

doi: <https://doi.org/10.15407/knit2016.04.058>

УДК 581.17:582.34

Н. Я. Кияк, Я. Д. Хоркавців

Інститут екології Карпат Національної академії наук України, Львів

ОЦІНКА ОКИСНЮВАЛЬНОГО СТРЕСУ МОХУ *POHLIA NUTANS* (HEDW.) LINDB. ЗАЛЕЖНО ВІД ВПЛИВУ ГРАВІТАЦІЇ

Досліджено стан прооксидантно-антиоксидантної системи у гаметофіті моху Pohlia nutans (Hedw.) Lindb. в умовах реальної гравітації та після клинотатування. Оцінено часову динаміку вмісту первинних та кінцевих продуктів ліпопероксидації — дієнових кон'югатів і малонового дигалдегіду в умовах модельованої мікрогравітації. Показано, що в умовах гравітаційного стресу індуктором антиоксидантної системи є пероксид водню, який стимулював підвищення каталазної та пероксидазної активності. Встановлено фазний характер реакцій прооксидантно-антиоксидантної системи в умовах клинотатування та зворотність окиснювальних процесів у післястресовий період.

Ключові слова: клинотатування, пероксид водню, ліпопероксидація, аскорбатпероксидаза, каталаза, пероксидаза, мох *Pohlia nutans*.

Після фундаментального відкриття гравічутливості рослин вивчення механізмів стійкості до впливу зміненої гравітації залишається актуальною проблемою космічної біології [8]. В умовах зміненої сили тяжіння відбуваються суттєві структурно-функціональні перебудови клітин, які призводять до порушень клітинного метаболізму і регуляції генної експресії [22]. Так, в умовах мікрогравітації виявлено зміни ультраструктури органел, зміни ліпідного та жирнокислотного складу мембран, посилення вільнорадикального окислення та збільшення активності компонентів антиоксидантної системи [2, 28]. Культивування клітин *Arabidopsis thaliana* в умовах мікрогравітації призводило до активації експресії генів аскорбатпероксидази, глутатіонпероксидази, каталази та супероксиддисмутази [21], що свідчить про індукцію неспецифічних реакцій на стресову дію гравітації. Одним із модуляторів у такій системі метабо-

лізму є активація пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ). Збалансованість між пероксидним окисленням та антиоксидантною активністю є важливою умовою збереження життєдіяльності клітин, оскільки зміщення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги як першої неспецифічної ланки у розвитку стрес-реакції є тією біологічно важливою зміною внутрішнього середовища рослинної клітини, що запускає наступні механізми захисту.

Важливу роль у трансдукції сигналу запуску захисних реакцій відіграють активні форми кисню [27]. Пероксид водню, як один із індукторів стрес-реакції, задіяний і в реакціях рослинного організму на зміну сили тяжіння. Показано, що в умовах збільшеної гравітації у культурі клітин *Arabidopsis thaliana* відбувалося суттєве збільшення вмісту H_2O_2 , якому передувало накопичення цитозольного Ca^{2+} та відбувалася Ca^{2+} -залежна активація НАДФН-оксидази [21].

Мохи впродовж тривалого часу є зручною моделлю дослідження гравічутливості рослин. Не-

зважаючи на морфологічну та функціональну специфічність їхньої організації, принципово важливим є те, що мохи виробили аналогічні з іншими вищими рослинами механізми сприйняття гравістимулу та його реалізацію відповідно до особливостей росту і будови своїх органів. Встановлено різносторонню участь гравітації у життєдіяльності мохів, включаючи тропічні ростові рухи, морфогенез гаметофіту та спорофіту, репродуктивну активність [10; 18; 29]. Показано, що в умовах зміненої сили тяжіння відбувається модуляція просторової орієнтації та морфогенезу мохів на різних етапах їх онтогенезу, змінюється градієнтний розподіл фізіологічно активних речовин у клітинах [5, 11, 15]. Виявлено істотні структурні зміни на клітинному та субклітинному рівнях в організмі мохів як в умовах реального космічного польоту, так і при симуляції ефектів мікрогравітації на клинотатах. У досліді з культурою моху *Funaria hygrometrica* Hedw. показано, що мікрогравітація впливає на структуру клітинних стінок, цитоплазматичних органел, форму клітин. Структурні зміни клітинних стінок супроводжувалися деструкцією хлоропластів, збільшенням кількості та розміру пероксисом, що неминуче призводило до старіння клітин під час тривалої дії мікрогравітації [14]. Отже, мікрогравітація і зміна величини гравітаційної сили є стресовим екологічним чинником, від якого залежать процеси цитокінезу, росту і розвитку. У таких процесах задіяні неспецифічні антиоксидантні системи захисту від окиснювальної деструкції, тому актуальним є дослідження перебігу стресової реакції в умовах клиностатування як загальної проблеми адаптації рослинного організму до змінених умов гравітації.

ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для роботи використовували гаметофори моху *Pohlia nutans* (Hedw.) Lindb., які вирощували зі спор у контрольованих умовах освітлення (2.5—3.0 тис. лк), температури (20—22 °С) та вологості (85—90 %). Чашки з 1-місячними гаметофорами орієнтували вертикально і поміщали у горизонтальний клиностат (2 об/хв) за освітлення 2000 лк на сім діб. В умовах клиностатування

об'єкт постійно дезорієнтується в полі земного тяжіння. Таким способом твориться одна із складових умов невагомості — відсутність орієнтувальної дії вектора гравітації.

Показники реакції прооксидантно-антиоксидантної системи визначали через 2 год, 24 год, 48 год, сім діб клиностатування і через добу після клиностатування.

Для визначення вмісту пероксиду водню рослинний матеріал гомогенізували, екстрагували у 50 мМ калійфосфатному буфері (рН 7.0) та інкубували з 0.1 % $Ti(SO_4)_2$. Оптичну густину розчинів визначали на спектрофотометрі Specord 210 Plus ($\lambda = 410$ нм). За контроль брали суміш, що містила 3 мл буферу і 1 мл дистильованої води. Вміст пероксиду водню встановлювали за калібрувальною кривою і виражали у мкмоль/г маси сирової речовини [19].

Пероксидне окислення ліпідів оцінювали за вмістом первинних продуктів — дієнових кон'югатів (ДК) та кінцевого продукту ліпопероксидації — малонового діальдегіду (МДА). Для визначення кількості дієнових кон'югатів рослинний матеріал гомогенізували у 0.1 М калійфосфатному буфері (рН 7.0), додавали суміш гептанізопропанол (1:1) та екстрагували протягом 20 хв. Вміст ДК визначали спектрофотометрично у гептановому шарі при довжині хвилі 232 нм та виражали у відносних одиницях абсорбції [3]. Для визначення концентрації МДА рослинний матеріал гомогенізували у 20 % розчині трихлороцтової кислоти та інкубували з 0.5 % розчином тіобарбітурової кислоти. Вміст МДА визначали спектрофотометрично на довжині хвилі 532 нм і виражали в нМ на 1 г маси сирової речовини [13].

Для визначення активності каталази рослинний матеріал екстрагували у 0.05 М трис-НСІ буфері (рН 7.8) при температурі 0—4 °С. Гомогенат центрифугували протягом 15 хв за 5000 об/хв. Активність ферменту визначали спектрофотометрично з використанням 4 % розчину молібдату амонію за довжини хвилі 410 нм. Для розрахунків застосовували коефіцієнт поглинання молібденового комплексу ($\varepsilon = 22.2$ мМ⁻¹см⁻¹) і виражали активність ферменту в мкат/л [9].

Активність пероксидаз визначали після екстракції матеріалу в 0.1 М ацетатному буфері

(рН 5.4). Гомогенат центрифугували протягом 15 хв за 5000 об/хв. Активність ферментів визначали спектрофотометрично з використанням як субстрату бензидину та гваяколу й виражали у відносних одиницях на 1 г маси сирової речовини за хвилину [12].

Активність аскорбатпероксидази оцінювали за зменшенням оптичної густини при 290 нм унаслідок окиснення аскорбату (коефіцієнт екстинції $\epsilon = 2.8 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$) та виражали в мкМ аскорб. к-ти на мг білка за хв [26]. Концентрацію білка визначали методом Бредфорда [17].

Досліди проводили у трьох повторностях. Одержані результати вважали статистично вірогідними, якщо $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

В умовах освітлення і гравітаційного поля Землі протонема *Pohlia nutans* росте по поверхні субстрату і формує радіально симетричну дернинку (рис. 1, а), причому така симетрія дернини зберігається й на стадії утворення гаметофорів. Якщо чашки Петрі з рослинами перенесли на клиностат і зняли векторну дію гравітації, гаметофори відхилялися вбік від початкового напрямку росту. Через 14 діб після клиностатування утворювалися різнонаправлені (за і проти годинникової стрілки) згини гаметофорів, і радіальна симет-

рія дернинки втрачалася (рис. 1, б). Можна допустити, що тропізми і просторова переорієнтація росту є результатом морфогенетичних змін внаслідок стресової дії зміненої сили тяжіння, що могло призвести також до порушень прооксидантно-антиоксидантного балансу клітин.

На сьогоднішній день немає інформації про роль активних форм кисню в індукції механізмів адаптації мохів до впливу зміненої сили тяжіння. Аналіз вмісту пероксиду водню у пагонах *P. nutans* після клиностатування свідчить про залежність кількості пероксиду від тривалості дії зміненої сили тяжіння: на початковому етапі реакції (через 2 год) зафіксовано досить високий вміст H_2O_2 , що майже в 1.5 рази перевищував показник рослин, які росли на світлі (рис. 2, контроль). Через 24 та 48 год концентрація пероксиду зменшувалася до 0.59 — 0.61 мг/г с.м., а на сьому добу експерименту знову спостерігалася різке збільшення вмісту АФК до 0.94 мг/г с.м. Це свідчить про фазний характер змін вмісту H_2O_2 у клітинах пагонів *P. nutans*, які розпочиналися із підвищення вмісту пероксиду на початку реакції, далі його кількість частково зменшувалася у проміжний період і знову підвищувалася у кінці реакції. Через 24 год після клиностатування концентрація пероксиду у гаметофіті знижувалася до рівня контрольних рослин, тобто відбувалася поступова стабілізація та зменшувалася напру-

