

УДК 577.152:581.142

## ВМІСТ ФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК В НАСІННІ *GLYCINE MAX L.* ПРИ ПРОРОСТАННІ ЗА УМОВ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ, СПРИЧИНЕНОГО ВПЛИВОМ ІОНІВ КОБАЛЬТУ ТА КАДМІЮ

Чечуй О. Ф.

*Вміст фенольних сполук в насінні Glycine max L. при проростанні за умов оксидативного стресу, спричиненого впливом іонів кобальту та кадмію. — О. Ф. Чечуй. — Досліджено вплив кобальту та кадмію на вміст фенольних сполук в насінні сої при пророщуванні. Виявлено збільшення вмісту фенольних сполук як під впливом іонів кобальту, так і кадмію в умовах оксидативного стресу. Іони кобальту підвищують вміст фенольних сполук з третьої доби дії металу, а кобальт – вже з першої доби пророщування насіння сої, що може бути пов'язано з більш виразним прооксидантним ефектом іонів кобальту.*

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

**Адреса:** Харківський національний університет ім. В. Н. Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, 61077, Україна, e-mail: Pavel.A.Kaliman@univer.kharkov.ua

*The phenol compounds content in germination of Glycine max L. under conditions by oxidative stress of cobalt and cadmium ions. — H. Chechui. — The influence of cobalt and cadmium on the compounds of phenol content during germination of soybean seeds was investigated. Increase of content of phenolic compounds under the influence of cobalt and cadmium ions in conditions of oxidative stresses was found. Cadmium ions increased content of phenols at 72 h, and cobalt ions – at 24 h that explain as prooxidizer effects of cobalt ions.*

**Key words:** *Glycine max L.*, phenols, TBI-active of products, index of iodide, cobalt, cadmium.

**Address:** V.N. Karazin Kharkov National University, sq. Svobody, 4, Kharkov, 61077, Ukraine, e-mail: Pavel.A.Kaliman@univer.kharkov.ua

### Вступ

Багато технологічних процесів виробничої діяльності супроводжується забрудненням довкілля як солями важких металів, так і солями металів зі змінною валентністю [6, 14]. Незважаючи на різні механізми токсичної дії важких металів, характерним для них є те, що при надходженні до організму вони порушують рівновагу системи прооксиданти-антиоксиданти. Важкі метали виснажують вміст антиоксидантів, активують вільнорадикальне окиснення, внаслідок чого може розвиватися оксидативний стрес, при якому активуються фізіологічні і біохімічні системи, спрямовані на адаптацію метаболізму і відновлення гомеостазу [12].

Фенольні сполуки приймають участь у забезпеченні стійкості рослин до екстремальних умов навколишнього середовища. Досліджено, зокрема, їхні властивості як ендогенних регуляторів фізіологічних процесів за дії несприятливих чинників довкілля. У вивченні механізмів, здатних забезпечити стійкість рослин до дії важких металів, привертає увагу метаболізм різних фенольних сполук, зміни яких забезпечують захисні реакції до широкого кола несприятливих факторів навколишнього середовища [16]. В науковій літературі існують дані стосовно накопичення фенольних сполук за дії кадмію [8]. Враховуючи антиоксидантні властивості фенольних сполук та їх здатність до взаємодії з іонами важких металів [19],

можна припустити їх роль у знешкодженні гіперпродукції активних форм кисню в умовах оксидативного стресу, спричиненого важкими металами.

Мета роботи – вивчити вплив іонів кобальту та кадмію на вміст фенольних сполук в насінні сої при проростанні за умов оксидативного стресу, спричиненого дією зазначених металів.

### Матеріали та методи

Експерименти проведено на модельній системі – сім'ядолях *Glycine max L.* сорту Кларк врожаю 2006 р. Насіння знезаражували шляхом занурення у 2,5% розчин гіпохлориту натрію на 2 хв, промивали 0,05 М розчином HCl упродовж 20–30 с, а далі – триразово дистильованою водою. Насіння пророщували 5 діб при температурі  $23 \pm 2$  °C в термостаті у рулонах фільтрувального паперу, змоченого дистильованою водою (контроль). Стрес моделювали шляхом занурення насіння в розчини, що містили хлорид кобальту або хлорид кадмію у концентрації 100 мкМ [10]. Концентрацію іонів водню підтримували постійною. Рослини зазнають впливу не солей металів, а їх іонів, оскільки хлориди – це нормальні компоненти мінерального живлення рослин. Розчини солей попередньо витримували у автоклаві за робочого тиску 50 кПа упродовж 30 хв. В експериментах використовували сім'ядолі насіння сої через 1, 3 та 5 діб пророщування.

