

## ДОСЛІДЖЕННЯ РІВНЯ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНОГО ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ ТА СТУПЕНЯ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ В ТКАНИНАХ *ALLIUM SATIVUM L.*

Боброва М.С., Данилків О.М.

Центральноукраїнський державний педагогічний університет

імені Володимира Винниченка

вул. Шевченка, 1, 25006, м. Кропивницький

kazna4eeva@gmail.com, danilkiv\_o@ukr.net

У статті розкрито залежність ступеня вільнорадикального перекисного окиснення та антиоксидантного захисту від здатності рослинних тканин до фотосинтезу. Зазначено роль прооксидантно-антиоксидантної системи для організму рослин і тварин. Експериментальним шляхом виявлено рівень вільнорадикального перекисного окиснення ліпідів як основних компонентів плазмалеми та мембранних структур клітини, що першими реагують на дію стресових факторів навколишнього середовища. Досліджено фоновий та стимульований рівень малонового діальдегіду, що є одним з основних продуктів перекисного окиснення ліпідів, слугує маркером окисного стресу, призводить до гідрофілізації мембран, зниженням їхньої в'язкості, порушенням структури та локалізації рецепторів, ферментів та електричного заряду з можливим подальшим виникненням пор, розриву мембран та осмотичного шоку, що викликає вільнорадикальний некробіоз. Досліджено активність основного ферментного антиоксиданту – каталази, яка є першою лінією захисту від активних форм Оксигену. Виявлено рівень основного низькомолекулярного антиоксиданту – аскорбінової кислоти, що синтезується будь-якими рослинами і потрапляє до нашого організму як вітамінна добавка саме з продуктами рослинного походження. Здійснено порівняльний аналіз усіх перерахованих показників у тканинах *Allium sativum L.*, різних за здатністю до фотопродукції. Виявлено, що здатність тканин до фотосинтезу стимулює рівень вільнорадикального перекисного окиснення в них біополімерів та одночасно посилює активність ферментних і низькомолекулярних антиоксидантів. У тканинах фотосинтезуючих листків часнику каталаза є більш потужним антиоксидантом порівняно з аскорбіновою кислотою. Встановлено від'ємне значення приросту рівня малонового діальдегіду в тканинах *Allium sativum L.*, що може свідчити про високий загальний антиоксидантний потенціал рослини.

У результаті проведеного дослідження сформульовано висновки про залежність рівня вільнорадикального перекисного окиснення та ступеня антиоксидантного захисту в тканинах *Allium sativum L.* від їхньої здатності до фотопродукції. *Ключові слова:* прооксиданти, антиоксиданти, малоновий діальдегід, каталаза, аскорбінова кислота, *Allium sativum L.*

**Research levels of free radical oxidation and the degree of antioxidant protection in *Allium sativum L.* tissues. Bobrova M., Danylkiv O.**

The article deals with the dependence of the degree of free radical peroxidation and antioxidant protection on the ability of plant tissues to photosynthesis. The role of prooxidant-antioxidant system for plant and animal organism is stated. The level of free radical lipid peroxidation was found experimentally as the main components of plasma and membrane structures of cells, which are the first to respond to environmental stressors. Background and stimulated levels of malondialdehyde were investigated. Malonic dialdehyde is one of the main products of lipid peroxidation, serves as a marker of oxidative stress, leads to hydrophilization of membranes, reducing their viscosity, impaired structure and localization of receptors, enzymes and electrical charge with possible subsequent pore formation, rupture of membranes causes free radical necrobiosis. The activity of the main enzyme antioxidant – catalase, which is the first line of protection against the active forms of Oxygen, was investigated. The level of the main low molecular weight antioxidant – ascorbic acid, which is synthesized by any plant and gets into our body, as a vitamin supplement with the products of plant origin, has been revealed. A comparative analysis of all listed indicators in the tissues of *Allium sativum L.* different in ability to photoproduction. It has been found that the ability of tissues to photosynthesis stimulates the level of free radical peroxidation in them of biopolymers and, at the same time, enhances the activity of enzymatic and low molecular weight antioxidants. In the tissues of photosynthetic garlic catalase leaves are a more potent antioxidant than ascorbic acid. A negative value of the increase in the level of malondialdehyde in the tissues of *Allium sativum L.* was established, which may indicate a high overall antioxidant potential of the plant. As a result of the study, conclusions were drawn regarding the dependence of the level of free radical peroxidation and the degree of antioxidant protection in the tissues of *Allium sativum L.* on their ability to photoproduce. *Key words:* prooxidants, antioxidants, malonic dialdehyde, catalase, ascorbic acid, *Allium sativum L.*