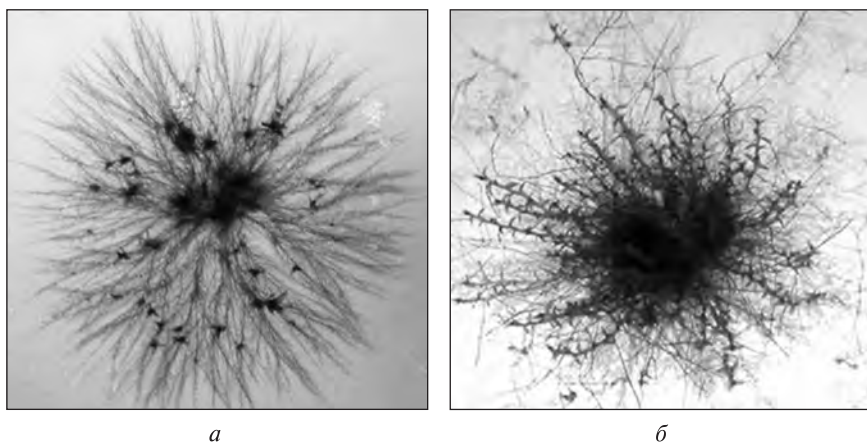


Рис. 1. Протонемна дернинка *Pohlia nutans* з бруньками гаметофорів, яка росла в умовах нормальної гравітації і освітлення (а); дернинка *Pohlia nutans* з гаметофорами після 14-добового клиностатування (б)

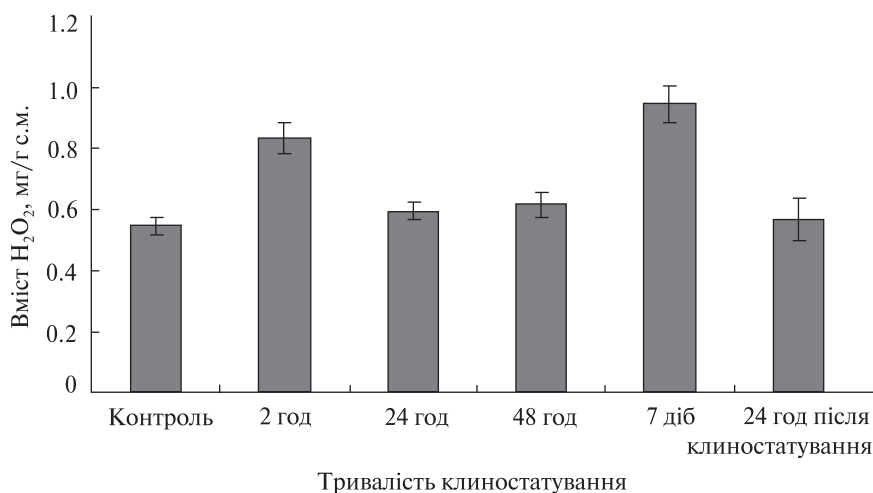


Рис. 2. Вміст перексиду водню у пагонах *P. nutans* в умовах клиностагування

женість окиснювальних процесів, ініційованих гравітаційним стресом.

Для встановлення зв'язку між вмістом H₂O₂ та станом проантиоксидантної рівноваги в умовах модельованої мікрогравітації, було досліджено показники ліпопероксидації пагонів *P. nutans*. Відомо, що у звичних умовах життєдіяльності рослин постійно є певний рівень пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ), індукований утворенням активних форм кисню. Зміщення такого рівня є першою ланкою розвитку стрес-реакції. У пагонах *P. nutans* рівень ПОЛ тестували за вмістом первинних та кінцевих продуктів ліпопероксидації — дієнових кон'югатів та малонового диальдегіду, оскільки підвищення рівня ДК у клітинах є чутливим тестом на появу гідроперексидів, а малоновий диальдегід — маркером розвитку деструктивних процесів у ліпідній компоненті мембран [25].

Виявлено, що в умовах підвищеної гравітації вміст дієнових кон'югатів підвищувався відразу з перших годин досліду і був на 30—50 % вищий, ніж у контрольному варіанті упродовж усього періоду клиностагування, а концентрація МДА збільшувалася лише на сьому добу досліду (табл. 1). Тобто, у пагонах *P. nutans* змінена сила тяжіння індукувала суттєве збільшення вмісту початкових продуктів ПОЛ, у той час як вміст кінцевих метаболітів ліпопероксидації упродовж двох діб клиностагування зберігався на

рівні контролю. Очевидно, така тривалість дії гравітаційного стресу ще лежала у межах толерантності клітин *P. nutans*. Вірогідне збільшення кількості МДА було зафіксовано лише на сьому добу клиностагування, що могло бути зумовлене частковим виснаженням ресурсів антиоксидантної системи. Однак у період післястресової дії активність прооксидантної системи знизилася майже до рівня контролю, що може свідчити про зворотність дестабілізаційних процесів у клітинах мохів після припинення впливу зміненої сили тяжіння.

