

УДК 581.19

Т. А. ТОЛКАЧЕВА

**ПРИМЕНЕНИЕ ЭКСТРАКТА КУКОЛОК ДУБОВОГО ШЕЛКОПРЯДА
ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА,
ВЫЗВАННОГО СОЛЯМИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ У *ALLIUM SERA***

Витебский государственный университет им. П. М. Машерова, e-mail: tanyatolkacheva@mail.ru

(Поступила в редакцию 06.12.2012)

Введение. Тяжелые металлы (ТМ) являются наиболее распространенными и токсичными загрязнителями биосферы. Из-за их взаимодействия с физиологически важными органическими соединениями клеток и тканей развиваются нарушения жизненно важных функций организма [1]. Токсичность ТМ обусловлена их способностью связываться с SH-группами белков, или замещением функционально важных ионов металлов, что лежит в основе модуляции действия ферментов или изменения функций металлопротеинов. ТМ инициируют генерацию активных кислородных метаболитов (АКМ), которые через активацию пероксидного окисления липидов (ПОЛ) вызывают повреждения макромолекул и мембран клеток [2]. Прооксидантно-антиоксидантное состояние тканей оценивают по накоплению промежуточных и конечных продуктов ПОЛ (диеновых конъюгатов (ДК), малонового диальдегида (МДА), оснований Шиффа), а также по активности антиоксидантных ферментов (например, супероксиддисмутазы (СОД), глутатионредуктазы (ГР), каталазы, пероксидазы) и содержанию низкомолекулярных антиоксидантов (аскорбиновой кислоты, токоферолов, глутатиона и др.) [3]. Принято, что способность антиоксидантных ферментов к регуляции является защитным механизмом растений против окислительного стресса [4, 5].

Среди загрязнителей биосферы важную роль играют соли свинца и меди. Известно, что загрязнение солями свинца мест обитания растений оказывает токсичное действие на структурно-метаболические процессы, вызывая нарушения репликации ДНК, процессов транскрипции, хлороз листьев, ингибирование роста корней и побегов, снижение фотосинтеза и транспирации, активности ряда ферментов [6]. Ионы меди способны вытеснять функциональные металлы из активных центров ферментов, взаимодействовать с биологическими мембранами и восстанавливать молекулярный кислород до АКМ [7].

Для предотвращения активации свободнорадикальных процессов, вызванных действием ТМ, используют различные антиоксиданты. Ранее было показано, что применение комплекса биологически активных веществ из куколок шелкопряда (*Antheraea pernyi* G.-M.) дает возможность ощутимо повысить продуктивность животных за счет многогранного антитоксического действия [8]. В данной работе сделана попытка оценки эффективности этого комплекса на растительном объекте *Allium sera*. Для этого из куколок дубового шелкопряда моновольтинной породы «Полесский Тассар», находящихся в диапаузе, в соответствии с патентом РБ [10] получали смесь биологически активных веществ – экстракт куколок дубового шелкопряда (ЭКДШ), основу которого составляют свободные аминокислоты. Исследование основано на положении, что во время диапаузы жидкое содержимое куколок, образованное в результате гистолиза тканей гусеницы V возраста, устойчиво к окислительному стрессу и бактериальной контаминации [9, 10].

Цель работы – обосновать способ обработки луковиц *A. sera* ЭКДШ для предотвращения или ослабления эффектов окислительного стресса, вызванного действием тяжелых металлов.

Материал и методы исследования. В лабораторных условиях моделировали стресс, вызываемый действием растворов $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ в разных концентрациях с использованием *Allium cepa*. Для снижения вредного воздействия солей тяжелых металлов применяли ЭКДШ, который стандартизировали по содержанию основной действующей субстанции – сумме свободных аминокислот. ЭКДШ добавляли в количестве 10 мл/100 мл раствора соли, что соответствует содержанию 5500 мкг свободных аминокислот на 100 мл раствора.