**Постановка проблеми.** Постійна генерація активних форм Оксигену (далі – АФО) в процесі фотосинтезу є обов'язковим атрибутом більшості рослин і додатковим стимулом розвитку спеціалізованих ферментативних і неферментних антиоксидантів для підтримки окисного гомеостазу фототрофних організмів. Проблема балансу прооксидантно-антиоксидантної системи (далі – ПАС) рослин має такі особливості, не всі з яких висвітлені в літературі:

1) додаткове фотосинтетичне утворення активних форм кисню, зокрема синглетних, що значно посилює вплив прооксидантної ланки [1; 2];

2) не досить висвітленим залишається зміна активності і концентрації основних антиоксидантів у фотосинтезуючих частинах рослин і тих, що не здійснюють фотопродукцію;

3) досить актуальним є визначення вмісту антиоксидантів і продуктів перекисного окиснення біополімерів, що надходять до нашого організму з продуктами харчування рослинного походження [3].

**Мета дослідження** – порівняння стану компонентів ПАС в фотосинтезуючих тканинах *Allium sativum L.*, та тих, що не здійснюють фотосинтез.

**Актуальність дослідження.** В умовах несприятливої екологічної ситуації, що визначає створення імунного дефіциту не лише у людини та тварин, але й у рослин виникає необхідність вивчення компонентів і факторів стійкості та ПАС. Це є біохімічним підґрунтям для підтримки високого імунного статусу рослинних і тваринних організмів.

**Зв'язок авторського доробку з важливими науковими та практичними завданнями.** Для досягнення поставленої мети було визначено такі завдання:

1. Виявити рівень вільнорадикального перекисного окиснення біополімерів і ступінь антиоксидантного захисту в тканинах *Allium sativum L.* залежно від їхньої здатності до фотосинтезу.

2. Порівняти ступінь захисту ферментних і низькомолекулярних антиоксидантів.

3. Порівняти активність прооксидантної та антиоксидантної ланок у тканинах *Allium sativum L.*

**Аналіз останніх досліджень і публікацій.** Значення АФО у процесах ВРПО та механізми АОЗ розкрито в працях таких учених, як N. Smirnoff, K. Apel, H. Nirt, Л.В. Хрипач, Ю.А. Рєвазова, Ю.Е. Колупаєв, В.А. Костюк, В.В. Бараненко, Ю.В. Карпець, О.Г. Полєска, та інших дослідників [1–7]. Загальноприйнятим є твердження що основною ціллю АФО є клітинні мембрани, ліпіди яких зазнають ферментативного та вільнорадикального перекисного окиснення (далі – ВРПО), яке першочергово пошкоджує молекули поліненасичених жирних кислот [1]. Одним з основних продуктів ВРПО макромолекул, зокрема ліпідів, є малоновий діальдегід (МДА, малондіальдегід  $O=HC-CH_2-CH=O$ ), що слугує маркером окисного стресу [4]. МДА утворюється під час дії синглетного Оксигену ( $*O_2$ ) та гід-

