоди рослинному організму (Гуральчук, 2006).

Glycine max L. широко використовується як кормова, харчова та технічна культура. Біосинтез вуглеводів, необхідних для утворення біомаси олійних рослин, залежить від функціонування ферментів гліоксилатного циклу та глюконеогенезу (Руководство..., 1986). Наявні наукові дані не дають повного уявлення щодо конкретних змін у функціонуванні ключових систем рослин за негативного впливу оточуючого середовища. Зокрема, лишається недостатньо вивченим вплив іонів металів на активність ферментів гліоксилатного циклу. Мета роботи – дослідити регуляцію активності ізоцитратліази в насінні *Glycine max* L. при проростанні та вплив іонів кобальту на фермент.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Насіння зберігали при температурі 23/18 °С (день/ніч відповідно) у чашках Петрі у камерах фітотрону на фільтрувальному папері, змоченому водними розчинами хлоридів кобальту та кадмію. Завдяки наявності системи отворів, у

камерах підтримувався належний газообмін, коливання температур назовні та всередині камер складало 1–2 °С. В експерименті використовували насіння *Glycine max* L., яке було зовні не пошкоджене і однакове за розміром.

Перед тим, як помістити насіння у розчини, проводили зовнішнє знезараження насіння шляхом занурення у розчин NaHCO_3 ($\omega=2,5$) на 2 хвилини, після чого промивали 5 мМ розчином HCl впродовж 20-30 секунд, далі тричі промивали дистильованою водою. Насіння пророщували протягом п'ятьох діб. При аналізі використовували сім'ядолі *Glycine max* L. через одну, три та п'ять діб пророщування, а в експериментах з додаванням АкМ D (актиноміцину D) – через одну, півтори та три доби. Гомогенати з сім'ядолей готували на 50 мМ трис – HCl -буфері рН 7,5, який містив 100 мМ MgCl_2 , 1 мМ ЕДТА та 5 мМ дітіотрейтолу (при дослідженні протеїнової активності використовували 20 мМ MgCl_2 , а дітіотрейтол виключали).

Незруйновані клітини, їх уламки та ядра осаджували при 1300 г протягом 10 хв. Супернатант використовували для одержання фракцій мітохондрій (важких) – 6000 g, а також для одержання фракції мікротілець – при 14000 g протягом 20 хв. Осад, який містив фракцію клітинних органодів (груба фракція мікротілець), руйнували шляхом занурення проб у рідкий нітроген та ресуспендували у 2 мл середовища виділення. Далі проводили повторне центрифугування при 14000 g протягом 15 хв.

В супернатант переходили ферменти, зв'язані з мембранами гліюкисом. З метою досягнення необхідного розміру мікротілець, проводили фільтрацію крізь мембранні фільтри («Millipore», США) з діаметром пор 1,2; 0,8; 0,65 та 0,45 мкм (Грядунова та ін., 1986). Активність ізоцитратліази (КФ 4.1.3.1.) визначали за методом Діксона та Корнберга (Dixon, 1959) на спектрофотометрі при довжині хвилі 324 нм. Середовище інкубації: 50 мМ калій-фосфатний буфер; рН 7,4; при 25 °С, до складу якого входили 5 мМ MgCl_2 ; 1 мМ ЕДТА; 5 мМ дітіотрейтол (ДТТ); 8 мМ D, L-ізоцитрату; 4 мМ фенілгідазин гідрохлориду та ферментна витяжка. Контрольна проба не містила ізоцитрату, а у холостій пробі був відсутній гомогенат. Інкубацію проводили протягом 5 хвилин при температурі 25 °С. Екстинкцію вимірювали через кожну хвилину. За одиницю ферментної активності приймали кількість ферменту, що утворює 1 нмоль гліюксилату за 1 хв. при 25 °С. Коефіцієнт молярної екстинкції фенілгідазонгліюксилату – $1,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Dixon, 1959). Активність ферменту виражали у наномолях (нМоль) фенілгідазингліюксилату за 1 хв на 1 мг білка. Білок визначали за методом Лоурі. Статистичну обробку результатів проводили за допомогою методів варіаційної статистики, достовірність відмінностей між групами розраховували непараметричним методом Манна-Уїтні.



РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз одержаних результатів показав, що активність ізоцитратліази (ІЦЛ) збільшується в контролі в процесі дослідження (табл. 1). Так, на п'яту добу активність ІЦЛ підвищується в середньому в 1,62 рази відносно активності на першу добу. Підвищення активності ІЦЛ в контрольних дослідах узгоджується з даними інших авторів (Shnarrenberger, Martin, 2002).

