

УДК 581.132.

## ВПЛИВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА ФОТОСИНТЕЗ

Н.М. ТОПЧІЙ

*Институт ботаніки ім. М.Г. Холодного Національної академії наук України  
01601 Київ, вул. Терещенківська, 2*

Огляд присвячений впливу важких металів на функціонування фотосинтетичного апарату. Наведено дані про неспецифічні та специфічні реакції клітин на металоіндукований стрес. Розглянуто вплив важких металів на пігментний апарат, транспорт електронів, активність ферментів циклу Кальвіна. Найчутливішою ділянкою фотосинтетичного електронтранспортного ланцюга до впливу важких металів є фотосистема II. На підставі результатів експериментів, проведених *in vitro*, встановлено місця дії важких металів з донорного й акцепторного боків фотосистеми II. Дослідженням кінетики реокиснення  $Q_A^-$  доведено, що важкі метали залежно від їх редокс-потенціалу по-різному впливають на перенесення електронів між  $Q_A$  і  $Q_B$ . Більш електронегативні метали ( $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ) інгібують його, більш електропозитивні ( $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ) — прискорюють.

*Ключові слова:* важкі метали, фотосинтез, фотосистема II.

У зв'язку зі збільшенням забруднення навколишнього середовища важкими металами ( $Me^{2+}$ ) вивчення їх впливу на адаптаційні можливості рослин стає дедалі актуальнішим. Джерелом надходження  $Me^{2+}$  в довкілля є господарська діяльність людини: високотемпературні процеси з промисловими викидами (чорна і кольорова металургія, випалювання цементної сировини, згоряння рідкого і твердого палива); скидання стічних вод; винесення важких металів із відвалів копалень чи металургійних підприємств водними і повітряними потоками; постійне внесення високих доз органічних і мінеральних добрив, пестицидів, які містять домішки важких металів [1].

Хімічні елементи, без яких не завершується життєвий цикл рослинних організмів, називають основними, або життєво необхідними. Деякі важкі метали є основними мікроелементами: кобальт (Co), мідь (Cu), молибден (Mo), цинк (Zn), нікель (Ni), манган (Mn), залізо (Fe), оскільки вони в мікрокількостях необхідні для росту і розвитку рослин. Ці метали є кофакторами багатьох ферментів. Мідь входить до складу переносників електронів при фотосинтезі (пластоціаніну) і диханні (цитохром *c* оксидази), включається в лігніфікацію. Цинк — кофактор супероксиддисмутази і карбоангідрази, бере участь у регулюванні азотного метаболізму, поділі клітин, біосинтезі гормонів, відіграє важливу роль у синтезі нуклеїнових кислот і білків. Залізо — компонент багатьох ферментних систем: цитохромів, каталази, пероксидази, ферредоксину. Манган — компонент кисневидільного комплексу, кофактор супероксиддисмутази, каталази, фосфоенолпіруваткарбоксилази [5, 19]. Однак за певного рівня накопичення цих металів у клітинах виявляється їх негативний вплив.

Біологічна функція інших важких металів — свинцю (Pb), ртуті (Hg), кадмію (Cd), бісмуту (Bi) досі ще нез'ясована. Їх токсична дія виявляється практично уже за слідових концентрацій.

Основний шлях надходження  $Me^{2+}$  в рослини — їх поглинання кореневою системою з ґрунту. Частина металів зв'язується з органічним матеріалом ґрунту і стає недоступною для рослин. Інші залишаються в іонній формі і можуть надходити в кореневу систему. Іони  $Me^{2+}$  поглинаються кореневою системою за механізмами пасивної дифузії та активного транспорту залежно від кислотності ґрунту, вмісту в ньому органічних речовин, вапна, макро- і мікроелементів, вологості, гранулометричного складу [7, 40].

Важкі метали можуть також надходити в рослини і через листки з аерозолями, причому здатність листків поглинати важкі метали залежить від їх анатомічних особливостей. Чим більше опушені листки, тим інтенсивніше вони вбирають метали із забрудненої атмосфери [17].

У рослин є кілька фізіологічних бар'єрів, що обмежують надходження важких металів у надземні органи. Основні з них — плазматична мембрана та ендодерма — відповідно на клітинному і тканинному рівнях. Надходження важких металів у цитоплазму клітини опосередковано різними транспортними системами, локалізованими на плазматичній мембрані. Zn, Mn і Cd переносяться крізь мембрану за допомогою ZIPs (Zrt Irt-like protein family) і NRAMPs (natural resistance associated macrophage protein) транспортерів, Cu — за участю транспортера міді — COPT1-5 (copper transporter) та АТФаз. У злаків можливе надходження Cd, Zn і Ni крізь Ca-канали і шляхом фітометалофорів [19].

Іони металів, що осіли на поверхні клітин чи проникли в них, можуть взаємодіяти з функціональними групами білків, нуклеїнових кислот, полісахаридів, інших сполук. У результаті виникають різні порушення метаболізму, причому, як правило, невідомо, які з них є первинними, а які — наслідком порушення інших процесів.

У вищих рослин толерантність до важких металів забезпечується двома шляхами: 1) запобіганням надходженню металів у клітину шляхом їх зв'язування в клітинних оболонках, внаслідок чого рослина не зазнає токсичного впливу важких металів на внутрішньоклітинні процеси; 2) запуском внутрішньоклітинних механізмів детоксикації важких металів [8]. У відповідь на надходження у клітину активуються неспецифічні, характерні для дії різних стрес-чинників системи захисту, спрямовані на підтримання гомеостазу: 1) індукція антиоксидантних ферментів (каталази, пероксидази, супероксиддисмутази, аскорбатоксидази, глутатіонредуктази), які відповідають за нейтралізацію вільних радикалів і пероксидів, утворення яких інтенсифікується в результаті металоіндукованого окиснювального стресу; 2) синтез осмотично активних речовин (проліну) у відповідь на металоіндукований водний стрес; 3) зміна фізико-хімічних властивостей клітинних оболонок; 4) зміна гормонального балансу; 5) синтез стресових білків. Накопичення металів у вакуолі у вигляді комплексів з органічними кислотами є одним із універсальних механізмів їх детоксикації [7, 18, 40].

