

УДК 577.152:581.142

ВМІСТ ФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК У НАСІННІ СОЇ ПРИ ПРОРОСТАННІ ЗА ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ, СПРИЧИНЕНОГО ВПЛИВОМ ІОНІВ КОБАЛЬТУ І КАДМІЮ

О.Ф. ЧЕЧУЙ

Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна
61077 Харків, пл. Свободи, 4

Досліджено вплив іонів кобальту і кадмію на вміст фенольних сполук у насінні сої при проростанні. Виявлено збільшення їх вмісту за дії іонів кобальту і кадмію в умовах оксидативного стресу. Іони кадмію підвищують вміст фенольних сполук з 3-ї, іони кобальту — з 1-ї доби проростання насіння сої, що може бути пов'язано із сильнішим прооксидантним ефектом іонів кобальту.

Ключові слова: *Glycine max* (L.) Merr., фенольні сполуки, ТБК-активні продукти, йодне число, кобальт, кадмій.

Багато технологічних процесів супроводжується забрудненням довкілля солями важких металів, а також металів змінної валентності [6, 14]. Незважаючи на різні механізми токсичної дії важких металів, для них характерно, що в разі надходження в організм вони порушують рівновагу системи прооксиданти—антиоксиданти, зменшують вміст антиоксидантів, спричинюють вільнорадикальне окиснення, внаслідок чого може розвиватися оксидативний стрес, за якого активуються фізіологічні й біохімічні системи адаптації метаболізму та відновлення гомеостазу [12].

Фенольні сполуки беруть участь у забезпеченні стійкості рослин до екстремальних умов навколишнього середовища. Зокрема, досліджено їх властивості як ендогенних регуляторів фізіологічних процесів за дії несприятливих чинників довкілля. Тому серед механізмів забезпечення стійкості рослин до дії важких металів привертає увагу метаболізм різних фенольних сполук [16]. У науковій літературі є дані стосовно накопичення фенольних сполук за дії іонів кадмію [8]. На підставі антиоксидантних властивостей фенольних сполук та їх здатності до взаємодії з іонами важких металів [19] можна припустити їх роль у знешкодженні гіперпродукції активних форм кисню в умовах оксидативного стресу, спричиненого іонами важких металів.

Мета роботи — вивчення впливу іонів кобальту і кадмію на вміст фенольних сполук у насінні сої при проростанні за умов оксидативного стресу, спричиненого їх дією.

Методика

Експерименти проведено на модельній системі — сім'ядолях *Glycine max* (L.) Merr. сорту Кларк урожаю 2006 р. Насіння незаражували зануренням у 2,5 %-й розчин гіпохлориту натрію на 2 хв, після чого промива-

ли 0,05 М розчином HCl упродовж 20–30 с і тричі — дистильованою водою. Його пророщували упродовж 5 діб за температури 23 ± 2 °С в термостаті у рулонах фільтрувального паперу, змоченого дистильованою водою (контроль); стрес моделювали зануренням насіння в розчини, що містили хлорид кобальту або хлорид кадмію концентрацією 100 мкМ [10]. Концентрацію іонів водню підтримували сталою. Розчини солей попередньо витримували в автоклаві за робочого тиску 50 кПа упродовж 30 хв. В експериментах досліджували сім'ядолі сої після 1, 3 і 5 діб пророщування. Вміст фенольних сполук визначали з використанням реактиву Фоліна—Деніса [7] і розраховували за калібрувальною кривою, побудованою за хлорогеновою кислотою як стандартом. Про інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) судили за накопиченням ТБК-активних продуктів у безбілкових центрифугатах за реакцією з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) з подальшим визначенням оптичної густини при 532 нм [1]. Йодне число визначали титриметрично [4]. Число експериментів — 5–7, у кожному варіанті їх повторювали тричі. Результати оброблено статистично методом варіаційної статистики ANOVA з використанням пакета програм «Statistica 6.0».

Результати та обговорення

Згідно з даними аналізу (табл. 1), у контролі вміст фенольних сполук підвищувався на 3-тю і 5-ту добу в середньому відповідно в 1,48 і 1,98 раза відносно показників 1-ї доби. Під впливом іонів кобальту він збільшувався в середньому на 37 % вже на 1-шу добу, на 3-тю — зростав порівняно з контролем і показниками 1-ї доби в середньому відповідно на 26 і 38 %, продовжував підвищуватись і на 5-ту добу.