Таблиця 1. Вплив клиностагування на вміст дієнових кон'югатів та малонового диальдегіду у пагонах моху *P. nutans*

Тривалість клиностагування	Вміст дієнових кон'югатів, од. абсорб.	Вміст малонового диальдегіду, нмоль/1 г сирової маси
Контроль (без клиностагу)	10.5 ± 0.8	124.6 ± 3.5
2 год	15.8 ± 0.7*	115.2 ± 2.2*
24 год	14.6 ± 0.8*	119.3 ± 3.2
48 год	15.2 ± 0.4*	129.2 ± 5.1
7 діб	16.7 ± 0.4*	143.2 ± 5.6*
24 год після клиностагування	13.1 ± 0.7	126.2 ± 4.2

Примітка: * — різниця порівняно до контролю статистично достовірна при $p < 0.05$

Як підтвердження для такого припущення став аналіз активності ферментів антиоксидантного захисту – каталази та пероксидаз із різною субстратною специфічністю, оскільки відомо, що метаболічні перетворення пероксиду у мохів регулюються пероксидазою і каталазою, активність яких стимулюють іони Ca^{2+} , Cu^{2+} та деякі амінокислоти [16]. Каталаза специфічна лише до пероксиду водню і відповідає за видалення його надлишку в умовах біогенного та абіогенного стресів [6]. Мікрогравітація суттєво вплинула на модифікацію каталазної активності: на початку клинонотатування (2 год) зафіксовано активність на рівні контролю, через 24 та 48 год спостерігали її підвищення в 1.4–1.8 разів, і на сьому добу впливу зміненої сили тяжіння відбувався спад активності (табл. 2), що свідчить про зменшення конститутивного пулу фермента. Тобто, аналізуючи динаміку вмісту пероксиду водню та каталазну активність, встановлено зв'язок між концентрацією пероксиду в клітинах та активністю каталази.

Пероксидази — багатофункціональні ферменти, які беруть участь у захисті організму від окиснювального стресу, контролюють ріст рослин, їхню диференціацію та розвиток упродовж різних стадій онтогенезу [20]. Відомо, що індивідуальні пероксидази відрізняються за специфічністю до субстрату, що пов'язане зі зміною заряду і конфігурації фермента та каталітичними властивостями субстрату при різних значеннях рН [4]. У роботі використали три типи субстрату:

бензидин, до якого вищу специфічність мають аніонні пероксидази, гваякол — для катіонних пероксидаз та аскорбат — для оцінки активності аскорбатпероксидази. На початкових етапах росту рослин в умовах мікрогравітації (2 год) реакція гваяколпероксидази та бензидинпероксидази була подібною, за винятком незначного зниження активності, порівняно з контролем.

Через 24 та 48 годин після клинонотатування спостерігали поступове підвищення пероксидазної активності, причому активність гваяколпероксидази збільшувалася істотніше (табл. 2). Відмінності у пероксидазній активності виявлені й на сьому добу впливу мікрогравітації: знижувалася активність бензидин-залежної пероксидази, тоді як активність гваяколпероксидази залишалася високою.

Відомо, що гваяколпероксидаза локалізується у цитозолі, вакуолях, клітинній стінці, задіяна у процесах росту й розвитку рослини та відіграє ключову роль у поляризації клітин як відповідь на гравістимул, впливаючи на реорганізацію мікрофібрил клітинної стінки [30]. Підвищення активності гваяколпероксидази в умовах зміненої гравітації свідчить про участь пероксидаз в адаптації рослин до гравітаційного стресу і може бути зумовлене як наростанням процесів вільнорадикального окислення, що також було показано у численних дослідях при моделюванні ефектів мікрогравітації [2, 24], так і засобом пристосування організму до зміни положення відносно вектора гравітації.

Таблиця 2. Вплив клинонотатування на активність ферментів антиоксидантного захисту у пагонах моху *P. nutans*

Тривалість клинонотатування	Активність каталази, мкМ H_2O_2 /мг білка/хв	Активність гваякол-пероксидази, відн. од./1 г сирової маси/хв	Активність бензидин-пероксидази, відн. од./1 г сирової маси/хв	Активність аскорбат-пероксидази, (мкМ аскорб. к-ти/мг білка/хв)
Контроль (без клинонотату)	0.198 ± 0.022	32.5 ± 2.7	16.8 ± 1.8	0.198 ± 0.012
2 год	0.182 ± 0.019	30.1 ± 3.3	13.9 ± 1.2*	0.269 ± 0.021*
24 год	0.362 ± 0.041*	39.6 ± 3.7	18.2 ± 1.5	0.285 ± 0.019
48 год	0.273 ± 0.017*	48.9 ± 2.8	17.6 ± 1.8	0.237 ± 0.023*
7 діб	0.169 ± 0.018*	51.6 ± 2.9*	11.7 ± 0.9*	0.189 ± 0.016*
24 год після клинонотатування	0.185 ± 0.011	44.2 ± 3.6*	12.4 ± 1.1*	0.191 ± 0.002*

Примітка: * — різниця порівняно до контролю статистично достовірна при $p < 0.05$.