Специфічною відповіддю клітин на надходження важких металів у цитоплазму є синтез металозв'язувальних сполук (фітохелатинів, металотіонеїнів). Хелатування важких металів у цитоплазмі за допомогою високоспоріднених лігандів — один із важливих механізмів їх детоксикації. До потенційних лігандів належать амінокислоти, органічні кислоти (ли-

монна, яблучна) та два класи пептидів (фітохелатини, металотіонеїни). Фітохелатини — низькомолекулярні пептиди з високим вмістом цистеїну, які здатні зв'язувати іони важких металів. Через високу спорідненість до SH-груп іони  $Cd^{2+}$  є найсильнішими активаторами їх синтезу. Крім фітохелатинів важливу роль у детоксикації деяких важких металів (особливо міді) відіграють металотіонеїни з високим вмістом SH-груп. Фітохелатини синтезуються на основі глутатіону чи його аналогів у результаті пептидилтрансферазної реакції за участю ферменту фітохелатинсинтази [18, 39].

Велику роль у захисті клітин від токсичної дії важких металів відіграють білки теплового шоку (БТШ). Вони виконують функцію молекулярних шаперонів, беруть участь у захисті, відновленні і деградації пошкоджених білків під час більшості абіотичних стресів. Синтез БТШ індукується іонами  $Cd^{2+}$  у багатьох рослин [8, 40]. У клітинній культурі *Lycopersicon peruvianum* (L.) Mill. під дією солі кадмію (1 мМ) значні кількості БТШ молекулярною масою 70 кД (БТШ 70) були зв'язані із плазмолемою, мембранами мітохондрій та ендоплазматичного ретикулула [33]. Нещодавно отримано дані про структуру гена *Hvhsr 17*, який відповідає за синтез БТШ у кукурудзи та ячменю. Його експресія посилювалась за наявності  $Cd^{2+}$  [40]. Показано, що вміст низькомолекулярного БТШ 17 зростає у культурах клітин *Silene vulgaris* і *Lycopersicon peruvianum* (L.) Mill. у відповідь на дію важких металів [53].

Мідь, нікель, свинець і цинк концентраціями 0,5—2 мМ спричинюють підвищення вмісту низькомолекулярних БТШ у хлоропластах, що залежить від тривалості експозиції рослин на розчинах металів [21]. Низькомолекулярні БТШ можуть сприяти підтриманню рівня електронного транспорту за індукованого важкими металами стресу.

Однак досі не ідентифіковані специфічні компоненти клітини чи процеси, які є мішенями дії білків теплового шоку за металіндукованого стресу. Оскільки мембрани клітин і білки є первинними сайтами пошкодження, припускають, що функція БТШ полягає у захисті клітинних мембран [18].

Підвищені концентрації важких металів у воді чи ґрунті здатні викликати множинні порушення багатьох фізіологічних процесів у рослинах, найчутливішим з яких є фотосинтез. Вплив важких металів на фотосинтез описано в багатьох роботах. Переважна більшість із них присвячена вивченню дії окремих металів на певні ланки цього процесу. Нижче наведено короткий огляд результатів досліджень впливу важких металів на світлову і темнову стадії фотосинтезу.

Дію  $Me^{2+}$  на фотосинтез вивчають як в експериментах *in vivo* (на листках рослин, вирощених за надлишку іонів важких металів), так і *in vitro* на ізольованих системах (хлоропласти, часточки фотосистеми II (ФС II), ферменти). Експерименти *in vitro* звужують коло впливів від цілого організму до органів, тканин, клітини, субклітинних органел, їх фрагментів та окремих ферментів, дають змогу визначати потенційно найчутливіші місця впливу металів для подальшої реконструкції загальної реакції організму.

Важкі метали впливають на процес фотосинтезу прямо й опосередковано. Прямий вплив пов'язаний з інгібуванням активності ферментів синтезу хлорофілу та циклу Кальвіна зв'язуванням  $Me^{2+}$  з SH-групами білків, порушенням транспорту електронів електронтранспортним ланцюгом (ЕТЛ), зміною кількості тилакоїдів і ліпідного складу мембран. Опо-

середкована дія обумовлена металоіндукованим водним стресом, закриттям прорихів, внаслідок чого зменшується кількість доступного  $\text{CO}_2$  [6].

Згідно з результатами дослідження вмісту пігментів у листках рослин за дії важких металів, при вирощуванні *Zea mays* L. на поживному середовищі із вмістом солей  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  і  $\text{Pb}^{2+}$  концентраціями 0,5—2 мМ протягом кількох діб загальний вміст хлорофілів та їх співвідношення були зниженими [21]. У низці робіт відмічено зменшення вмісту хлорофілів у листках рослин за дії іонів  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  і  $\text{Pb}^{2+}$ , що виявлялося хлорозом, обумовленим інгібуванням синтезу хлорофілу [16, 32, 43]. Встановлено також збільшення деградації хлорофілу під дією  $\text{Pb}^{2+}$  внаслідок підвищення активності хлорофілази [15].

За витримування листків у розчині, що містив іони  $\text{Cu}^{2+}$  концентрацією менш як 1 мМ протягом 1 доби, відмічено зниження вмісту хлорофілів, а також співвідношення хлорофілів *a/b*. За концентрації  $\text{Cu}^{2+}$  1—10 мМ вміст хлорофілів знижувався ще більше, і крім того, розпадались каротиноїди [26]. Токсичний вплив міді пов'язаний із заміщенням магнію на мідь у молекулі хлорофілу [25]. Продукування вільних радикалів під дією важких металів підвищує швидкість старіння листків у результаті окиснювального стресу [26].

Іони  $\text{Pb}^{2+}$  і  $\text{Cd}^{2+}$  призводять до зміни ліпідного складу мембран тилакоїдів [27, 46], зниження вмісту хлорофілів, причому вміст хлорофілу *b* знижувався більшою мірою, ніж хлорофілу *a* [24, 47]. Це очевидно пов'язано з інгібуванням ферментів синтезу хлорофілів, яке часто спостерігається у вигляді хлорозу [37].