Перед началом эксперимента луковицы выдерживали при 4 °С в течение 14 дней для активизации и синхронизации процесса прорастания. В эксперименте использовали луковицы сорта Штуттгартен Ризен диаметром 2,0–2,5 см. Предварительно у них удаляли внешние чешуи и коричневую нижнюю пластинку, затем помещали в пробирки (объемом 20 мл, Ø 2,5 см) с дистиллированной водой. Проращивание луковиц проводили при комнатной температуре. Формировали 13 групп по 15 луковиц в каждой. Через 48 ч луковицы 6 групп помещали на 24 ч в тестируемые растворы солей ТМ ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$). Другие 6 групп луковиц обрабатывали аналогичными растворами солей, содержащими ЭКДШ. В качестве контроля использовали дистиллированную воду [11]. В подборе концентраций исследуемых солей руководствовались литературными данными [12]. Через 12 сут (9 сут после действия солей ТМ) оценивали функциональное состояние растений, учитывая длину корней, показатели ПОЛ, активность антиоксидантных ферментов.

Для оценки содержания ранних продуктов ПОЛ определяли конъюгированные диены спектрофотометрическим способом с использованием смеси гептана и изопропилового спирта (1:1) [13]. Количественное определение продуктов ПОЛ в зелени лука проводили с использованием теста с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК): определяли ТБК-позитивные вещества, к которым относится МДА [14].

СОД является ключевым ферментом антиоксидантных систем всех аэробных организмов, катализирующим превращение анион-радикала кислорода в пероксид водорода и молекулярный кислород. ГР выполняет ключевую роль в ответах на окислительный стресс, поддерживая пул внутриклеточного глутатиона, главным образом в восстановленном состоянии [15]. Активность СОД определяли с использованием системы, обеспечивающей восстановление нитросинего тетразолия по методу [16], и выражали активность в ммоль/мин·г ткани. Активность ГР определяли по [17], рассчитывали ее величину с учетом коэффициента молярной экстинкции 6,22 $\text{мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ и выражали в мкмоль/мин·г ткани.

Полученный цифровой материал после проверки на правильность распределения вариационных рядов обрабатывали статистически ($n = 6$) с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. Установлено, что предварительная обработка проросших луковиц растворами CuSO_4 индуцировала пролонгированные процессы окислительного стресса, которые подтверждались повышенными концентрациями МДА и ДК (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Действие ЭКДШ на длину корней и содержание МДА и ДК в листьях *A. cepa* при действии CuSO_4

Экспериментальная группа	МДА, мкмоль/г	ДК, мкмоль/г	Длина корней, мм
Контроль	2,44±0,023	0,18±0,009	12,0±0,55
CuSO_4 , 12,5 мг/л	3,11±0,019 ¹	0,34±0,019 ¹	5,4±0,44 ¹
CuSO_4 , 12,5 мг/л + ЭКДШ	2,22±0,014 ^{1,2}	0,29±0,008 ^{1,2}	11,0±0,9 ²
CuSO_4 , 2,5 мг/л	3,73±0,029 ¹	0,32±0,029 ¹	7,3±0,54 ¹
CuSO_4 , 2,5 мг/л + ЭКДШ	2,42±0,012 ²	0,20±0,005 ²	12,3±0,77 ²
CuSO_4 , 1,25 мг/л	3,22±0,026 ¹	0,22±0,013 ¹	9,5±0,92 ¹
CuSO_4 , 1,25 мг/л + ЭКДШ	2,49±0,012 ²	0,18±0,016	12,9±0,91 ²

¹ $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

² $p < 0,05$ по сравнению с группой, обработанной только растворами солей ТМ.

Поскольку четкой зависимости содержания МДА и ДК от концентрации CuSO_4 не было выявлено, можно полагать, что на этом сроке наблюдения регистрируется факт запуска процессов ПОЛ растворами сульфата меди. Однако при исследовании длины корней выявляется обратная

корреляционная зависимость между концентрацией соли (CuSO_4) и длиной корешков лука ($r = 0,89, p < 0,05$). Следовательно, можно сделать вывод, что степень подавления роста корней зависит от концентрации CuSO_4 . При обработке луковиц смесью растворов CuSO_4 и ЭКДШ через 9 сут не обнаружены изменения МДА и ДК, характерные для действия только растворов соли (за исключением уровня ДК при концентрации CuSO_4 12,5 мг/л). Можно предположить, что компоненты ЭКДШ либо уменьшали выраженность ПОЛ, либо сокращали сроки действия процессов окислительного стресса. Это предположение подтверждается данными о длине корней – через 9 дней после их обработки смесью растворов CuSO_4 и ЭКДШ длина корней во всех вариантах опыта не отличалась от контрольных величин и была достоверно выше, чем у луковиц, обработанных только растворами CuSO_4 .