Вміст фенольних сполук визначали із використанням реактиву Фоліна-Деніса [7] та розраховували за калібрувальною кривою, яка була побудована за хлорогеновою кислотою в якості стандарту. Про інтенсивність ПОЛ (перекисного окиснення ліпідів) судили за накопиченням ТБК-активних продуктів у безбілкових центрифугатах по реакції з тиобарбітуровою кислотою з подальшим визначенням оптичної щільності при 532 нм [1]. Йодне число визначали за допомогою титрометрії [4]. Кількість експериментів – 5–6, з трьома повтореннями у кожному варіанті. Статистичну обробку результатів здійснювали методом варіаційної статистики ANOVA з використанням пакету програм «Statistica 6,0».

### Результати та обговорення

Аналіз даних, наведених в табл. 1, свідчить, що в контролі вміст фенольних сполук підвищується на третю та на п'яту добу в середньому в 1,48 і в 1,98 разів відносно показників першої доби. Під впливом іонів кобальту вміст фенольних сполук збільшується в середньому на 37% вже на першу добу. На третю добу спостерігається подальше збільшення вмісту фенольних сполук, порівняно як з контролем, так і з показниками першої доби, в середньому на 26% і 38%, відповідно. На п'яту добу вміст фенольних сполук зазнає подальшого підвищення.

Таблиця 1. Вплив кобальту та кадмію на вміст фенольних сполук в сім'ядолях сої при проростанні, мкг хлорогенової кислоти / 1 г тканини; M±m, n=6

Table 1. Influence of cobalt and cadmium ions on content of compound phenols in soybean seeds during germination, mkg chlorogenic acid / 1 gr tissue; M±m, n=6

| Фактори впливу | Доба пророщування |               |               |
|----------------|-------------------|---------------|---------------|
|                | 1-а               | 3-я           | 5-а           |
| 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 *# |

Примітки. Тут і далі в табл. 2, 3: \* –  $p < 0,05$ , достовірно відносно контролю; # –  $p < 0,05$  – відносно результатів на 1-у добу.

Головним діючим початковим елементом, що забезпечує фенольним антиоксидантам здатність гальмувати вільнорадикальні процеси окиснення, є гідроксильна група, яка приєднана до ароматичного кільця та містить рухливий атом водню. Разом з тим, антиоксидантний ефект поліфенолів реалізується за наявності і інших окисно-відновних пар.

Реакція вищих рослин на зміну зовнішніх факторів включає численні фізіолого-біохімічні процеси, які контролюються, у тім числі, й фітогормонами [15]. Так, доведено, що екзогенний кобальт може впливати на фітогормональний статус рослин, зокрема, за дії кобальту встановлено зниження одного з класів фітогормонів, а саме, індолілоцтової кислоти, яка відноситься до фенольних сполук [11]. При цьому, вільні радикали, утворені під дією кобальту як металу зі змінною валентністю, ймовірно, можуть бути тригером, що запускає гормональні зміни.

Антиоксидантні властивості фенолів можуть виявлятися у знешкодженні активних форм оксигену, вміст яких підвищується за дії токсикантів. Найбільш ранні реакції на дію стрес-факторів відбуваються на рівні мембран, які першими зазнають альтерації [9]. Початковим етапом у розвитку ПОЛ є інтенсифікація утворення вільних радикалів у клітинах за умов стресу. Тому ми визначили вміст одного з показників ПОЛ, а саме, вміст ТБК-активних продуктів, оскільки він є найбільш адекватним тестом на процеси ліпопероксидації. Ми з'ясували, що вміст цього показника за дії іонів кобальту (табл. 2), збільшується вже на першу добу в середньому в 2 рази, що свідчить про розвиток оксидативного стресу в умовах дослідження.

Таблиця 2. Вміст ТБК-активних продуктів в сім'ядолях сої при проростанні під впливом кобальту та кадмію, нмоль/г тканини, M±m, n=6

Table 2. Content of TBI-active products in soybean seeds under cobalt and cadmium ions, nM / gr tissue, M±m, n=6

| Фактори впливу | Доба пророщування |            |              |
|----------------|-------------------|------------|--------------|
|                | 1-а               | 3-я        | 5-а          |
| 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 *# |

Аналіз даних, наведених в табл. 1, свідчить, що під впливом іонів кадмію вміст фенольних сполук підвищується на третю добу проростання насіння в середньому в 1,76 разів відносно контрольних показників та в 2 рази відносно показників першої доби. На п'яту добу вміст фенольних сполук зростає в середньому в 1,87 разів відносно контрольних показників та в середньому в 2,74 рази відносно першої доби (табл. 2).