Таблиця 1. Активність ізоцитратліази при проростанні насіння *Glycine max* L. за дії іонів кобальту (нмоль фенілгідрозонглюксилату /хв. на 1 мг білка; $M \pm m$, $n=5$)

Фактори впливу	Доба пророщування			
	перша	Третя	п'ята	сьома
Контроль	19,6±1,5	22,4±3,0	31,8±1,9 [#]	27,1±1,9 [#]
Кобальт	21,2±1,4	37,2±1,7 ^{**}	32,4±2,1 ^{#*}	31,6±1,8 ^{#*}

Примітки. Тут і в табл. 2: * - $p < 0,05$ – відносно контролю; [#] - $p < 0,05$ – відносно першої доби. В табл. 2 ^{**} - $p < 0,05$ – відносно кобальту

Підвищення ІЦЛ активності в процесі проростання може віддзеркалювати утворення продуктів реакції даного ферменту – глюксилату та малату, які є субстратами для глюконеогенезу, та використання вільних жирних кислот в реакціях глюконеогенезу, оскільки глюксилатний цикл починається з β -окиснення жирних кислот, що відбувається в глюксисомах олійних культур (Красильнікова, 2007). На сьому добу пророщування насіння *Glycine max* L. активність ІЦЛ зменшується на 38% по відношенню до показників на першу добу. За дії іонів кобальту активність ферменту знижується на 49,2% відносно активності ІЦЛ на першу добу проростання *Glycine max* L. та на 19,3% відносно контролю у цей термін експерименту. Активність ІЦЛ може гальмуватися інтермедіатами глюксилатного циклу та циклу трикарбонових кислот за типом конкурентного гальмування (Медведев, 2004). Інгібіторами ІЦЛ можуть бути сукцинат, α -кетоглутарат, фумарат, оксалоацетат, малат, тобто інтермедіати глюксилатного циклу. Інгібуючий ефект цих метаболітів важливий, оскільки глюксилатний цикл має анаплеротичну природу, і ІЦЛ є ключовим ферментом даного шляху. Зниження активності ІЦЛ на останньому терміні експерименту, тобто на сьому добу, може частково бути наслідком мобілізації запасних ліпідів олійних рослин на ранніх термінах проростання насіння *Glycine max* L. (Бездудная, 2005).

Додавання іонів кобальту в поживне середовище не призводило до змін в активності ферменту на першу добу проростання насіння, а на третю добу спостерігалось підвищення активності ІЦЛ, в середньому в 1,66 рази відносно контролю і в 1,74 рази відносно першої доби. На п'яту добу експерименту

активність ІЦД за дії іонів кобальту у *Glycine max* L. знаходилось на рівні третьої доби.

Рівень активності ключових ферментів регулюється різними метаболітами, в тому числі активними формами оксисену АФО (Тарчевский, 1993; Бацманова та ін., 2010). Більш того, необхідно звернути увагу на той факт, що перша реакція β-окиснення жирних кислот в гліоксисомах, на відміну від такої у мітохондріях, каталізується ферментом ацил-КоА-оксидазою з утворенням гідрогену пероксиду (Hayashi, 1989). Тому однією з причин підвищення активності ключового ферменту гліоксилатного циклу в олійних рослинах під впливом іонів Co^{3+} може бути збільшення продуктів ПОД. У нашій попередній роботі показано збільшення вмісту ТБК-активних продуктів у контрольних зразках і за дії іонів Co^{3+} (Чечуй, 2011).

Крім того, одним із механізмів регуляції активності ключових ферментів окремих метаболічних шляхів може бути індукція відповідних ферментів. Тому для з'ясування можливих шляхів підвищення активності ІЦД досліджено вплив інгібітору транскрипції мРНК актиноміцину D (АкМ D) на активність ІЦД за дії іонів Co^{2+} .

Таблиця 2. Вплив актиноміцину D на активність ізоцитратліази при проростанні насіння *Glycine max* L. за дії іонів кобальту (нмоль фенілгідрозонгліоксилату /хв. на 1 мг білка; $M \pm m$, $n=6$)

Термін пророщування	Контроль	$CoCl_2$	$CoCl_2^+$ АкМ D	АкМ D
1 доба	19,4 ± 1,2	21,8 ± 1,3	22,0 ± 1,3	19,1 ± 1,4
1,5 доби	19,7 ± 1,2	24,9 ± 1,1	13,3 ± 0,9*	11,9 ± 1,0*
3 доба	21,8 ± 1,3	36,6 ± 1,5*#	28,1 ± 1,6* ##	20,4 ± 1,3

*див. пояснення до табл. 1

В табл. 2 показано, що дія АкМ D на активність ключового ферменту гліоксилатного циклу ІЦД виявлялась в гальмуванні активності ферменту; це дорівнювало в середньому 1,67 рази у час пророщування насіння *Glycine max* L., в термін півтори доби, а на активність ферменту під час першої та третьої доби не впливало.