При действии на луковицы растворов $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ через 9 сут также зарегистрированы проявления окислительного стресса (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Действие ЭКДШ на длину корней и содержание МДА и ДК в листьях *A. сера* при действии $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$

Экспериментальная группа	МДА, мкмоль/г	ДК, мкмоль/г	Длина корней, мм
Контроль	2,44±0,023	0,18±0,009	12,0±0,55
$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, 331 мг/л	2,58±0,029 ¹	0,85±0,058 ¹	6,6±1,06 ¹
$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, 331 мг/л + ЭКДШ	1,78±0,009 ^{1,2}	0,42±0,002 ^{1,2}	8,8±1,07 ¹
$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, 33,1 мг/л	3,12±0,019 ¹	0,49±0,108 ¹	7,0±0,87 ¹
$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, 33,1 мг/л + ЭКДШ	2,11±0,031 ^{1,2}	0,20±0,011 ²	10,8±1,01 ²
$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, 3,31 мг/л	2,23±0,032 ¹	0,33±0,038 ¹	9,9±0,72 ¹
$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, 3,31 мг/л + ЭКДШ	1,69±0,020 ^{1,2}	0,21±0,014 ²	12,1±0,9

¹ $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

² $p < 0,05$ по сравнению с группой, обработанной только растворами солей ТМ.

По сравнению с CuSO_4 после действия растворов $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ в большей степени возросли уровни ДК. Величины содержания ДК находились в прямой корреляционной зависимости от концентрации $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ в растворах ($r = 0,98, p < 0,05$). Поскольку ДК являются показателем ранних этапов ПОЛ, можно полагать, что ионы свинца могут инициировать процессы ПОЛ в большей степени, чем ионы меди. Однако содержание МДА было повышенным в листьях лука только после обработки луковиц раствором $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ в концентрации 331 и 33,1 мг/л. При концентрации соли 3,31 мг/л содержание МДА было даже ниже, чем в контроле. Не исключено, что ионы свинца более интенсивно и дозозависимо запускают процессы окислительного стресса, но эндогенные антиоксидантные системы клеток листьев частично препятствуют развитию процесса ПОЛ. Через 9 сут после обработки луковиц $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ в сочетании с ЭКДШ выявлено достоверное уменьшение образования ДК и МДА. Вероятно, компоненты ЭКДШ действуют синергично с эндогенными антиоксидантными системами, препятствующими накоплению МДА. Это предположение подтверждается данными о длине корней. При концентрации $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 331 мг/л не получено достоверного влияния эффекта ЭКДШ на длину корней. Действие нитрата свинца при концентрации 33,1 мг/л и добавлении ЭКДШ привело к достоверному удлинению корней до контрольного уровня. При самой низкой концентрации $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ в сочетании с ЭКДШ выявлена полная нормализация длины корней лука.

Для объяснения полученных результатов была исследована активность двух антиоксидантных ферментов. Активность СОД была увеличена в листьях лука через 9 дней после обработки раствором CuSO_4 в концентрации 12,5 мг/л (табл.3). Действие раствора сульфата меди в концентрации 2,5 мг/л также привело к увеличению активности СОД, однако из-за большого разброса данных различия оказались недостоверными. Добавление ЭКДШ к растворам CuSO_4 нормализовало активность СОД через 9 сут после обработки луковиц.

Активность ГР была достоверно повышена при действии на луковицы растворов CuSO_4 с концентрацией 12,5 и 2,5 мг/л. Обработка луковиц смесью растворов CuSO_4 и ЭКДШ при всех испытанных концентрациях сульфата меди привела к однотипному результату: уменьшению активности ГР в область величин ниже контрольного уровня.