Залізо є необхідним елементом для біосинтезу хлорофілу, тому його дефіцит зумовлює зниження концентрації пігментів у листках, підвищення співвідношення хлорофілів *a/b* та інгібування фотосинтетичної активності. Показано, що збільшення концентрації  $\text{Cu}^{2+}$  було причиною зниження вмісту хлорофілів у листках, яке очевидно обумовлене дефіцитом  $\text{Fe}^{2+}$  [36]. Раніше відмічено антагоністичну взаємодію між  $\text{Cu}^{2+}$  і  $\text{Fe}^{2+}$ , показано, що токсичні ефекти  $\text{Cu}^{2+}$  на фотосинтез значно знижуються за одночасного зростання концентрації  $\text{Fe}^{2+}$  всередині листка [34].

Непрямий вплив важких металів на процес фотосинтезу підтверджують експерименти з вимірювання співвідношень  $\text{Me}^{2+}/\text{ФС II}$ . За вирощування рослин на середовищі, що містило надлишок іонів міді (15 мкМ), співвідношення  $\text{Cu}^{2+}/\text{ФС II}$  в ізольованих хлоропластах рослин було значно нижчим, ніж у листовій тканині в цілому. Отримані результати вказують на те, що  $\text{Cu}^{2+}$  не накопичується специфічно у хлоропластах і цей вплив, імовірно, є наслідком порушення інших процесів [36].

Зниження концентрації хлорофілу супроводжувалось редукцією тилакоїдних мембран. Зменшення розмірів і числа хлоропластів, а також порушення їх ультраструктури (зменшення числа гран і тилакоїдів, їх деформация, утворення пластоглобул, зміна ліпідного складу мембран) спостерігались у *Brassica oleracea* L. при інкубації на агарі за наявності  $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Можливо ці зміни були пов'язані з нікельіндукованим зниженням вмісту води в клітинах або з окиснювальним стресом, який призводив до пероксидного окиснення ліпідів мембран [32].

Дані щодо впливу  $\text{Me}^{2+}$  на рівні фотосинтетичного ЕТЛ хлоропластів підтверджують, що найчутливішою його ділянкою є ФС II [13, 14]. Фотосистема II — мультисубодиничний пігмент-білковий комплекс, функціонує як світлозалежна  $\text{H}_2\text{O}$  — пластохінон (PQ) оксидоредуктаза, що забезпечує перенесення електронів від  $\text{H}_2\text{O}$  до пластохінону фо-

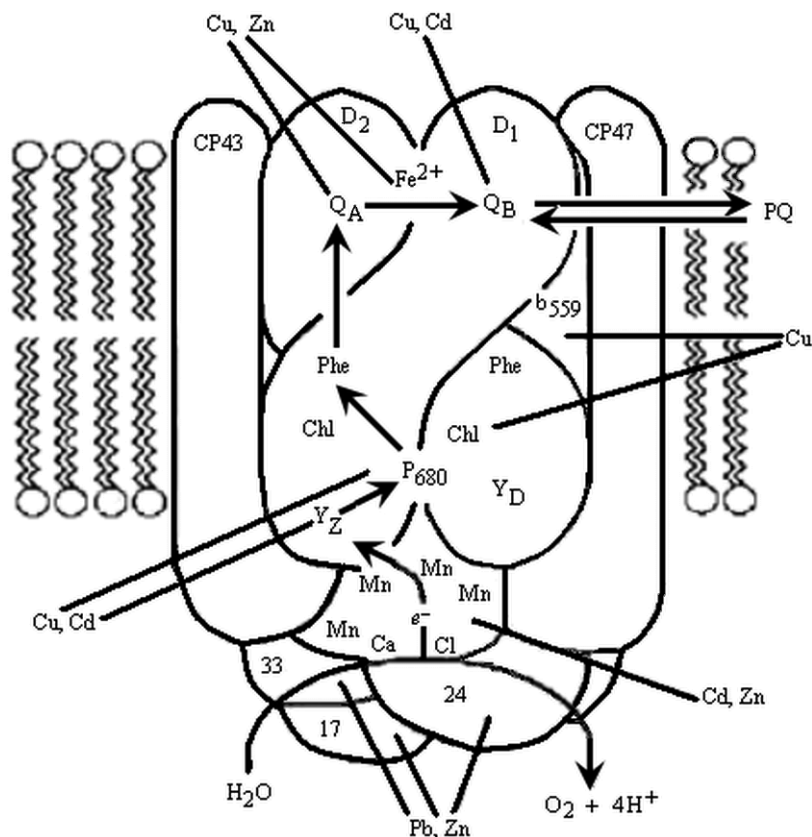


Рис. 1. Місця впливу важких металів на ФС II (будова ФС II за [20])

тоіндукованим розділенням зарядів між первинним донором електронів  $P_{680}$  та первинним акцептором — молекулою феофітину (Phe). ФС II вищих рослин і зелених водоростей містить більш як 25 поліпептидів і близько 300 молекул хлорофілу на один  $P_{680}$ . Реакційний центр ФС II утворюють гомологічні білки D1 і D2, на яких розміщуються редокс компоненти (залишки тирозину  $Tyr_Z$  і  $Tyr_D$ , первинний донор електронів  $P_{680}$  (спеціальна пара/димер хлорофілу  $a$ ), 4–6 молекул хлорофілу  $a$ , первинний акцептор Phe, хінонові акцептори  $Q_A$  і  $Q_B$ , Mn-кластер, негемове залізо ( $Fe^{2+}$ ), розміщене з акцепторного боку між  $Q_A$  і  $Q_B$ , цитохром  $b_{559}$ ) [20]. На рис. 1 схематично вказано місця впливу важких металів на ФС II.

Згідно з літературними даними, іони  $Cu^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  інгібують як донорний, так і акцепторний боки ФС II (див. рис. 1). З донорного боку  $Cu^{2+}$  інгібує електронний транспорт на рівні первинного донора електронів  $P_{680}$ , а також на рівні окиснення  $Tyr_Z$  [22, 41]. Показано [13], що обидві форми цитохрому  $b_{559}$  і хлорофіл Z (Хл<sub>Z</sub>) є мішенями впливу іонів  $Cu^{2+}$ . Місцями інгібіторної дії  $Cu^{2+}$  з акцепторного боку ФС II є первинний хіноновий акцептор  $Q_A$  [22], ділянка Phe- $Q_A$ -Fe [54], негемове залізо [23, 45]. На підставі даних термолюмінесценції й уповільненої флуоресценції висловлено припущення, що іони  $Cu^{2+}$  не блокують електронний транспорт між  $Q_A$  і  $Q_B$ , а модифікують  $Q_B$ -центр [30].