Було проаналізовано дані щодо окремих класів фенольних сполук за дії кадмію. Отримані результати узгоджуються з даними літератури, в яких встановлено підвищення вмісту окремих фенольних сполук під дією цього металу. Так, в роботі [14] виявлено індукцію ціанідину за дії іонів кадмію, і збільшення антоціанової зони за даних умов, що може бути цікавим для з'ясування адаптивної ролі антоціанів. Підставою для такого припущення можуть бути антиоксидантні властивості антоціанів та здатність флавоноїдів контролювати рівень пероксиду водню, який зростає умовах стресу, спричиненого дією важких металів, зокрема, кобальту та кадмію [18]. Особливістю будови антоціанів, до яких належить ціанідин, є наявність у гетероциклічному кільці чотирьохвалентного кисню, вільної позитивної валентності та велика кількість гідроксильних груп у молекулі цієї фенольної сполуки. Крім того, зростання вмісту фенольних сполук за дії кадмію також відмічено для різних видів рослин [8, 16].

Збільшення вмісту фенольних сполук за дії іонів кадмію, що відбувається на третю добу проростання насіння сої, може пояснюватися підвищенням вмісту ТБК-активних продуктів (табл. 2), що свідчить про наявність оксидативного стресу.

Крім того, в системі поліфенол-поліфенолоксидаза відбувається неферментативне дезамінування амінокислот за участі хлорогенової кислоти [5, 7]. У нашій попередній роботі ми підтвердили це, дослідивши активність ферментів азотистого метаболізму, зокрема активність аспартатамінотрансферази та аланінамінотрансферази за дії кобальту або кадмію. Ми дійшли висновку, що обидва іони металів викликають зменшення активності зазначених ферментів на п'яту добу проростання. Показано збільшення зазначених ферментів вже на першу добу пророщування, що 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, яке спостерігається в стресових умовах [16]. Не виключений прояв регуляторних властивостей сполук фенольної природи [19]. Зростання вмісту фенольних сполук під дією кадмію є неспецифічною реакцією рослинного організму на токсичний вплив цього металу. Це виявляється у посиленні процесів окиснювальної полімеризації фенольних сполук, біосинтез яких змінюється, що може призводити до уповільнення росту. Крім того, за умов окиснювального стресу, індукованого кадмієм [8], накопичення пероксиду гідрогену є молекулярним сигналом прискорення диференціювання і перемикання метаболізму на програмовану клітинну смерть [13].

Фенольні сполуки взаємодіють з іонами металів та мають антиоксидантні властивості [17]. У рослин вони відіграють захисну роль за дії оксидативного стресу, спричиненого іонами важких металів, в нашому випадку, кобальту або кадмію. Отже, одним з пояснень факту збільшення вмісту фенольних сполук за дії іонів кадмію, є розвиток оксидативного стресу в даних умовах.

Якщо врахувати, що вільні радикали виникають і в ході нормальних ензиматичних реакцій [9], то стає частково зрозумілим, що порушення роботи ферментів-оксидаз внаслідок їх часткової денатурації також може бути однією з причин збільшення вмісту вільних радикалів в клітинах. Такі явища в нашому експерименті можуть бути наслідком дії іонів важких металів, а саме, кобальту або кадмію. Як було сказано раніше, головним діючим початком, що забезпечує фенольним антиоксидантам здатність гальмувати вільнорадикальні процеси окиснення, є гідроксильна група, яка приєднана до ароматичного кільця та містить рухливий атом гідрогену. Фенольні антиоксиданти ефективно взаємо-

діють з гідропероксидними радикалами жирних кислот і ненасичених ліпідів. Причому, у першу чергу, підлягають окисненню ненасичені жирнокислотні залишки фосfolіпідів [9]. Це підтверджується також нашими експериментальними даними щодо визначення йодного числа (табл. 3).