Т а б л и ц а 3. Влияние ЭКДШ на активность антиоксидантных ферментов в листьях *A. сера* при действии CuSO_4

Экспериментальная группа	Активность СОД, ммоль/мин·г ткани	Активность ГР, мкмоль/мин·г ткани
Контроль	0,67±0,152	52±2,1
CuSO_4 , 12,5 мг/л	1,19±0,191 ¹	81±4,4 ¹
CuSO_4 , 12,5 мг/л + ЭКДШ	0,89±0,094	42±1,8 ^{1,2}
CuSO_4 , 2,5 мг/л	1,49±0,565	78±2,4 ¹
CuSO_4 , 2,5 мг/л + ЭКДШ	0,99±0,102	44±2,4 ^{1,2}
CuSO_4 , 1,25 мг/л	0,75±0,089	56±2,5
CuSO_4 , 1,25 мг/л + ЭКДШ	0,97±0,290	46±2,1 ^{1,2}

¹ $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

² $p < 0,05$ по сравнению с группой, обработанной только растворами солей ТМ.

Активность СОД была повышена в листьях лука при действии $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ в концентрациях 331 и 33,1 мг/л (табл. 4).

Т а б л и ц а 4. Влияние ЭКДШ на активность антиоксидантных ферментов в листьях *A. сера* при действии $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$

Экспериментальная группа	Активность СОД, ммоль/мин·г ткани	Активность ГР, мкмоль/мин·г ткани
Контроль	0,67±0,152	52±2,1
$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, 331 мг/л	1,18±0,141 ¹	69±1,1 ¹
$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, 331 мг/л + ЭКДШ	0,89±0,152	63±2,0 ²
$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, 33,1 мг/л	1,06±0,105 ¹	69±2,9 ¹
$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, 33,1 мг/л + ЭКДШ	0,81±0,110	48±5,2 ²
$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, 3,31 мг/л	0,96±0,145	80±1,7 ¹
$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, 3,31 мг/л + ЭКДШ	0,73±0,185	74±12,5

¹ $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

² $p < 0,05$ по сравнению с группой, обработанной только растворами солей ТМ.

Обработка лукович смеси растворов $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ и ЭКДШ обеспечила сохранение СОД на контрольном уровне.

Активность ГР была повышена в листьях лука, обработанного растворами $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ во всех 3 концентрациях. Добавление ЭКДШ способствовало сохранению активности фермента в области контрольных величин.

Итак, в результате проведенных исследований получены данные, демонстрирующие протекторные свойства ЭКДШ по отношению к инициации и развитию окислительного стресса у *Allium serpa*, вызванного обработкой лукович растворами CuSO_4 и $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Благодаря этому эффекту через 9 сут после обработки лукович смесями солей и ЭКДШ не выявлено укорочения длины корней, повышенных уровней ДК и МДА, а также активности исследованных антиоксидантных ферментов в листьях лука. По закономерным изменениям активности ГР в листьях лука можно полагать, что восстановление глутатиона играет важную роль в развитии окислительного стресса у *A. сера*.

Можно предположить следующий механизм защитного эффекта ЭКДШ при окислительном стрессе, вызванном солями ТМ. Ионы меди и свинца всасываются корнями лука, проникают в донце и затем в растущие листья. На протяжении 9 сут происходит около 12 делений клеток, в результате которых внутриклеточная концентрация ТМ постепенно падает, но, вероятно, остается достаточной для инициации свободнорадикальных процессов и противодействующих им эндогенных антиоксидантных систем. При наличии ЭКДШ вместе с ионами ТМ всасываются и экзогенные низкомолекулярные антиоксиданты, которые с самого начала ограничивают инициацию свободнорадикальных процессов, усиливая мощность эндогенных антиоксидантов. В результате через 9 сут проявления окислительного стресса минимальны, а рост корней соответствует контрольным значениям [9].