Іони  $Cd^{2+}$  інгібують фотосинтетичне виділення кисню, окиснення  $Tyr_Z$ . Крім того, зв'язавшись у ділянці  $Q_B$ -сайта, вони порушують транспорт електронів між  $Q_A$  і  $Q_B$  [44].

Встановлено [49], що сіль  $ZnSO_4$  концентрацією 2 мМ не впливає на активність ФС I, проте інгібує фотохімічні реакції ФС II — фотовідновлення дихлорфеноліндофенолу, виділення  $O_2$  і флуоресценцію хлорофілу в ізольованих хлоропластах ячменю.

Вплив іонів  $Zn^{2+}$  на фотосинтетичне виділення кисню підтверджено результатами ЕПР-спектроскопії. Додавання до суспензії тилакоїдів 5 мМ іонів  $Zn^{2+}$  викликало ЕПР-сигнал, що належить вивільненим у середовище іонам  $Mn^{2+}$ . Величина цього сигналу лінійно корелювала з інгібуванням виділення кисню [28, 29].

Докази інгібіторної дії міді на рівні ділянки Phe- $Q_A$ -Fe наведено в низці експериментів. При дослідженні впливу міді на фотохімічні процеси *in vitro* в часточках ФС II показано, що іони  $Cu^{2+}$  концентрацією 10—40 мкМ інгібують фотосинтетичне виділення кисню за наявності акцепторів електронів 2,6-дихлор-*n*-бензохінону (2,6-ДХБХ) і фериціаніду ( $FeCu$ ) на відміну від силікомолібдату ( $SiMo$ ). Оскільки 2,6-ДХБХ акцептує електрони з  $Q_B$ ,  $FeCu$  — з  $Q_A$ , а також з  $Q_B$ ,  $SiMo$  приймає електрони від Phe,  $Q_A$ ,  $Q_B$ , інгібувальний вплив іонів  $Cu^{2+}$  на процес виділення кисню може бути спричинений їх зв'язуванням у ділянці Phe- $Q_A$ -Fe [55].

Показано [13], що інгібування фотосинтетичного виділення кисню іонами  $Cu^{2+}$  супроводжувалося гасінням (зниженням рівня) флуоресценції хлорофілу, пов'язаним з інгібуванням донорного боку ФС II у результаті зв'язування  $Cu^{2+}$  з  $TuZ$  [22, 41]. Причиною гасіння флуоресценції хлорофілу за умов інгібування донорного боку ФС II є утворення радикала  $Хл_Z^+$ , який є сильним гасником флуоресценції ФС II [42]. Інгібування донорного боку іонами важких металів підтверджують дані про те, що іони  $Hg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  і  $Pb^{2+}$  в ізольованих тилакоїдних мембранах зумовлюють зниження мінімального, максимального і стаціонарного рівнів флуоресценції [12].

Пізніше встановлено стимулювання виділення кисню за дії коротких насичувальних імпульсів світла та співвідношень  $Cu^{2+}/ФС II$ , близьких до еквімолярних [13, 14].

Дослідженням фотосинтетичних показників листків рослин *in vivo* в разі додавання до середовища вирощування *Zea mays* L. солей  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  і  $Pb^{2+}$  виявлено зниження швидкості поглинання  $CO_2$  та нециклічного транспорту електронів за наявності фериціаніду калію, а також зменшення максимального квантового виходу фотохімічних реакцій ФС II [21].

Іони  $Pb^{2+}$  і  $Zn^{2+}$  концентрацією від 2 до 10 мМ викликають дисоціацію поліпептидів кисневидільного комплексу (КВК) молекулярною масою 17, 23 і 33 кД у часточках ФС II. Дисоціація цих поліпептидів не тільки інгібує активність КВК, а й дестабілізує зв'язування кофакторів КВК  $Cl^-$ ,  $Ca^{2+}$  і  $Mn^{2+}$  [38]. Іони  $Pb^{2+}$ , що зв'язуються з поліпептидами світлозбирального комплексу *in vitro*, призводять до його конформаційних змін [9].

Токсичний вплив важких металів ( $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ) на фотохімічні реакції ФС II досліджено вимірюванням активності реакції Хілла, флуоресценції та термолюмінесценції у хлоропластах *Pisum sativum* L. [31]. Фотовідновлення дихлорфеноліндофенолу та максимальний рівень флуоресценції істотно інгібувались за наявності 5 мМ  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  і 2,5 мМ  $Zn^{2+}$ . Ці метали пригнічували транспорт електронів від феофітину через пластохінон  $Q_A$  і Fe на пластохінон  $Q_B$  зміною структури переносників (пластохінон  $Q_B$ ) чи білків реакційного центру. Встановлено, що іони

Zn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, як і Cu<sup>2+</sup>, модифікують Q<sub>B</sub>-центр, що призводить до втрати активності ФС II. Крім того, під впливом Ni<sup>2+</sup> може зменшуватися вміст цитохромів *b<sub>6</sub>f* і *b<sub>559</sub>*, а також ферредоксину і пластоціаніну, внаслідок чого знижується ефективність транспорту електронів [51].

Місця зв'язування іонів Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> і Cd<sup>2+</sup> з акцепторним боком ФС II інтенсивно з'ясовуються на бактеріальних реакційних центрах (БРЦ) методами ЕПР-спектроскопії та рентгенівської дифракції [10, 50]. Доведено, що Zn<sup>2+</sup> і Cd<sup>2+</sup> стехіометрично зв'язуються з БРЦ, блокують поглинання протонів та інгібують швидкість транспорту електронів від первинного хінонового акцептора Q<sub>A</sub> до вторинного Q<sub>B</sub> [35]. Особливості зв'язування перехідних металів з акцепторним боком суперкомплексу ФС II вищих рослин вивчені набагато гірше, є деякі дані щодо впливу іонів міді і цинку на електронний транспорт з акцепторного боку ФС II, проте мало відомо про вплив інших важких металів. Зокрема, іони Cu<sup>2+</sup> і Zn<sup>2+</sup>, зв'язуючись у ділянці Fe<sup>2+</sup>-сайта між Q<sub>A</sub> і Q<sub>B</sub>, можуть спричинювати зміщення негемового заліза. Це реєструється як зникнення ЕПР-сигналу, що належить Q<sub>A</sub><sup>-</sup>-Fe<sup>2+</sup> у часточках ФС II, які не містять мангану [22, 23]. Іони Cu<sup>2+</sup> інгібують рекомбінацію зарядів водоокиснювального комплексу ФС II з Q<sub>B</sub><sup>-</sup>, на відміну від рекомбінації з Q<sub>A</sub><sup>-</sup> [30].