Іони Co^{2+} не впливали на активність ІЦД через півтори доби пророщування, а при додаванні в середовище інкубації одночасно йонів Co^{2+} та АкМ D спостерігалось гальмування активності ІЦД, в середньому в 1,48 разів, по відношенню до контролю. В даному випадку гальмування активності ІЦД за сумісної дії йонів Co^{2+} та антибіотика синтезу мРНК через півтори доби після



пророщування насіння відбувалось за рахунок впливу АкМ D на синтез ферменту.

В роботі Hanson (1993) показано, що збільшення рівня активності гліоксисомальних ферментів при проростанні насіння пов'язано із попереднім збільшенням рівня мРНК, що несе інформацію для цих ферментів, і це збільшення передуює підвищенню активності гліоксисомальних ферментів з різницею в одну добу. Тому, отримані нами дані щодо гальмування антибіотиком (актиноміцином D) активності ПЦЛ у термін, в який ще не було достовірного підвищення активності в контролі під впливом йонів кобальту, відносно першої доби вкладаються в загальну картину синтезу ферментів гліоксисом (Hanson, 1993). Але вже на третю добу пророщування насіння, АкМ D не впливав на активність ПЦЛ. Швидше за все, це пояснюється короткочасною дією даного антибіотика на активність ПЦЛ. Іони Co^{2+} підвищують активність ПЦЛ на 3-тю добу проростання в середньому в 1,52 рази відносно контрольних показників та в 1,68 рази по відношенню до показників активності ПЦЛ на першу добу пророщування. На третю добу проростання насіння, при додаванні АкМ D в середовище пророщування одночасно з іонами Co^{2+} спостерігалось зменшення активності ПЦЛ, в середньому на 34 % відносно показників активності ПЦЛ при додаванні іонів Co^{2+} . Оскільки АкМ D не є абсолютним агентом, що діє тільки на рівні транскрипції, його дія може у деякій мірі проявлятися на рівні трансляції. Таким чином, нашими експериментами доведено, що іони Co^{2+} підвищують активність ПЦЛ на рівні експресії гену ПЦЛ.

ВИСНОВКИ

У результаті проведеної роботи показано існування декількох шляхів регуляції активності ключового ферменту гліоксилатного циклу – ізоцитратліази, що виявляється у зміні рівня його активності упродовж першого тижню пророщування *Glycine max* L.

Іони кобальту збільшують активність ізоцитратліази на третю добу проростання зі зберіганням рівню активності ферменту на тому ж рівні на п'яту добу; на сьому добу спостерігається зниження активності ферменту, що обумовлено дією специфічного білкового активатора, який викликає його деградацію.

Підвищення активності ізоцитратліази під дією іонів кобальту є наслідком їх впливу на рівні експресії ферменту.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

Красильнікова Л. О. та ін. Біохімія рослин: навч. посіб. для студ. вищ. навч. закл. – Х.: Вид. група Основа, 2007. – 191 с.