Головним діючим агентом, що забезпечує здатність фенольних антиоксидантів гальмувати вільнорадикальні процеси окиснення, є гідроксильна група, приєднана до ароматичного ядра, з рухливим атомом водню. Антиоксидантний ефект поліфенолів реалізується і за наявності інших окисно-відновних пар.

Реакція вищих рослин на зміну зовнішніх чинників включає численні фізіолого-біохімічні процеси, які контролюються також фітогормонами [15]. Так, доведено, що екзогенний кобальт здатний впливати на фітогормональний статус рослин: встановлено зниження рівня індолілоцтової кислоти, яка є фенольною сполукою [11]. При цьому вільні радикали, утворені під дією кобальту як металу зі змінною валентністю, ймовірно, можуть бути тригером, що запускає гормональні зміни.

Найраніші реакції на дію стрес-чинників відбуваються на рівні мембран, які першими зазнають пошкоджень [9]. Початковим етапом роз-

ТАБЛИЦЯ 1. Зміна вмісту фенольних сполук у насінні сої при проростанні за впливу кобальту і кадмію (мкг хлорогенової кислоти/г тканини). $M \pm m$, $n = 6...7$

Чинник	Доба проростання		
	1-ша	3-тя	5-та
Контроль	107,3 ± 8,2	164,6 ± 10,4 [#]	213,2 ± 21,6 [#]
Кобальт	146,5 ± 12,9 [*]	203,1 ± 14,2 ^{*#}	281,0 ± 30,2 [#]
Кадмій	123,2 ± 11,8	252,1 ± 19,4 ^{*#}	347,3 ± 26,2 ^{*#}

П р и м і т к а. Тут і в табл. 2, 3: * — $p \leq 0,05$ вірогідно відносно контролю; # — $p \leq 0,05$ — вірогідно відносно результатів на 1-шу добу.

ТАБЛИЦЯ 2. Зміна вмісту ТБК-активних продуктів у насінні сої при проростанні за впливу кобальту і кадмію (нмоль/г тканини). $M \pm m$, $n = 6$

Чинник	Доба проростання		
	1-ша	3-тя	5-та
Контроль	20,4 ± 1,5	19,8 ± 1,7	25,3 ± 1,8
Кобальт	39,9 ± 3,7*	56,1 ± 3,1*#	68,2 ± 3,9*#
Кадмій	24,9 ± 2,5	41,2 ± 3,2*#	52,1 ± 4,1*#

витку ПОЛ є інтенсифікація утворення вільних радикалів у клітинах за умов стресу. Тому ми визначали один із показників ПОЛ, а саме — вміст ТБК-активних продуктів, оскільки він є найадекватнішим тестом на процеси ліпопероксидації. Ми з'ясували, що цей показник за дії іонів кобальту (табл. 2) збільшується вже на 1-шу добу в середньому вдвічі, що підтверджує розвиток оксидативного стресу.

Аналіз даних, наведених у табл. 1, свідчить, що під впливом іонів кадмію на 3-тю добу проростання насіння вміст фенольних сполук у ньому підвищується в середньому в 1,76 раза відносно контрольних показників і в 2 рази відносно показників 1-ї доби, на 5-ту — відповідно в 1,87 і 2,74 раза.

В літературі є дані про зміни вмісту окремих класів фенольних сполук за дії іонів кадмію. Так, у праці [14] виявлено індукцію ціанідину за дії іонів кадмію і збільшення антоціанової зони, що цікаво для з'ясування адаптивної ролі антоціанів. Підставою для такого припущення є антиоксидантні властивості антоціанів і здатність флавоноїдів контролювати рівень пероксиду водню, що підвищується [18]. Особливістю будови антоціанів, до яких належить ціанідин, є наявність великої кількості гідроксильних груп. Вміст фенольних сполук за дії іонів кадмію збільшується в різних видах рослин [8, 16].

Зростання вмісту фенольних сполук за дії іонів кадмію на 3-тю добу проростання насіння сої можна пояснити збільшенням вмісту ТБК-активних продуктів (див. табл. 2), що свідчить про оксидативний стрес за цих умов. Припускають посилення процесів окиснювальної полімеризації фенольних сполук за оксидативного стресу, що може призводити до уповільнення росту розтягуванням [13].