Показано також, що Cu<sup>2+</sup> [2] і Zn<sup>2+</sup> [3] інгібують світлозалежне поглинання протонів вторинним хіноновим акцептором Q<sub>B</sub> значно більшою мірою, ніж виділення кисню.

Ми досліджували вплив іонів Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> і Hg<sup>2+</sup> на кінетику реокиснення Q<sub>A</sub><sup>-</sup> та відносний вміст Q<sub>B</sub>-невідновлювальних комплексів ФС II в ізольованих хлоропластах гороху з метою встановлення механізмів дії важких металів на процес фотосинтетичного транспорту електронів з акцепторного боку ФС II між Q<sub>A</sub> і Q<sub>B</sub>. Після багаторазового збудження реакційного центру ФС II насичувальним спалахом тривалістю 600 мс спостерігали трикомпонентну кінетику реокиснення Q<sub>A</sub><sup>-</sup>, яка контролювалась редокс-станом Q<sub>B</sub> і пластохінонового пулу (рис. 2). Трива-

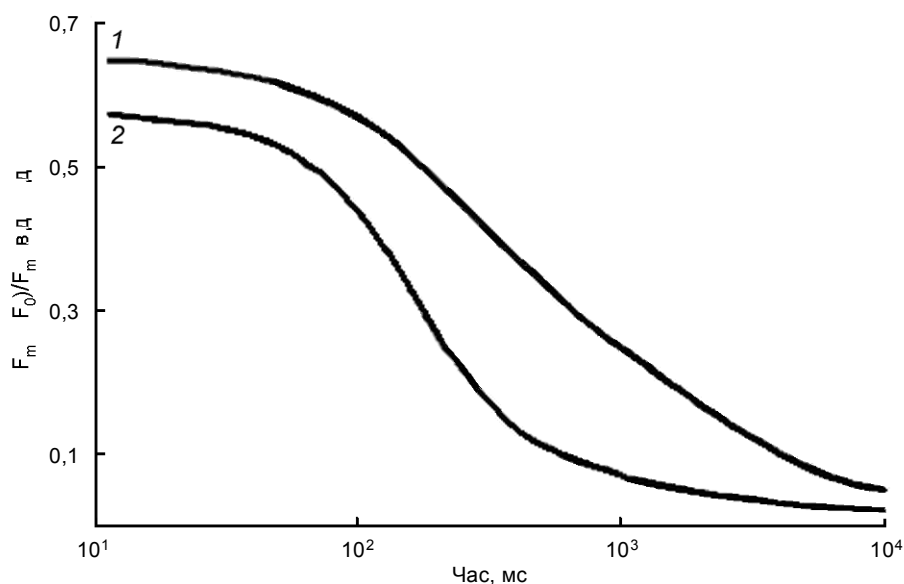


Рис. 2. Криві релаксації флуоресценції хлорофілу контрольних рослин та за дії іонів міді: 1 – контроль; 2 – 100 мкМ Cu<sup>2+</sup>

лість напівспаду та амплітуди швидкої, середньої і повільної компонент темного гасіння флуоресценції значно змінювались після додавання важких металів до реакційного середовища. Експерименти, проведені з акцептором електронів 2,6-ДХБХ та інгібітором ФС II 3-(3,4-дихлорфеніл)-1,1-диметилсечовиною, показали, що перші дві компоненти пов'язані з лінійним транспортом електронів від ФС II, а третя відбиває рекомбінацію між  $Q_A^-$  і кисневидільним комплексом.

Додавання іонів  $Cu^{2+}$  (50 і 200 мкМ),  $Hg^{2+}$  (5 і 20 мкМ) до суспензії хлоропластів призводило майже до дворазового прискорення швидкої і проміжної компонент, тоді як амплітуда швидкої фази зростала за рахунок проміжної і повільної. Іони  $Zn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  (50 і 200 мкМ) сповільнювали швидку і середню компоненти, при цьому амплітуда повільної фази збільшувалась, а проміжної і швидкої зменшувалась [4]. Іони  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  майже не впливали на вміст  $Q_B$ -невідновлювальних комплексів, а за наявності  $Zn^{2+}$  і  $Pb^{2+}$  ця величина різко зростала.

Отримані дані засвідчують, що важкі метали залежно від їх редокс-потенціалів по-різному впливають на транспорт електронів між  $Q_A$  і  $Q_B$ . Більш електронегативні метали  $Zn^{2+}$  ( $E^0 = -0,763$  В),  $Cd^{2+}$  ( $E^0 = -0,403$  В),  $Pb^{2+}$  ( $E^0 = -0,126$  В) інгібують транспорт, а більш електропозитивні  $Cu^{2+}$  ( $E^0 = +0,153$  В),  $Hg^{2+}$  ( $E^0 = +0,427$  В) — прискорюють його. Одним із можливих пояснень цього є припущення, що в разі порушення транспорту електронів між  $Q_A^-$  і  $Q_B$ , іони  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  акцептують електрони безпосередньо від  $Q_A^-$  [4]. Здатність іонів  $Cu^{2+}$  приймати електрони від  $Q_A^-$  показано раніше методами ЕПР-спектроскопії [23].

При обробці препаратів ФС II, які не містять мангану, іонами  $Cu^{2+}$ , що зв'язуються в ділянці  $Fe^{2+}$ -сайта, втрачався світлоіндукований ЕПР-сигнал  $Q_A^-$ , що підтверджує акцептування електронів іонами  $Cu^{2+}$  від  $Q_A^-$ . Поява ЕПР-сигналу  $Q_A^-$  (замість  $Q_A^- - Fe^{2+}$ ) за дії іонів  $Zn^{2+}$  вказує на інгібування перенесення електронів між  $Q_A^-$  і  $Q_B$ . Здатність іонів  $Me^{2+}$  приєднувати електрони безпосередньо від  $Q_A^-$  визначається різницею редокс-потенціалів  $Me^{2+}$  і  $Q_A^-$  [23].