У групі пероксидаз важливу роль у мінімізації окисного пошкодження за дії стресорів різної природи відіграє фермент аскорбат-глутатионового циклу – аскорбатпероксидаза, що каталізує відновлення пероксиду водню до води за участю аскорбінової кислоти як специфічного донора протонів. Вона є одним із основних ферментів, що утилізує пероксид водню в рослинах [23]. Реакція цього фермента на вплив зміненої сили тяжіння відрізнялася від каталазної та пероксидної активності на початкових етапах клиностатування. Показано, що у пагонах *P. nutans* відбувалося збільшення активності аскорбатпероксидази відразу з перших годин досліду з максимумом на 24 годину. Надалі відбувався поступовий спад активності і вже на сьому добу клиностатування активність була на рівні контролю.

Зіставивши динаміку активності антиоксидантних ферментів із вмістом пероксиду водню та інтенсивністю ліпопероксидації, які виявлено в умовах впливу зміненої сили тяжіння на рослини *P. nutans*, можна зробити висновок про стресову природу дії клиностатування та участь захисної ферментативної системи в адаптації рослин до гравітаційного стресу. Індуктором активації антиоксидантної системи є пероксид водню, оскільки у наших експериментах чітко простежувалося суттєве збільшення його вмісту на початкових етапах впливу змодельованої мікрогравітації. Впродовж досліду виявлено фазний характер змін (про-) антиоксидантної рівноваги.

Для першої фази (2 год клиностатування) характерне збільшення вмісту пероксиду та низька активність ферментів-антиоксидантів. У другій фазі стресової реакції (24–48 год клиностатування) відбувалася певна стабілізація рівноваги між накопиченням АФК та функціонуванням антиоксидантної системи унаслідок підвищення каталазної та пероксидазної активності. Цей період можна розглядати як стан підвищеної резистентності рослин до стресу. Під час третьої фази (сім діб клиностатування) у пагонах *P. nutans* включалася вторинна індукція ПОЛ, яка проявилася як у повторному збільшенні вмісту пероксиду водню, так і у накопиченні

малонового диальдегіду, що зумовлено виснаженням резервного пулу антиоксидантів. Хоча на цій стадії зафіксовано підвищену активність гваяколпероксидази, рівень прооксидантної активності виявився досить високим. Аналіз показників активності ферментів показує, що на початкових етапах клиностатування активну роль у ліквідації пероксиду водню відіграє аскорбатпероксидаза, а зниження її активності компенсувалося активізацією інших механізмів, насамперед підвищеною активністю каталази. Очевидно, каталаза виконує ключову роль у знешкодженні пероксиду у пагонах *P. nutans*, оскільки динаміка активності каталази чітко відтворює зміни концентрації пероксиду водню у пагонах рослин під час клиностатування.

Раніше фазність змін (про-) антиоксидантної рівноваги судинних рослин під впливом мікрогравітації встановлена В. А. Барабой із колегами [1]. Фази гравітаційного стресу автори порівнювали із фазами загального адаптаційного синдрому Г. Сельє і дійшли до висновку, що медіатором запуску такої стресової реакції є продукти перекисного окислення ліпідів. Подібні результати були отримані у випадку вивчення формування теплостійкості після короткотривалого впливу гіпертермії на рослини [7]. Отже, ранні реакції мохів на порушення векторної направленості сили тяжіння подібні до впливу на рослинні організми інших абіотичних чинників. Очевидно, така неспецифічність реакцій зумовлена активацією сигнальних систем, які функціонують за єдиним принципом та індукують відповідь рослин на стресори різної природи. Тому захисні реакції мохів можна розглядати як зручну модель для екофізіологічних досліджень розвитку рослин, включаючи гравічутливість і гравітропізми, в умовах зміненої дії сили тяжіння.

Варто уваги й те, що після клиностатування наставала стабілізація стану (про-) антиоксидантної системи, функціональна активність ключових ферментів антиоксидантного захисту повернулася майже до рівня контролю, що свідчить про репарацію фізіологічних і метаболічних клітинних процесів після гравітаційного стресу і підвищення індивідуальної стійкості до зміни вектора гравітаційної сили.

ВИСНОВКИ

В умовах зміненої сили тяжіння для рослин *P. nutans* встановлено фазну закономірність зміни прооксидантно/антиоксидантної рівноваги залежно від тривалості клиностагування.

У перші години клиностагування (2—24 год) зафіксовано збільшення вмісту пероксиду водню та початкових продуктів ліпопероксидації — дієнових кон'югатів. Вірогідне збільшення кількості кінцевого метаболіту ПОЛ малонового діальдегіду відбувалося на сьому добу клиностагування.

Індуктором активації антиоксидантної системи був пероксид водню. На початкових етапах впливу гравітаційного стресу активну роль у ліквідації пероксиду водню виконувала аскорбатпероксидаза, а згодом зниження її активності компенсувалося підвищеною реакцією каталази. Отже, каскадний характер ферментативних реакцій є важливим фактором регулятивних процесів в умовах зміненої сили тяжіння.