Таблиця 3. Йодне число в сім'ядолях сої при проростанні під впливом кобальту та кадмію,  $M \pm m$ ,  $n=5$

Table 3. Index iodide in soybean seeds under cobalt and cadmium ions,  $M \pm m$ ,  $n=5$

| Фактори впливу | Доба пророщування |                               |                                |
|----------------|-------------------|-------------------------------|--------------------------------|
|                | 1-а               | 3-я                           | 5-а                            |
| Контроль       | 295,0 $\pm$ 13,1  | 316,8 $\pm$ 18,4              | 231,3 $\pm$ 10,5 <sup>#</sup>  |
| Кобальт        | 268,4 $\pm$ 20,7  | 225,1 $\pm$ 14,1 *            | 142,6 $\pm$ 9,4* <sup>#</sup>  |
| Кадмій         | 271,1 $\pm$ 12,0  | 212,7 $\pm$ 9,5* <sup>#</sup> | 163,2 $\pm$ 10,4* <sup>#</sup> |

Отже, йодне число як під впливом іонів кобальту, так і кадмію, зменшується на третю та п'яту добу проростання відносно контрольних показників (табл. 3), що, можливо, пов'язано з тим, що поліненасичені жирні кислоти в насінні бобових і, зокрема, в насінні сої, під впливом солей металів більш активно окислюються в реакції, яка каталізується ліпоксигеназами [5]. Такі оксигенази як ліпоксигенази та циклооксигенази, каталізують окиснення поліненасичених жирних кислот. Крім того, насичені жирні кислоти теж можуть підлягати активній десатурації і поповнювати фонд поліненасичених жирних кислот, які вивільнюються при гідролізі триацилгліцеридів, мобілізацію яких було досліджено в нашій попередній роботі [3]. Можна дійти висновку щодо кореляції між збільшенням вмісту одного з продуктів ПОЛ, а саме, ТБК-активних продуктів, та зменшенням вмісту показника ненасиченості жирнокислотних залишків фосfolіпідів під впливом важких металів. Це вказує на розвиток оксидативного стресу в умовах експерименту та може мати негативний вплив на функціонування мембран в цілому. Отже, вміст фенольних сполук відбувається на фоні оксидативного стресу, спричиненого іонами кобальту або кадмію.

## Висновки

Таким чином, аналіз отриманих даних свідчить, що за умов оксидативного стресу, спричиненого іонами кобальту, вміст фенольних сполук збільшується вже з першої доби проростання насіння сої *Glycine max* L., а іонів кадмію – з третьої доби. Це може пояснюватися тим, що прооксидантний ефект кобальту є більш виражений.

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.) // Вісник Харків. націонал. 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 // Вісник Харків. націонал. ун-ту ім. В.Н. Каразіна. Сер. Біологія. – 2005. – 1–2, № 709. – С. 22–27.  
4. Беззубов Л.П. Химия жиров. – М.: Пищевая промышленность, 1975. – 280 с.  
5. Гудвин Т., Мерсер Э. Введение в биохимию растений. – М.: Мир, в 2 т, пер. с англ., 1986. – 393 с.  
6. Гурадьчук 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. Школа, 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) / Харк. держ. аграр. ун-т. – Харків, 2001. – 173 с.
10. *Костишин С.С., Марченко М.М., Руденко С.С. та ін.* Антипероксидантно-антиоксидантний статус як критерій адаптації рослин до поза оптимальних 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 татака при проращивании в суспензионной культуре // Физиология растений. – 1970. – 17, вып. 5. – С. 731–737.
12. *Меньшикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондар И.А., Кругових Н.Ф., Труфакин В.А.* 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 // Сорос. образоват. журнал. – 2001. – 7, № 6. – С. 4–10.
14. *Chalker-Skott L.* (Чалкер-Скотт) 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.* (Дэвис, Притчард, Бойд) Developmental and induced responses of nickel-based and organic dependences of the nickel-hyperaccumulating shrub, *Psychotria donarrei* // New Phytol. – 2001. – 150, N 1. – P. 49–58.
16. *Dixon R.A., Paiva N.L.* (Диксон, Пайва) Stress-induced phenylpropanoid metabolism // Plant cell. – 1995. – 7, N 7. – P. 1085–1097.
17. *Sakihama Y, Cohen M.F., Grace S.C. et al.* (Закихама, Кохен, Грэйс) 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.* (Шутцендубел, Шварц, Тихман) 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* (Ямазаки, Закихама, Икехара) Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> // Plant physiol. – 1997. – 115, N 4. – P. 1405–1412.

Отримано: 29 жовтня 2010 р.

Прийнято до друку: 25 січня 2011 р.