роксил-радикалу ( $\bullet OH$ ) на молекули поліненасичених жирних кислот, зокрема лінолевої, в 9-, 12-, 13-, 16-положеннях для  $\bullet OH$  та в 9-, 10-, 12, 13-, 15-, 16-положеннях для  $*O_2$ . Утворення МДА призводить до гідрофілізації мембран, порушення гідрофобного бар'єра та пов'язаних із цим збільшенням проникності і текучості мембрани, зниження їхньої в'язкості, порушення структури та локалізації рецепторів, ферментів та електричного заряду з можливим подальшим виникненням пор, розриву мембран та осмотичного шоку, що викликає вільнорадикальний некробіоз [4]. МДА також гальмує реплікацію та синтез білка, утворює міжмолекулярні зшивки за аміногрупами. Взаємодія МДА здатна реагувати з ДНК (зокрема, гуанозином), утворюючи ДНК-аддукти, передусім мутагенний  $M_1G$ , який спричинює канцерогенез у тварин. У зв'язку з генерацією АФО хлоропластами в процесі фотосинтезу рослини повинні мати більш потужну систему ферментних і неферментних антиоксидантів [1]. Прикладом неферментних антиоксидантів класу  $\alpha, \beta$ -дієнолів є аскорбінова кислота (улактон 2,3-дегідрол-гулонової кислоти), що не лише знешкоджує АФО, а й відновлює окиснені форми багатьох антиоксидантів (залізовмісні оксидази, цитохроми, вітаміни тощо), бере участь в електронному транспорті та активації АТФ-синтетази, стимулює імуностійкість і гальмує канцерогенез [3] у дуже високих дозах, тому що діє як прооксидант, руйнуючи клітини, які під час мітозів дуже чутливі до активних форм кисню [4]. Потужним ферментним антиоксидантом є каталаза – гемвмісний тетрамерний фермент класу оксидоредуктаз (КФ 1.11.1.6), що каталізує розклад перекису водню з утворенням кисню і води [3]:  $2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$ . Це один з основних ферментів, що руйнують АФО та один із найактивніших ензимів [4]. Згідно з літературними даними, фотосинтетично зумовлене посилення прооксидантної ланки рослин повинне зумовлювати компенсаторне підвищення антиоксидантної активності [1; 7], тому з метою одержання кількісної оцінки рівня генерації АФО та вмісту основних антиоксидантів у продуктах рослинного походження, а також порівняння цих показників для фотосинтетичних органів рослин і тих, що не здійснюють фотопродукцію, нами було проведено низку експериментальних досліджень.

**Виділення не вирішених раніше частин загальної проблеми, котрим присвячується означена стаття.** Не досить дослідженими є зв'язок функціональної активності тканин рослин зі змінами рівня вільнорадикального пошкодження біополімерів в їхніх клітинах і ступеня антиоксидантного захисту.

**Новизна.** У роботі вперше здійснено аналіз зміни компонентів прооксидантної та антиоксидантної ланок тканин листків *Allium sativum L.* залежно від їхньої здатності до фотосинтезу. Визначено рівень вільнорадикального перекисного окиснення макромолекул і значення показників низькомолекулярних і ферментних антиоксидантів.

**Методологічне або загальнонаукове значення.**

На основі проведених досліджень експериментально виявлено найбільшу залежність значення показників стану ПАС від здатності тканин до фотосинтезу.

Результати, отримані під час виконання роботи, використовуються в наукових дослідженнях кафедри біології та методики її викладання та в навчальному процесі природничо-географічного факультету Центральноукраїнського державного педагогічного університету імені Володимира Винниченка під час викладання курсів «Фізіологія рослин», «Біохімія», «Екологія» та «Основи сільського господарства».

**Виклад основного матеріалу.**

Кількісний аналіз компонентів стану ПАС *Allium sativum* L. здійснювали на тканинах підземних видозмін (зубків) і фотосинтезуючих листків часнику сорту «Дюшес» (середньостійкий сорт – 7 клас стійкості до хвороб, посухи та холоду, 9 клас продуктивності, рання група стиглості). Зразки для біохімічного аналізу часнику добували з поперечного зрізу середини зубків, верхівки та середини фотосинтезуючих листків. Кожна дослідна група включала 10 проб.