Після припинення впливу клиностагування функціональна активність антиоксидантної системи відновилася до рівня контролю, що свідчить про зворотність біохімічних процесів, як важливого фактора адаптивної стратегії рослин у змінених екологічних умовах, залежних від гравітації.

1. Барабой В. А., Жадько С. И., Кордюм Е. Л., Сидоренко П. Г. Перекисное окисление липидов растений различного уровня организации при микрогравитационном стрессе // Изв. АН СССР. Сер. Биологическая. — 1991. — 3. — С. 368—375.
2. Бараненко В. В. Пероксидне окиснення ліпідів та активність супероксиддисмутази в рослинах гороху за умов кліностагування: Автореф. дис... канд. біол. наук. — К., 2003. — 24 с.
3. Гаврилов В. Б., Мишкорудная М. И. Спектрофотометрическое определение содержания гидропероксидов липидов в плазме крови // Лаб. дело. — 1983. — № 3. — С. 33—35.
4. Газарян И. Г., Хушпульян М., Тишков В. И. Особенности структуры и механизма действия пероксидаз растений // Успехи биологической химии. — 2006. — 46. — С. 303—322.
5. Демків О. Т., Хоркавіців Я. Д., Кияк Н. Я., Кім Н. А. Вплив гравітації на фотоморфогенез протонеми *Pohlia intermedia* (Turn.) Furnr., Pottiales // Укр. ботан. журн. — 2005. — 62, № 3. — С. 329—336.
6. Дмитрієв О. П., Кравчук Ж. М. Активні форми кисню та імунітет рослин // Цитология и генетика. — 2005. — 4. — С. 64—74.
7. Карпец Ю. В., Колупаев Ю. Е. Ответ растений на гипертермию: молекулярно-клеточные аспекты // Вестник Харьков. нац. аграр. ун-та. Сер. Биология. — 2009. — 1, 16. — С. 19—38.
8. Кордюм Е. Л., Сытник К. М., Бараненко В. В. и др. Клеточные механизмы адаптации растений к неблагоприятным воздействиям экологических факторов в естественных условиях. — Киев: Наук. думка, 2003. — 290 с.
9. Королюк К. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г. и др. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. — 1988. — № 1. — С. 16—19.
10. Лобачевська О. В., Хоркавіців Я. Д. Гравічутливість в онтогенезі мохів // Космічна наука і технологія. — 2014. — 20, № 5. — С. 55—60.
11. Лобачевська О. В., Хоркавіців Я. Д., Кияк Н. Я. и др. Гравіморфогенез гаметофіту мохів // Космічна наука і технологія. — 2015. — 21, № 4. — С. 94—102.
12. Методы биохимического исследования растений / Под ред. А. И. Ермакова. — 3 изд., перераб. и доп. — Л.: Агропромиздат, 1987. — 430 с.
13. Мусиенко М. М., Паршикова Т. В., Славный П. С. Спектрофотометрические методы в практике физиологии, биохимии и экологии растений. — К.: Фитосоциос-центр, 2001. — 200 с.
14. Недуха О. М. Клітинна оболонка рослин і фактори середовища. — Київ: Альтерпрес, 2015 — 289 с.
15. Хоркавіців Я. Д., Демків О. Т. Вплив інгібіторів ауксинового транспорту на гравітропізм протонеми *Pohlia nutans* (Hedw.) // Космічна наука і технологія. — 2003. — 8. — С. 77—82.
16. Barkasdjieva N. T., Chrostov K. N., Christina K. N. Effect of calcium and zinc on the activity and thermostability of superoxide dismutase and peroxidase // Biol. Plant. — 2009. — N 43. — P. 73—78.
17. Bradford M. A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal Biochem. — 1976. — 72. — P. 248—254.
18. Demkiv O. T., Kordyum E. L., Kardash O. R., Khorkavtsiv O. Ya. Gravitropism and phototropism in protonemata of the moss *Pohlia nutans* (Hedw.) Lindb. // Adv Space Res. — 1999. — 23, N 12. — P. 1999—2004.
19. Gechev T. S., Hille J. Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death // J. Cell. Biol. — 2005. — 168, N 1. — P. 17—20.
20. Ghamsari L., Keyhani E., Golkhoo S. Kinetics properties of guaiacol peroxidase activity in *Crocus sativus* L. corm