Інші дослідники вивчали вплив іонів  $Cd^{2+}$  концентрацією 1, 5 і 10 мМ на швидкість реокиснення  $Q_A^-$  після одноразового збудження реакційного центру коротким (~50 мкс) інтенсивним спалахом [44]. Тристадійне окиснення  $Q_A^-$  супроводжувалось релаксацією флуоресценції внаслідок переносу електронів з  $Q_A^-$  на  $Q_B$ . Швидка компонента окиснення  $Q_A^-$  відбиває перенесення електрона від  $Q_A^-$  до  $Q_B$ , який знаходиться в  $Q_B$ -сайті, середня — характеризує окиснення  $Q_A^-$  за допомогою  $Q_B$ , який ще має приєднатися до  $Q_B$ -сайта, повільна — відображає рекомбінацію між  $Q_A^-$  і кисневидільним комплексом. Додавання іонів  $Cd^{2+}$  до часточок ФС II сповільнювало швидку компоненту і знижувало її амплітуду внаслідок збільшення амплітуди повільної компоненти. Отримані результати підтверджують інгібування транспорту електронів між  $Q_A$  і  $Q_B$  іонами  $Cd^{2+}$  через їх зв'язування в ділянці  $Q_B$ -сайта [44].

Важкі метали токсично впливають також і на темнові реакції фотосинтезу, інгібують активність ключових ферментів циклу Кальвіна рибулозо-1,5-*bis*-фосфаткарбоксилази (оксигенази), 3-фосфогліцераткінази, фруктозо-1,6-*bis*-фосфатази, альдолази, що спостерігалось у листках *Sajanus sajan* (L.) Millsp. після інкубації протягом кількох діб на розчині хлориду нікелю (1 мМ) [43]. Інгібування реакцій циклу Кальвіна призводить до збільшення вмісту АТФ і НАДФ·Н, продуктів світлових реакцій фотосинтезу.



Здебільшого за впливу  $\text{Cd}^{2+}$  і  $\text{Pb}^{2+}$  інактивація ферменту обумовлена взаємодією металів з його SH-групами. Іони  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  взаємодіють із SH-групами як у реакційному центрі ферменту, так і з групами, що відповідають за стабілізацію третинної структури, в результаті чого змінюється конформація ферменту. Крім того,  $\text{Cd}^{2+}$  і  $\text{Pb}^{2+}$  можуть витіснити зв'язані з SH-групами іони  $\text{Zn}^{2+}$  [6]. Внаслідок взаємодії  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  із SH-групами знижується активність ферментів синтезу хлорофілу, дегідратази  $\delta$ -амінолевулінової кислоти [37], протохлорофілідредуктази [48]. Вони інгібують активність рибулозо-1,5-*bis*-фосфаткарбоксилази (оксигенази) [43, 47], фосфоенолпіруваткарбоксилази [52]. Іони  $\text{Cd}^{2+}$  пригнічують ферментну систему фотоокиснення води [11], ферменти циклу Кальвіна (гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназу, рибулозо-5-фосфаткіназу) [43].

Отже, важкі метали є сильними стресовими чинниками, що особливо загрозово у зв'язку зі зростанням антропогенного впливу на навколишнє середовище. Основним шляхом надходження металів у рослини є їх поглинання кореневою системою з ґрунту, що здійснюється за механізмами пасивної дифузії та активного транспорту. У відповідь на надходження металів у клітину активуються неспецифічні, характерні для дії різних стрес-чинників системи захисту. Специфічними відповідями клітин на надходження важких металів у цитоплазму є синтез металозв'язувальних сполук (фітохелатинів, металотіонеїнів). Важкі метали прямо й опосередковано впливають на процес фотосинтезу, зокрема на функціонування фотосинтетичного ЕТЛ на ділянці ФС II.

1. Орлов Д.С., Садовникова Л.К., Лозановская И.Н. Экология и охрана биосферы при химическом загрязнении. — М.: Высш. шк., 2002. — 334 с.
2. Подорванов В.В., Полищук А.В., Золотарева Е.К. Влияние ионов меди на светоиндуцированный протонный перенос в хлоропластах шпината // Биофизика. — 2007. — 52, № 6. — С. 1049—1053.
3. Полищук О.В., Подорванов В.В., Ситник С.К. Вплив іонів цинку на протонний перенос в ізольованих хлоропластах шпинату // Доп. НАН України. — 2007. — № 8. — С. 174—178.
4. Полищук А.В., Топчий Н.Н., Ситник К.М. Влияние ионов тяжелых металлов на перенос электронов на акцепторной стороне фотосистемы II // Там же. — 2009. — № 6. — С. 204—211.
5. Рахманкулова З.Ф., Федяев В.В., Абдуллина О.А., Усманов И.Ю. Формирование адаптационных механизмов у пшеницы и кукурузы к повышенному содержанию цинка // Вестн. Башк. ун-та. — 2008. — 13, № 1. — С. 43—46.
6. Серегин И.В., Иванов В.Б. Физиологические аспекты токсического действия кадмия и свинца на высшие растения // Физиология растений. — 2001. — 48, № 4. — С. 606—630.
7. Серегин И.В., Кожевникова А.Д. Физиологическая роль никеля и его токсическое действие на высшие растения // Там же. — 2006. — 53, № 2. — С. 285—308.
8. Феник С.И., Трофимьяк Т.Б., Блюм Я.Б. Механизмы формирования устойчивости растений к тяжелым металлам // Успехи соврем. биологии. — 1995. — 115. — С. 261—275.
9. Ahmed A., Tajmir-Riahi H.A. Interaction of toxic metal ions  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  with light-harvesting proteins of chloroplast thylakoid membranes. An FTIR spectroscopic study // J. Inorg. Biochem. — 1993. — 50. — P. 235—243.
10. Axelrod H.L., Abresch E.C., Paddock M.L. Determination of the binding sites of the proton transfer inhibitors  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  in bacterial reaction centers // PNAS. — 2000. — 97, N 4. — P. 1542—1547.
11. Baszinsly T., Wajda L., Krol M. et al. Photosynthetic activities of cadmium-treated tomato plants // Physiol. Plant. — 1980. — 48. — P. 365—370.
12. Boucher N., Carpentier R.  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  — induced changes in photosystem II photochemical yield and energy storage in isolated thylakoid membranes: A study using simultaneous fluorescence and photoacoustic measurements // Photosynth. Res. — 1999. — 59. — P. 167—174.