**Методи дослідження.** Визначення біохімічних показників здійснювали згідно із загальноприйнятими методиками: фоновий рівень малонового діальдегіду (МДА<sub>0</sub>) (мкмоль/кг) оцінювали шляхом нагрівання проби в кислому середовищі з 2-тіобарбітуровою кислотою та подальшим фотометруванням утвореного триметинового комплексу за 540 нм у кюветі на 1 см проти контролю, що не містив гомогенату. Для ініціації приросту рівня МДА (МДА<sub>1,5</sub>) пробу інкубували 90 хвилин у прооксидантному залізо-аскорбінатному буферному розчині за 24 °С. Величину приросту рівня  $\Delta$ МДА, що оберненопропорційна антиоксидантному запасу тканини, виражали як різницю між МДА<sub>0</sub> та МДА<sub>1,5</sub> в мкмоль/кг та у відсотках від початкового рівня. Визначення концентрації аскорбінової кислоти (ммоль/кг) проводили за методом Тільманса, окислюючи в дослідній пробі аскорбінову кислоту до дегідроаскорбінової 0,001 н розчином 2,6-дихлорфеноліндофенолятом натрію. З метою руйнування аскорбінату в контрольній пробі її кип'ятили з 3%-вим розчином H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Активність каталази (мкмоль/г·хв) оцінювали, згідно з методом А.Н. Баха та А.І. Зубкової, шляхом визначення кількості 1%-ного розчину H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, що залишився після дії на нього каталази, титруванням 0,1 н розчином KMnO<sub>4</sub> у кислому середовищі. Руйнування каталази в контроль-

ній пробі здійснювали термічно [14]. Статистична обробка цифрових результатів дослідження проводилася згідно із загальноприйнятими методиками. Достовірно різними вважались результати за  $p < 0,05$ .

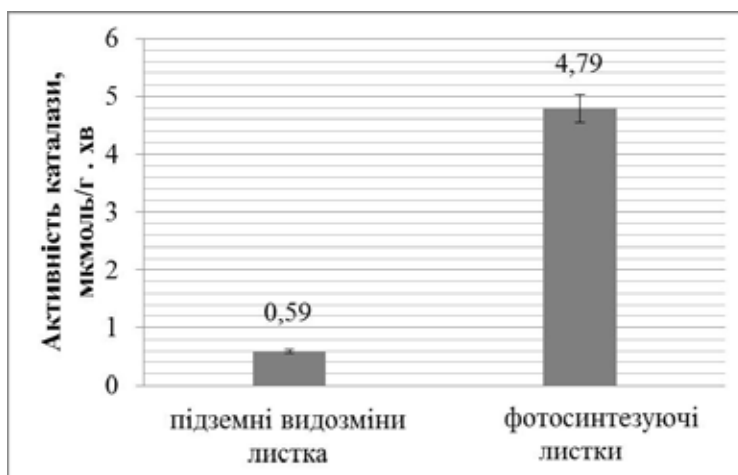


Рис. 1. Порівняння активності каталази в тканинах *Allium sativum* L.

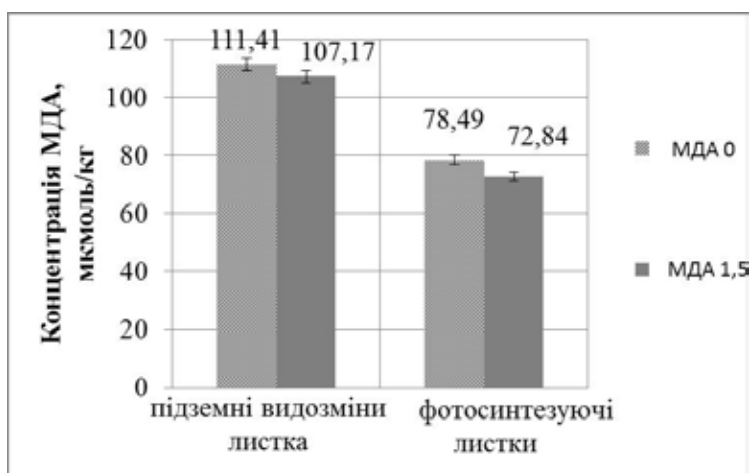


Рис. 2. Порівняння концентрації аскорбінової кислоти в тканинах *Allium sativum* L.