Крім того, в системі поліфенол—поліфенолоксидаза відбувається неферментативне дезамінування амінокислот за участю хлорогенової кислоти [5, 7]. У нашій попередній роботі ми підтвердили це, дослідивши активність ферментів азотного метаболізму, зокрема аспаргатаміно-трансферази та аланінаміно-трансферази за дії іонів кобальту і кадмію. Зроблено висновок, що іони обох металів призводять до зниження активності зазначених ферментів у насінні на 5-ту добу проростання. Підвищення їх активності на 1-шу добу проростання насіння можна розглядати як захисну реакцію на дію стресових чинників.

Однією з причин індукції фенольного обміну може бути підвищення активності ключового ферменту цієї ланки метаболізму — фенілаланінаміази, що спостерігається за стресових умов [16]. Не виключений прояв регуляторних властивостей сполук фенольної природи [19]. Врахувавши антиоксидантні властивості фенольних сполук, а також їх здатність до взаємодії з іонами металів [17], можна припустити захисну роль цих сполук за дії оксидативного стресу, спричиненого іонами важких металів, якими є кобальт, кадмій.

СОДЕРЖАНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

ТАБЛИЦА 3. Зміна йодного числа в насінні сої при проростанні за впливу кобальту і кадмію. $M \pm m, n = 5$

Чинник	Доба проростання		
	1-ша	3-тя	5-та
Контроль	295,0 \pm 13,1	316,8 \pm 18,4	231,3 \pm 10,5 [#]
Кобальт	268,4 \pm 20,7	225,1 \pm 14,1*	142,6 \pm 9,4* [#]
Кадмій	271,1 \pm 12,0	212,7 \pm 9,5* [#]	163,2 \pm 10,4* [#]

Оскільки вільні радикали утворюються й під час нормальних метаболічних процесів [9], порушення роботи ферментів-оксидаз унаслідок їх часткової денатурації також може бути однією з причин збільшення вмісту вільних радикалів у клітинах. У нашому експерименті такі явища можуть бути наслідком дії іонів важких металів, а саме кобальту і кадмію. Насамперед окиснюються ненасичені жирнокислотні залишки фосфоліпідів [9], що підтверджено також нашими експериментальними даними з визначення йодного числа (табл. 3). Встановлено, що йодне число на 3-тю і 5-ту добу проростання насіння сої під впливом іонів кобальту і кадмію зменшується відносно контрольних показників. Це, можливо, пов'язано з тим, що поліненасичені жирні кислоти в насінні бобових, зокрема сої, під впливом солей металів активніше окиснюються в реакції, каталізованій ліпоксигеназами [5]. Крім того, насичені жирні кислоти теж можуть піддаватись активній десатурації і поповнювати фонд поліненасичених жирних кислот, що вивільнюються під час гідролізу триацилгліцеридів, мобілізацію яких було досліджено в нашій попередній роботі [3]. Збільшення вмісту продуктів ПОЛ, а саме ТБК-активних речовин, корелює зі зменшенням показника ненасиченості жирнокислотних залишків фосфоліпідів під впливом важких металів, що вказує на розвиток оксидативного стресу в умовах експерименту і може негативно впливати на функціонування мембран загалом.

Таким чином, за умов оксидативного стресу, спричиненого іонами кобальту і кадмію, вміст фенольних сполук збільшується за дії іонів кадмію з 3-ї доби, а кобальту — вже з 1-ї доби проростання насіння сої, що можна пояснити сильнішим прооксидантним ефектом останнього.

1. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма. — СПб.: ИКФ Фолиант, 2001. — 232 с.
2. Бездудная Е.Ф. Влияние тяжелых металлов на активность аминотрансфераз и интенсивность перекисного окисления липидов в прорастающих семенах сои (*Glycine max* L.) // Вісн. Харків. ун-ту ім. В.Н. Каразіна. Сер. Біологія. — 2007. — 5, № 768. — С. 10—14.
3. Бездудная Е.Ф. Динамика липидов в семенах сои при прорастании // Там само. — 2005. — 1—2, № 709. — С. 22—27.
4. Безубов Л.П. Химия жиров. — М.: Пищ. пром-сть, 1975. — 280 с.
5. Гудвин Т., Мурсер Э. Введение в биохимию растений / Пер. с англ. В 2 т. — М.: Мир, 1986. — 393 с.
6. Гуральчук Ж.З. Фітотоксичність важких металів та стійкість рослин до їх дії. — К.: Логос, 2006. — 208 с.
7. Запрометов М.Н. Основы биохимии фенольных соединений. — М.: Высш. шк., 1974. — 214 с.
8. Кобилецька М., Терек О. Вплив іонів кадмію на вміст фенольних сполук та вільного проліну в рослинах кукурудзи // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. Біологія. — 2002. — Вип. 28. — С. 311—316.
9. Колупаєв Ю.Є. Стресові реакції рослин (молекулярно-клітинний рівень). — Харків: Вид-во Харків. аграр. ун-ту, 2001. — 173 с.

10. Костишин С.С., Марченко М.М., Руденко С.С. та ін. Антипероксидантно-пероксидантний статус як критерій адаптації рослин до позаоптимальних факторів // Фізіологія рослин в Україні на межі тисячоліть. — К.: Фітосоціоцентр. — 2001. — Вип. 2. — С. 52—66.
11. Леонова Л.А., Романцев Л.В. Влияние ауксина на содержание полифенолов в каллусной ткани табака при прорастивании в суспензионной культуре // Физиология растений. — 1970. — 17, вып. 5. — С. 731—737.
12. Меньшикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. и др. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. — М.: Слово, 2006. — 556 с.
13. Скулачев В.П. Явления запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода // Соросовский общобразовательный журн. — 2001. — 7, № 6. — С. 4—10.
14. Chalker-Skott L. Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses // Photochem. Photobiol. — 1999. — 70, N 1. — P. 1—9.
15. Davies M.A., Pritchard S.D., Boyd R.S. et al. Developmental and induced responses of nickel-based and organic defences of the nickel-hyperaccumulating shrub, *Psychotria donarrei* // New Phytol. — 2001. — 150, N 1. — P. 49—58.
16. Dixon R.A., Paiva N.L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism // Plant Cell. — 1995. — 7, N 7. — P. 1085—1097.
17. Sakihama Y., Cohen M.F., Grace S.C. et al. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolic-induced oxidative damage mediated by metals in plant // Toxicology. — 2002. — 177, N 1. — P. 62—80.
18. Schutzendubel A., Schwartz P., Teichman T. Cadmium-induced changes in antioxidant systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots pine roots // Plant Physiol. — 2001. — 127, N 3. — P. 887—898.
19. Yamazaki H., Sakihama Y., Ikehara H. Flavonoid peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂ // Ibid. — 1997. — 115, N 4. — P. 1405—1412.

Отримано 15.01.2010

СОДЕРЖАНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЕНАХ СОИ ПРИ ОКСИДАТИВНОМ СТРЕССЕ, ВЫЗВАННОМ ВЛИЯНИЕМ ИОНОВ КОБАЛЬТА И КАДМИЯ

Е.Ф. Чечуй

Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

Исследовано влияние ионов кобальта и кадмия на содержание фенольных соединений в семенах сои при прорастании. Выявлено увеличение их содержания под влиянием ионов кобальта и кадмия в условиях оксидативного стресса. Ионы кадмия повышают содержание фенольных соединений с 3-х, ионы кобальта — с 1-х суток прорастания семян сои, что может быть связано с более сильным прооксидантным эффектом ионов кобальта.

THE PHENOLIC COMPOUNDS CONTENT IN GERMINATING SOYBEAN SEEDS UNDER OXIDATIVE STRESS CAUSED BY COBALT AND CADMIUM IONS

H.F. Chechui

V.N. Karazin Kharkov National University
4, sq. Svobody, Kharkov, 61077, Ukraine

The influence of cobalt and cadmium on the content of phenolic compounds during germination of soybean seeds was investigated. Cobalt and cadmium ions increased phenolic compounds content in conditions of oxidative stress. Cadmium ions increased content of phenols at 3-d day, and cobalt ions — at 1-st day of seeds germination.

Key words: *Glycine max* (L.) Merr., phenolic compounds, TBA-active substances, cobalt, cadmium.