- Трахтенберг И. М. Тяжелые металлы во внешней среде: современные гигиенические и токсикологические аспекты / И. М. Трахтенберг, В. С. Колесников, В. П. Луковенко // – Москва: Наука и техника, 1994. – С. 146 – 178.
- Гуральчук Ж. З. Фітотоксичність важких металів та стійкість рослин до їх дії / Ж. З. Гуральчук. – К.: Логос, 2006. – С. 96 – 107.
- Грядунова Г.П., Козлова Л.М., Литвинова Т.П. / Под ред. Тенцовой А.И. Руководство к практическим занятиям по заводской технологии лекарственных форм. - М.: Медицина, 1986. – 272 с.
- Dixon G. Assay methods of key enzymes of glyoxylate cycle / G. H. Dixon, H. L. Kornberg // J. Biol. Chem. – 1959. – № 1. – P. 3–6.
- Гудвин Т., Мерсер Э. Введение в биохимию растений: В 2 т. / Пер. с англ. – М.: Мир, 1986. – Т. 1. – 368 с.
- Shnarrenberger C. Evolution of the enzymes of the citric acid cycle and the glyoxylate cycle of higher plants / C. Shnarrenberger, W. Martin // Eur. J. Biochem. – 2002. – Vol. 269. – P. 868 – 883
- Медведев С. С. Физиология растений: Учебник // СПб.: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2004. – С. 112 – 163.
- Бездудная (Чечуй) Е. Ф. Динамика липидов в семенах сои при прорастании // Вісник Харків. націонал. ун-ту ім. В. Н. Каразіна. Сер. Біологія – 2005. 1-2, № 709. – С. 22-27.
- Тарчевский И.А. Стресс и катаболизм у растений: 52-е Тимирязевское чтение.- М.: Наука, 1993. – 80 с.
- Адаптивні реакції рослин озимої пшениці різних екотипів за дії пероксиду водню / Л. М. Бацманова, Н.С. Грудіна, В. О. Сторожечко, М. М. Мусієнко // Физиология и биохимия культ. растений. – 2010. – №2. – С. 163 –168.
- Hayashi H. T. Acyl-Coa-oxidase // J. Biol. Chem. – 1989, № 18. – P. 12715 – 12721.
- Чечуй О.Ф. Вміст фенольних сполук в насінні *Glycine max L.* при проростанні за умов оксидативного стресу, спричиненого впливом іонів кобальту та кадмію // Вісник Ужгород. націон. ун-ту. Сер. Біологія. – 2011, вип. 30. – С. 197 – 200.
- Hanson K.R. Development and decline of the glyoxylate cycle enzymes in watermelon seedlings (*Citrullus vulgaris Schrad.*). Effects of D-actinomycin / K. R. Hanson // Z. Pflanzenphysiol. –1993. – № 3. – S. 405 – 414.

REFERENCES

Krasilnikova, L. O. (2007). *Plant Biochemistry: textbook for university students*. Kharkiv:

Osnova Publishing.



- Trachtenberg, I. M., Kolesnikov, V., & Lukovenko, V. P. (1994). *Heavy metals in the environment: the modern hygienic and toxicological aspects*. Moscow: Science and Technology.
- Guralchuk, J. Z. (2006). *Phytotoxicity of heavy metals and plant resistance*. Kiyv: Logos.
- Gryadunova, G. P., Kozlov, L. M., & Litvinova T. P. (1986). *A guide to practical training in industrial technology of formulated products*. Moscow: Medicine.
- Dixon, G. H., & Kornberg, H. L. (1959). Assay methods of key enzymes of glyoxylate cycle. *J. Biol. Chem.*, 1, 3-6.
- Goodwin, T., & Mercer, E. (1986). *Introduction to the biochemistry of plants: 2 volumes*. Academic Press.
- Shnarrenberger, C., & Martin, W. (2002). Evolution of the enzymes of the citric acid cycle and the glyoxylate cycle of higher plants. *Eur. J. Biochem*, (269), 868 - 883
- Medvedev, S. S. (2004). *Plant Physiology: A Textbook*. St. Petersburg: University Press.
- Bezudnaya (Chechuy), E. F. (2005). Dynamics of lipids in soybean seeds during germination. *Proceed. Karazin National Univ. Biological Series*, 1-2(709), 22-27.
- Tarchevsky, I. A. (1993). *Stress and catabolism in plants: 52th Timiryazev Reading*. Moscow: Nauka.
- Batsmanova, L. M., Grudina, N. S., Storozhekno, V. O., & Musienko, M. M. (2010). Adaptive reactions of various ecological forms of fall wheat on action of hydrogen peroxide. *Physiology and Biochemistry of Cultivated Plants*, 2, 163 -168.

Hayashi, N. T. (1989). Acyl-Coa-oxidase. *J. Biol. Chem.*, 8, 12 715 - 12 721.

Chechuy of Vmist phenolic spoluk nasinni in *Glycine max* L. at prorostanni minds for oxidative stress, sprichinenogo vplivom ioniv cobalt that kadmiyu. (2011).

News of Uzhgorod. National University. Biological Series, 30, 197 - 200.

Hanson, K. R. (1993). Development and decline of the glyoxylate cycle enzymes in watermelon seedlinds (*Citrullus vulgaris* Schrad.). Effects of D-actinomycin. *Z. Pflanzenphysiol*, 3, 405 – 414.

Pflanzenphysiol, 3, 405 – 414.

Поступила в редакцию 23.11.2012

Как цитировать:

Чечуй, О. Ф. (2012). Вплив іонів кобальту на ферментативну активність ізоцитратліази та її регуляція при проростанні насіння *Glycine max* L. *Биологический вестник Мелитопольского государственного педагогического университета имени Богдана Хмельницкого*, 3(6), 99-107.

© Чечуй О.Ф., 2012