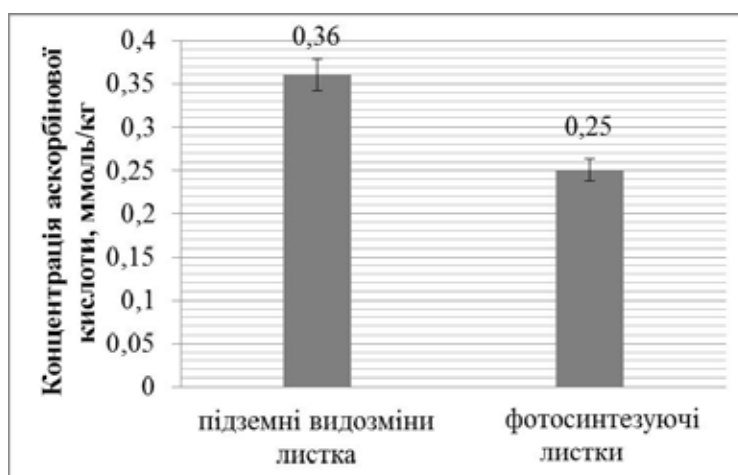


Рис. 3. Порівняння вмісту МДА в тканинах *Allium sativum* L.

**Результати** дослідження свідчать, що активність каталази в перах часнику ( $4,79 \pm 0,02$  мкмоль/гхв) в 8,12 разів вища, ніж у зубках ( $0,59 \pm 0,01$  мкмоль/гхв) ( $p_1 < 0,001$ ) (рис. 1). Такий розподіл пояснюється значним посиленням продукції синглетного Оксигену ( $*O_2$ ) в результаті фотосинтетичних процесів. Час існування синглетного Оксигену незначний, тому він одразу перетворюється на супероксиданіон-радикал ( $*O_2^-$ ) та перекис водню ( $O_2 + \lambda\eta \rightarrow *O_2 + e^- \rightarrow *O_2^- + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$ ), підвищення концентрації якого і зумовлює потребу в посиленні антиоксидантного захисту, зокрема активності каталази.

Концентрація аскорбінової кислоти в зелених листках часнику в 1,44 рази достовірно ( $p < 0,001$ ) нижча, ніж у зубках (рис. 2). Тож можна припустити, що каталаза порівняно з аскорбіновою кислотою є значно потужнішим антиоксидантом фотосинтетичних органів рослин, де з гідроксил-радикалу утворюється велика кількість пероксиду водню.

Фоновий рівень МДА<sub>0</sub> характеризується значно нижчими величинами в листках часнику ( $78,49 \pm 2,83$  мкмоль/кг) порівняно із зубками ( $111,41 \pm 2,14$ ) з різницею в 1,42 рази ( $p < 0,001$ ), що, можливо, пояснюється значним антиоксидантним запасом фотосинтезуючих тканин листка, зокрема високою активністю каталази (рис. 3).

Після інкубації проб в прооксидантному залізо-аскорбінатному буферному розчині приріст рівня МДА виявився негативним порівняно з фоновим в обох випадках. Наприклад, для зубків часнику цей показник становить -6,35% ( $4,25$  мкмоль/кг), а для листків -7,79% ( $5,65$  мкмоль/кг). Різниця між результатами не є достовірною ( $p > 0,1$ ), що може свідчити про порівняно близькі значення рівня загального антиоксидантного захисту тканин часнику сорту «Дюшес». Це додатково підтверджується достовір-

ною різницею рівнів МДА<sub>1,5</sub> в 1,47 разів у зубках і перах часнику відповідно. Від'ємний приріст рівня МДА до та після інкубації проб свідчить про досить високий загальний антиоксидантний захист тканини зубків і листків часнику сорту «Дюшес».