- during rooting // Iranian Biomedical J. — 2007. — **11**, N 3. — P. 137—146.
21. Hausmann N., Fengler S., Hennig A., et al. Cytosolic calcium, hydrogen peroxide and related gene expression and protein modulation in Arabidopsis thaliana cell cultures respond immediately to altered gravitation: parabolic flight data // Plant Biol (Stuttg). — 2014. — **16**. — P. 120—128.
 22. Kordyum E. L. Plant cell gravisensitivity and adaptation to microgravity // Plant. Biol. — 2014. — **16**, N 1. — P. 79—90.
 23. Madhava Rao K. V., Raghavendra S., Janardhan Reddy K. Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants. — Springer, 2006. — 345 p.
 24. Martzivanou M., Babbick M., Cogoli-Greuter M., Hampp R. Microgravity-related changes in gene expression after short-term exposure of Arabidopsis thaliana cell cultures // Protoplasma. — 2006. — **27**. — P. 229—239.
 25. Miller G., Shulaev V., Mittler R. Reactive oxygen signaling and abiotic stress // Physiologia Plantarum. — 2008. — **133**. — P. 481—489.
 26. Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts // Plant Cell Physiol. — 1981. — **22**, N 5. — P. 867—880.
 27. Neill S. J., Desikan R., Clarke A., et al. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants // J. Experimental Botany. — 2002. — **53**. — P. 1237—1247.
 28. Nikawa T., Ishidoh K., Hirasaka K., et al. Skeletal muscle gene expression in space-flown rats // FASEB J. — 2004. — **18**. — P. 522—524.
 29. Ripetskyj R. T., Kit N. A., Chaban C. I. Gravity effects on the growth and development of moss secondary protonemata // Adv. Space Res. — 1998. — **21**, N 8/9. — P. 1135—1139.
 30. Vreeland V., Kwan N. Marine algal vanadium peroxidase: Substratum adhesion and active recombinant catalytic domain // Thesis of Conference “Peroxidase 99” (July 17—21, 1999, Columbus, Ohio USA). — P. 234—235.
 4. Gazaryan I. G., Khushpul'yan D. M., and Tishkov V. I. Features of the structure and mode of action of peroxidases in plants. Usp. Biol. Khim., **46**, 303—322 (2006) [in Russian].
 5. Demkiv O. T., Khorkavtsiv Ya. D., Kyiak N. Ya., Kit N. A. Effect of gravity on photomorphogenesis of protonemata Pottia intermedia (Turn.) Fűrnr., Pottiales. Ukrainian Botanical Journal, **62** (3), 329—336 (2005) [in Ukrainian].
 6. Dmitriev O. P., Kravchuk Zh. M. Reactive oxygen species and plant immunity. Cytology and Genetics, **39** (4), 64—74 (2005) [in Ukrainian].
 7. Karpets Yu. V., Kolupaev Yu. Ye. Respons of plants on heating: molecular-cellular aspects. The Bulletin of Kharkiv national agrarian university. Ser. Biology, Is. 1 (16), 19—38 (2009) [in Russian].
 8. Kordyum E. L., Sytnik K. M., Baranenko V. V., et al. Cellular mechanisms of plant adaptation to the adverse effects of environmental factors in vivo, 290 p. (Nauk. dumka, Kiev, 2003) [in Russian].
 9. Korolyuk M. A., Ivanova L. I., Mayorova I. G., and Tokareva V. E. Method for Determining the Activity of Catalase. Lab. delo, No. 1, 16—19 (1988)
 10. Lobachevska O. V., Khorkavtsiv Ya. D. Gravisensitivity in the moss ontogenesis. Kosm. nauka tehnol., **20** (5), 55—60 (2014) [in Ukrainian].
 11. Lobachevska O. V., Khorkavtsiv Ya. D., Kyiak N. Ya., Kit N. A., Danylkiv I. S. Gravimorphogenesis gametophytes of mosses. Kosm. nauka tehnol., **21** (4), 94—102 (2015) [in Ukrainian].
 12. Ermakov A. I. (Ed.) Methods of Biochemical Plant Research, 3rd revised and enlarged edition, 430 p. (Agropromizdat, Leningrad, 1987) [in Russian].
 13. Musienko M. M., Parshikova T. V., Slavnyj P. S. Spectrophotometric Methods in Practice, Physiology, Biochemistry and Ecology of Plants, 200 p. (Fitosotsiotsentr, Kyiv, 2001) [in Russian].
 14. Nedukha O. M. Plant cell wall and environment, 289 p. (Alterpress, Kyiv, 2015) [in Ukrainian].
 15. Khorkavtsiv Ya. D., Demkiv O. T. The effects of auxin transport inhibitors on gravitropism in photonemata of the moss Pohlia nutans (Hedw.). Kosm. nauka tehnol., **9** (2-3), 77—82 (2003) [in Ukrainian].
 16. Barkasdjieva N. T., Chrostov K. N., Christina K. N. Effect of calcium and zinc on the activity and thermostability of superoxide dismutase and peroxidase. Biol. Plant., N 43, 73—78 (2009).
 17. Bradford M. A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem., **72**, 248—254 (1976).
 18. Demkiv O. T., Kordyum E. L., Kardash O. R., Khorkavtsiv O. Ya. Gravitropism and phototropism in protonemata

Стаття надійшла до редакції 24.06.16

REFERENCES

1. Baraboi V. A., Zhad'ko S. I., Kordyum E. L., Sidorenko P. G. Lipid peroxidation in plants of different organization levels under microgravity stress. Izv. Akad. Nauk SSSR Ser. Biol., **3**, 368—375 (1991) [in Russian].
2. Baranenko V. V. Lipid peroxidation intensity and superoxide dismutase activity in pea plants under clinorotation: Extended abstract of candidate's thesis, 24 p. (Kiev, 2003) [in Ukrainian].
3. Gavrilov V. B., Mishkorudnaya M. I. Spectrofotometric determination of lipid hydroperoxides level in plasma of blood. Laboratornoe delo, No. 3, 33—35 (1983) [in Russian].