13. *Burda K., Kruk J., Schmid G.H., Strzalka K.* Inhibition of oxygen evolution in photosystem II by Cu(II) ions is associated with oxidation of cytochrome *b559* // *Biochem. J.* — 2003. — **371**. — P. 597–601.
14. *Burda K., Kruk J., Strzalka K., Schmid G.H.* Stimulation of oxygen evolution in photosystem II by copper(II) ions // *Z. Naturforsch.* — 2002. — **57**. — P. 853–857.
15. *Drazkiewicz M.* Chlorophyll-occurrence, functions, mechanism of action, effects of internal and external factors // *Photosynthetica.* — 1994. — **30**. — P. 321–331.
16. *Ewais E.A.* Effects of cadmium, nickel and lead on growth, chlorophyll content and proteins of weeds // *Biol. plant.* — 1997. — **39**, N 3. — P. 377–386.
17. *Godzik B.* Heavy metals content in plants from zinc dumps and reference areas // *Polish Bot. Stu.* — 1993. — **5**. — P. 113–132.
18. *Hall J.L.* Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance // *J. Exp. Bot.* — 2002. — **53**, N 366. — P. 1–11.
19. *Hall J.L., Williams L.E.* Transition metal transporters in plants // *Ibid.* — 2003. — **54**, N 393. — P. 26101–26113.
20. *Hankamer B., Morris E., Nield J. et al.* Subunit positioning and transmembrane helix organisation in the core dimer of photosystem II // *FEBS Lett.* — 2001. — **504**. — P. 142–151.
21. *Heckathorn S.A., Mueller J.K., LaGuidice S. et al.* Chloroplast small heat-shock proteins protect photosynthesis during heavy metal stress // *Amer. J. Bot.* — 2004. — **91**, N 9. — P. 1312–1318.
22. *Jegerschold C., Arellano J.B., Schroder W.P. et al.* Copper(II) inhibition of electron transfer through photosystem II studied by EPR spectroscopy // *Biochemistry.* — 1995. — **34**. — P. 12747–12754.
23. *Jegerschold C., McMillan F., Lubitz W., Rutherford A.W.* Effect of copper and zinc ions on photosystem II. Studies by EPR spectroscopy // *Ibid.* — 1999. — **38**. — P. 12439–12445.
24. *Kacabova P., Nart L.* Effect of lead on growth characteristics and chlorophyll content in barley seedlings // *Photosynthetica.* — 1986. — **20**. — P. 411–417.
25. *Kupper H., Kupper F., Spiller M.* Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants // *J. Exp. Bot.* — 1996. — **47**, N 295. — P. 259–266.
26. *Luna C.M., Gonzalez C.A., Trippi V.S.* Oxidative damage caused by an excess of copper in oat leaves // *Plant Cell Physiol.* — 1994. — **35**, N 1. — P. 11–15.
27. *Malik D., Sheoran I.S., Singh R.* Lipid composition of thylakoid membranes of cadmium treated wheat seedlings // *Indian J. Biochem. Biophys.* — 1992. — **29**. — P. 350–354.
28. *Miller M., Cox R.P.* Effect of Zn<sup>2+</sup> on photosynthetic oxygen evolution and chloroplast manganese // *FEBS Lett.* — 1983. — **155**, N 2. — P. 331–333.
29. *Miller M.* The release of polypeptides and manganese from oxygen-evolving photosystem II preparations following zinc-treatment // *Ibid.* — 1985. — **189**, N 2. — P. 355–360.
30. *Mohanti N., Vass I., Demeter S.* Copper toxicity affects photosystem II electron transport at the secondary quinone acceptor, Q<sub>B</sub> // *Plant Physiol.* — 1989. — **90**. — P. 175–179.
31. *Mohanti N., Vass I., Demeter S.* Impairment of photosystem II activity at the level of secondary quinone electron acceptor in chloroplasts treated with cobalt, nickel and zinc ions // *Physiol. Plant.* — 1989. — **76**. — P. 386–390.
32. *Molas J.* Changes in morphological and anatomical structure of cabbage (*Brassica oleracea* L.) outer leaves and in ultrastructure of their chloroplasts caused by an in vitro excess of nickel // *Photosynthetica.* — 1997. — **34**. — P. 513–522.
33. *Neumann D., Lichtenderger O., Gunther D. et al.* Heatshock proteins induce heavy-metal tolerance in higher plants // *Planta.* — 1994. — **194**. — P. 360–367.
34. *Ouzounidou G., Ilias I., Tranopoulou H., Karataglis S.* Amelioration of copper toxicity by iron on spinach physiology // *J. Plant Nutr.* — 1998. — **21**. — P. 2089–2101.
35. *Paddock M.L., Graige M.S., Feher G., Okamura M.Y.* Identification of the proton pathway in bacterial reaction centers: Inhibition of proton transfer by binding of Zn<sup>2+</sup> or Cd<sup>2+</sup> // *PNAS.* — 1999. — **96**, N 11. — P. 6183–6188.
36. *Patsikka E., Kairavuo M., Sersen F. et al.* Excess copper predisposes photosystem II to photoinhibition in vivo by outcompeting iron and causing decrease in leaf chlorophyll // *Plant Physiol.* — 2002. — **129**. — P. 1359–1367.
37. *Prasad D.D.K., Prasad A.R.K.* Altered δ-aminolaevulinic acid metabolism by lead and mercury in germinating seedlings of bajra (*Pennisetum typhoideum*) // *J. Plant Physiol.* — 1987. — **127**. — P. 241–249.
38. *Rashid A., Camm E.L., Ekramoddoullah A.K.M.* Molecular mechanism of action of Pb<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> on water oxidizing complex of photosystem II // *FEBS Lett.* — 1994. — **350**. — P. 296–298.
39. *Rausser W.E.* Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis and function // *Plant Physiol.* — 1995. — **109**. — P. 1141–1149.