Отже, фотосинтетична продукція АФО зумовлює компенсаторне посилення активності ферментних (каталаза) і низькомолекулярних (аскорбінова кислота) антиоксидантів, які гальмують процеси вільнорадикального пошкодження біополімерів і зменшують показник рівня МДА.

**Головні висновки.** 1. Здатність тканин до фотосинтезу стимулює рівень вільнорадикального перекисного окиснення в них біополімерів та одночасно посилює активність ферментних і низькомолекулярних антиоксидантів. 2. Каталаза є більш потужним антиоксидантом у тканинах фотосинтезуючих листків часнику порівняно з аскорбіновою кислотою. 3. Від'ємне значення приросту рівня малонового діальдегіду в тканинах *Allium sativum* L. свідчить про високий загальний антиоксидантний потенціал.

**Перспективи використання результатів дослідження.** Перспективним напрямом селекції, біотехнології та генної інженерії є створення сортів із підвищеним вмістом антиоксидантів. Дослідження балансу між вільнорадикальним перекисним окисненням біополімерів і рівнем антиоксидантного захисту, що супроводжує всі фізіологічні та патологічні процеси, є об'єктом дослідження біомембранології, нормальної та патобіохімії, клінічної медицини та геронтології. Перспектива використання і модифікації окремих компонентів АОЗ для підвищення захисних сил організму відкриває нове коло досліджень у галузі імунології. Особливого значення набуває висвітлення цієї проблеми в галузі імунології рослин.

### Література

1. Костюк В.А., Потапович А.И. Биорадикалы и биоантиоксиданты. Минск : БГУ, 2004. 179 с.
2. Smirnoff N. Antioxidants and reactive oxygen species in plants. New York : Blackwell Publishing, 2005. 302 p.
3. Дмитрієв О.П., Кравчук Ж.М. Активні форми кисню та імунітет рослин. *Цитологія і генетика*. 2005. № 39 (4). С. 64–75.
4. Apel K., Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Plant Biol.* 2004. Vol. 55. P. 373–399.
5. Хрипач Л.В., Рєвазова Ю.А. Роль свободнорадикального окислення в пошкодженні генома факторами оточуючої середовища. *Вісник РАМН*. 2004. № 3. С. 16–18.
6. Колупаєв Ю.Е. Активні форми кисню в рослинах при дії стресорів: утворення та можливі функції. *Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія : Біологія*. 2007. Вип. 3 (12). С. 6–26.
7. Колупаєв Ю.Є., Карпець Ю.В. Активність супероксиддисмутизи і каталази у колеоптилях пшениці за дії пероксиду водню і нагрівання. *Фізіологія і біохімія культ. рослин*. 2007. Т. 39. № 4. С. 319–325.
8. Бараненко В.В. Супероксиддисмутаза в клітках рослин. *Цитологія*. 2006. Т. 48. № 6. С. 465–474.
9. Дмитрієв О.П., Кравчук Ж.М. Активні форми кисню та імунітет рослин. *Цитологія і генетика*. 2005. № 39 (4). С. 64–75.
10. Полєсская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода. Москва : КДУ, 2007. 140 с.
11. Kawano T. Roles of the reactive oxygen species generating peroxides reaction in plant defense and growth induction. *Plant Cell Repts.* 2003. Vol. 21. № 9. P. 829–837.
12. Heiser I., Elstner E. Biochemical mechanisms of plant defense a central role for reactive oxygen species. *Plant Prot. Sci.* 2002. Vol. 38. Spec Issue 1. P. 76–86.
13. Foyer C.H., Noctor G. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment*. 2005. Vol. 28. P. 1056–1071.
14. Посібник з експериментально-клінічних досліджень в біології та медицині / за ред. І.П. Кайдашева, О.В. Катрушова, В.М. Соколенко, О.І. Цебржинського. Полтава, 1996. 271 с.