Заключение. После обработки проросших луковиц *A. cepa* солями CuSO_4 и $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ через 9 сут обнаруживаются признаки окислительного стресса в виде повышения концентрации продуктов ПОЛ. Сохранение активированного ПОЛ состояния сопряжено с угнетением роста корней. Обработка луковиц солями CuSO_4 и $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ в сочетании с ЭКДШ частично препятствует увеличению показателей ПОЛ (МДА, ДК), что ведет к нормализации развития корней. Положительный эффект экзогенного антиоксиданта ЭКДШ, вероятно, способствует сохранению эндогенных антиоксидантных ферментов (СОД, ГР) листьев лука в области контрольных значений. ЭКДШ, благодаря наличию в составе антиоксидантов, может рекомендоваться для защиты растений от развития окислительного стресса, вызванного действием солей тяжелых металлов.

Литература

1. Удиванкин А. В. // Вестн. СамГУ. Естественно-научная сер. 2006. № 7(47). С. 232–235.
2. Иванова Е. М., Холодова В. П., Кузнецов В. В. // Физиол. раст. 2010. Т. 57, № 6. С. 864–873.
3. Половинкина Е. О., Кальясова Е. А., Симицына Ю. В. // Физиол. раст. 2011. Т. 58, № 6. С. 930–934.
4. Гао Ян, Чжоу Пэй, Мао Лян // Физиол. раст. 2010. Т. 57, № 4. С. 538–546.
5. Титов, А. Ф., Таланова В. В., Казнина Н. М. Устойчивость растений к тяжелым металлам / Институт биологии КарНЦ РАН. Петрозаводск, 2007.
6. Лиу Д., Т. Ц. Ли, С. Е. Ян // Физиол. раст. 2008. Т. 55, № 1. С. 73–82.
7. Розенцвет О. А., Мурзаева С. В., Гуцина И. А. // Изв. Самарского НАЦ РАН. 2003. Т. 5, № 2. С. 305–311.
8. Трокоз В. А. // Актуальные проблемы биологии в животноводстве: Материалы V Междунар. конф., посв. 50-летию ВНИИФБиП Боровск, 2010. С. 229–230.
9. Чиркин А. А., Коваленко Е. И., Толкачева Т. А. Биологическая активность продуктов гистолиза. Lambert Academic Publishing. Germany, 2012.
10. Чиркин А. А., Буко В. У., Балаева-Тихомирова О. М. Способ получения средства для профилактики инсулино-резистентности: Патент Республики Беларусь №15645. Зарегистрировано 26.12.2011.
11. Чиркин А. А., Концевая И. И., Толкачева Т. А. // Материалы юбилейной науч.-практ. конф. Гомель, 2009. С. 237–239.
12. Довгалюк А. И., Калиняк Т. Б., Блюм Я. Б. // Цитология и генетика. 2001. Т. 35, № 2. С. 3–10.
13. Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г. // Современные методы в биохимии. М., 1977. С. 66–68.
14. Dipierro S., Leonardis S. D. // J. Exp. Bot. 1997. Vol. 48. P. 779–783.
15. Митеева Л. П.-Е., Иванов С. В., Алексеева В. С. // Физиол. раст. 2010. Т. 57, № 1. С. 139–145.
16. Чевари С., Чаба И., Секей Й. // Лаб. дело. 1985. № 11. С. 678–681.
17. Радюк М. С., Будакова Е. А., Щербаков Р. А. // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2007. № 2. С. 71–74.

T. A. TOLKACHEVA

APPLICATION EXTRACT OAK SILKWORM PUPAE PREVENTION OXIDATIVE STRESS INDUCED BY HEAVY METAL SALTS HAVE *ALLIUM CEPA*

Summary

Oxidative stress, which develops under the influence of heavy metals on the sprouting onions, leads to the activation of free radical oxidation, which is manifested in the inhibition of root growth, the accumulation of lipid peroxidation products and an increase in the activity of antioxidant enzymes. Processing bulbs salts CuSO_4 and $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ in combination with EKDS partially prevents an increase of MDA, DK, and activity SOD, GR, which leads to the normalization of the roots. EKDS, thanks to the presence of antioxidants can be recommended for the protection of plants against oxidative stress caused by the action of salts of heavy metals.