40. *Sanita L. di Toppi L., Gabbrielli R.* Response to cadmium in higher plants // *Environ. Exp. Bot.* — 1999. — **41**. — P. 105–130.
41. *Schroder W.P., Arellano J.B., Bittner T., Baron M.* Flash induced absorption spectroscopy studies of copper interaction with photosystem II in higher plants // *J. Biol. Chem.* — 1994. — **269**. — P. 32865–32870.
42. *Schweitzer R.H., Brudvig G.W.* Fluorescence quenching by chlorophyll cations in photosystem II // *Biochemistry.* — 1997. — **36**. — P. 11351–11359.
43. *Sheoran I.S., Singal H.R., Singh R.* Effect of cadmium and nickel on photosynthesis and the enzymes of the photosynthetic carbon reduction cycle in pigeonpea (*Cajanus cajan*) // *Photosynth. Res.* — 1990. — **23**. — P. 345–351.
44. *Sigfridsson K.G.V., Bernat G., Mamedov F., Styring S.* Molecular interference of Cd<sup>2+</sup> with photosystem II // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2004. — **1659**. — P. 19–31.
45. *Singh D.P., Singh S.P.* Action of heavy metal on hill activity and O<sub>2</sub> evolution // *Plant Physiol.* — 1987. — **83**. — P. 12–14.
46. *Stefanov K.L., Pandev S.D., Seizova K.A. et al.* Effect of lead on the lipid metabolism in spinach leaves and thylakoid membranes // *Biol. Plant.* — 1995. — **37**. — P. 251–256.
47. *Stiborova M., Doubravova M., Brezinova A., Friedrich A.* Effect of heavy metals ions on growth and biochemical characteristics of photosynthesis of barley (*Hordeum vulgare* L.) // *Photosynthetica.* — 1986. — **20**. — P. 418–425.
48. *Stobart A.K., Griffiths W.T., Ameen-Bukhari I., Sherwood R.P.* The effect of Cd<sup>2+</sup> on biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley // *Physiol. Plant.* — 1985. — **63**. — P. 293–298.
49. *Tripathy B.C., Mohanty P.* Zinc-inhibited electron transport of photosynthesis in isolated barley chloroplasts // *Plant Physiol.* — 1980. — **66**. — P. 1174–1178.
50. *Utschig L.M., Poluektov O., Schlesselman S.L.* Cu<sup>2+</sup> site in photosynthetic bacterial reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*, *Phodobacter capsulatus*, and *Rhodospseudomonas viridis* // *Biochemistry.* — 2001. — **40**, N 20. — P. 6132–6141.
51. *Veeranjaneyulu K., Das V.S.R.* Intrachloroplast localization of <sup>65</sup>Zn and <sup>63</sup>Ni in a Zn-tolerant plant, *Ocimum basilicum* Benth // *J. Exp. Bot.* — 1982. — **33**. — P. 1161–1165.
52. *Vojtechova M., Leblova S.* Uptake of lead and cadmium by maize seedlings and the effect of heavy metals on the activity of phosphoenolpyruvate carboxylase isolated from maize // *Biol. Plant.* — 1991. — **33**. — P. 386–394.
53. *Wollgiehn R., Neumann D.* Metal stress response and tolerance of cultured cells from *Silene vulgaris* and *Lycopersicon peruvianum*: role of heat stress proteins // *J. Plant Physiol.* — 1999. — **154**. — P. 547–553.
54. *Yruela I., Gatzen G., Picorel R., Holzwarth A.R.* Cu(II)-inhibitory effect on photosystem II from higher plants. A picosecond time-resolved fluorescence study // *Biochemistry.* — 1996. — **35**. — P. 9469–9474.
55. *Yruela I., Montoya G., Alonso P., Picorel R.* Identification of the pheophytin-Q<sub>A</sub>-Fe domain of the reducing side of the photosystem II as the Cu(II)-inhibitory binding site // *J. Biol. Chem.* — 1991. — **266**, N 34. — P. 22847–22850.

Отримано 25.05.2009

## ВЛИЯНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ФОТОСИНТЕЗ

Н.Н. Тончий

Институт ботаники им. Н.Г. Холодного Национальной академии наук Украины, Киев

Обзор посвящен влиянию тяжелых металлов на функционирование фотосинтетического аппарата. Приведены данные о неспецифических и специфических реакциях клеток на металлоиндуцированный стресс. Рассмотрено влияние тяжелых металлов на пигментный аппарат, транспорт электронов, активность ферментов цикла Кальвина. Наиболее чувствительным участком фотосинтетической электронтранспортной цепи к влиянию тяжелых металлов является фотосистема II. На основании результатов экспериментов, проведенных *in vitro*, установлены места действия тяжелых металлов на донорной и акцепторной сторонах фотосистемы II. Исследованиями кинетики реокисления Q<sub>A</sub><sup>-</sup> доказано, что тяжелые металлы в зависимости от их редокс-потенциала влияют на перенос электронов между Q<sub>A</sub> и Q<sub>B</sub> по-разному. Более электроотрицательные металлы (Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>) ингибируют его, а более электроположительные (Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>) — ускоряют.

EFFECT OF HEAVY METALS ON PHOTOSYNTHESIS

*N.M. Topchiy*

M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine  
2 Tereshchenkivska St., Kyiv, 01601, Ukraine

Effect of heavy metals on photosynthesis has been presented in this review. Specific and non-specific cell responses are induced under heavy metal stress. The influence of heavy metals on pigment apparatus, electron transport, enzyme activity has been discussed. Photosystem II is one of the most sensitive part of the photosynthetic electron-transport chain under heavy metal stress. The sites of heavy metal action on donor and acceptor side of photosystem II was determined on the basis of in vitro experimental results. Investigation of chlorophyll fluorescence dark-relaxation kinetics showed that heavy metals effect in different way on electron transport between  $Q_A$  and  $Q_B$ . More electronegative metals ( $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  and  $Pb^{2+}$ ) inhibit electron transfer between  $Q_A$  and  $Q_B$  and more electropositive — ( $Cu^{2+}$  and  $Hg^{2+}$ ) exhibit stimulatory action.

*Key words:* heavy metals, photosynthesis, photosystem II.