- of the moss *Pohlia nutans* (Hedw.) Lindb. *Adv Space Res.*, **23** (12), 1999—2004 (1999).
19. Gechev T. S., Hille J. Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. *J. Cell. Biol.*, **168** (1), 17—20 (2005).
 20. Ghamsari L., Keyhani E., Golkhoo S. Kinetics properties of guaiacol peroxidase activity in *Crocus sativus* L. corm during rooting. *Iranian Biomedical J.*, **11** (3), 137—146 (2007).
 21. Hausmann N., Fengler S., Hennig A., Franz-Wachtel M., Hamp R., Neef M. Cytosolic calcium, hydrogen peroxide and related gene expression and protein modulation in *Arabidopsis thaliana* cell cultures respond immediately to altered gravitation: parabolic flight data. *Plant Biol (Stuttgart)*, **16**, 120—128 (2014).
 22. Kordyum E. L. Plant cell gravisensitivity and adaptation to microgravity. *Plant. Biol.*, **16** (1), 79—90 (2014).
 23. Madhava Rao K. V., Raghavendra S., Janardhan Reddy K. Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants, 345 p. (Springer, 2006).
 24. Martzivanou M., Babbick M., Cogoli-Greuter M., Hamp R. Microgravity-related changes in gene expression after short-term exposure of *Arabidopsis thaliana* cell cultures. *Protoplasma*, **27**, 229—239 (2006).
 25. Miller G., Shulaev V., Mittler R. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiologia Plantarum*, **133**, 481—489 (2008).
 26. Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, **22** (5), 867—880 (1981).
 27. Neill S. J., Desikan R., Clarke A., Hurst R. D., Hancock J. T. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J. Experimental Botany*, **53**, 1237—1247 (2002).
 28. Nikawa T., Ishidoh K., Hirasaka K., Ishihara I., Ike-moto M., Kano M., Kominami E., Nonaka I., Ogawa T., Adams G. R., Baldwin K.M., Yasui N., Kishi K., Takeda S. Skeletal muscle gene expression in space-flown rats. *FASEB Journal*, **18**, 522—524 (2004).
 29. Ripetskyj R. T., Kit N. A., Chaban C. I. Gravity effects on the growth and development of moss secondary protonema. *Adv. Space Res.*, **21** (8/9), 1135—1139 (1998).
 30. Vreeland V., Kwan N. Marine algal vanadium peroxidase: Substratum adhesion and active recombinant catalytic domain. *Thesis of Conference "Peroxidase 99"* (July 17—21, 1999, Columbus, Ohio USA), 234—235 (1999).

Н. Я. Кияк, Я. Д. Хоркавиц

Институт экологии Карпат
Национальной академии наук Украины, Львов

ОЦЕНКА ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА МХА *POHLIA NUTANS* (HEDW.) LINDB. В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВЛИЯНИЯ ГРАВИТАЦИИ

Исследовано состояние прооксидантно-антиоксидантной системы в гаметофите мха *Pohlia nutans* (Hedw.) Lindb. в условиях реальной гравитации и после клинотатирования. Оценена временная динамика содержания первичных и конечных продуктов липопероксидации — диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в условиях моделируемой микрогравитации. Показано, что в условиях гравитационного стресса индуктором антиоксидантной системы является пероксид водорода, который стимулировал повышение каталазной и пероксидазной активности. Установлен фазный характер реакций прооксидантно-антиоксидантной системы в условиях клинотатирования и обратимость окислительных процессов в послестрессовый период.

Ключевые слова: клинотатирование, пероксид водорода, липопероксидация, аскорбатпероксидаза, каталаза, пероксидаза, мох *Pohlia nutans*.

N. Ya. Kyiak, Ya. D. Khorkavtsiv

Institute of Ecology of the Carpathians
of the National Academy of Science of Ukraine, Lviv

ESTIMATION OF THE OXIDATIVE STRESS IN MOSS *POHLIA NUTANS* (HEDW.) LINDB. DEPENDING ON THE INFLUENCE OF GRAVITY

The state of a prooxidant-antioxidant system in the moss gametophyte *Pohlia nutans* (Hedw.) Lindb. in a real gravity and after clinorotation was investigated. The temporal dynamic of the lipid peroxidation primary and final products — diene conjugates and malonic dialdehyde was estimated under conditions of simulated microgravity. It is shown that the inducer of an antioxidant system in the conditions of gravitational stress is hydrogen peroxide, which causes the increase in catalase and peroxidase activity. It was ascertained a phase character of the prooxidant-antioxidant system reactions during clinorotation and reversibility of oxidative processes after stress.

Key words: clinorotation, hydrogen peroxide, lipid peroxidation, ascorbate peroxidase, catalase, peroxidase, moss *Pohlia nutans*.