

УДК 581.1:615

СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ АНТИОКСИДАНТОВ В ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ РАЗНЫХ ВИДОВ

Й.Р. Абдрахимова, Ю.А. Цветкова

Аннотация

В статье исследовано количественное содержание антиоксидантов (аскорбиновая кислота, флавоноиды) в листьях комнатных лекарственных растений (*Callisia fragrans* и *Aloe arborescens*) при стрессовых условиях (4–8°C, 12 сут, темнота). Выявлены одинаковые уровни исходного количества аскорбиновой кислоты и его повышения при стрессе, что сопровождалось понижением активности аскорбатоксидазы. Одновременно суммарное содержание флавоноидов увеличивалось, причем в зимний период оно было выше, чем в летний. Это свидетельствует о том, что концентрирование антиоксидантов в листьях является адаптивной реакцией на стресс и может быть рекомендовано для практического использования с целью повышения содержания ценных биологически активных веществ в лекарственном сырье.

Введение

За последние 10 лет в биологии и медицине резко возрос интерес к проблемам генерации активных форм кислорода (АФК) и антиоксидантной защиты клеток, что особенно актуально при действии различных стресс-факторов, когда АФК наряду с выполнением сигнальных функций вызывают окислительные повреждения клеток [1–7]. Как известно, в процессе эволюции у организмов появилась сложная и достаточно эффективная система антиоксидантов, состоящая из целого ряда как низкомолекулярных соединений (аскорбиновая кислота, глутатион, флавоноиды, α -токоферол и т. д.), так и высокомолекулярных (супероксиддисмутаза, каталаза, аскорбатпероксидаза и др.) [1–7]. Проблема защиты от АФК в клетках растений стоит особенно остро, так как они существуют при повышенных концентрациях молекулярного кислорода, выделяя его в результате фотолиза воды в хлоропластах [1].

У растений наиболее представленным количественно антиоксидантом является витамин С или аскорбиновая кислота (АК), которая благодаря наличию в структуре молекулы двух енольных групп легко окисляется до дегидроаскорбиновой кислоты с помощью аскорбатоксидазы (АО) или аскорбатпероксидазы (АПО) при участии, соответственно, молекулярного кислорода или перекиси водорода [2, 3, 8]. Как восстанавливающий агент АК способна напрямую реагировать с супероксид- и гидроксильными радикалами, а также участвовать в восстановлении других антиоксидантов (α -токоферол, глутатион), что позволяет нейтрализовать радикалы в гетерогенных системах, выводя их из легко окисляемой липидной фазы в водную [1–3]. Следует отметить, что организм человека, как и некоторых животных, утратил способность синтезировать АК и

должен получать ее в основном с растительной пищей и/или лекарственными препаратами в дозе около 100 мг в сутки [5, 9].

К важнейшим неферментным антиоксидантам относят флавоноиды – группу вторичных соединений фенольной природы, синтезирующихся только в высших растениях и обладающих Р-витаминной активностью [7, 10]. Они способны к быстрому восстановлению наиболее биологически опасных форм свободных радикалов ($O_2^{\cdot-}$, $OH^{\cdot-}$), могут подавлять образование АФК через ингибирование окислительно-восстановительных ферментов (монооксигеназу, циклооксигеназу, липооксигеназу, ксантиноксидазу), а также хелатировать ионы металлов с переменной валентностью, подавляя реакцию Фентона [2, 7]. Флавоноиды, очевидно, оказывают влияние на баланс всех окислительно-восстановительных процессов в клетках, поскольку препятствуют окислению АК [9, 10]. Синергизм (взаимоусиление) биологических эффектов витаминов С и Р имеет место как в растениях, так и животных тканях [10], например, при уменьшении проницаемости и ломкости кровеносных капилляров, что обуславливает их комплексное применение [9].

Исходя из этого, в данной работе одновременно оценивали количественное содержание АК и суммы флавоноидов, подвергая отсеченные побеги разных лекарственных растений действию стрессовых условий (4–8°C, 12 сут, темнота). Впервые такой метод обработки лекарственного сырья алоэ древовидного (*Aloe arborescens*) для получения так называемых биогенных стимуляторов был введен в практику академиком-офтальмологом В.П. Филатовым [11]. Несмотря на то, что в настоящее время его применяют при лечении различных болезней, вплоть до ишемической болезни сердца [9], химическая природа синтезирующихся веществ-адаптогенов до сих пор не выявлена. Длительные стрессовые условия могут, на наш взгляд, вызывать увеличение количества имеющихся биологически активных соединений, например, антиоксидантов, поскольку в литературе обсуждается факт тесной корреляции антиоксидантного статуса клеток и их устойчивости к стрессу [6]. Следовательно, исследования в данном направлении представляются актуальными как с теоретической, так и с практической стороны.

Одновременно с алоэ нами анализировались листья каллизии душистой (*Callisia fragrans* семейство *Commelinaceae*) или золотого уса, которые оказывают сходное терапевтическое действие и тысячелетиями использовались в фитотерапии коренными жителями Южной Америки. Хотя и в комнатном цветоводстве *C. fragrans* культивируют более 100 лет, повышенный интерес к нему в народной медицине отмечается в последнее время [12, 13]. Постулируется, что высокое содержание биологически активных веществ, в том числе витаминов С, В₂, В₁₂, флавоноидов, стероидов и ряда микроэлементов обуславливает широкий спектр фармакологических эффектов золотого уса [13], однако данные по биохимическому составу отсутствуют. В связи с этим целью работы было проведение сравнительной оценки содержания антиоксидантов (АК, флавоноиды), а также активности аскорбатоксидазы в листьях разных видов лекарственных растений (*C. fragrans* и *A. arborescens*) при действии стресс-факторов.

1. Объекты и методы исследования

Объектами исследования служили *Callisia fragrans* и *Aloe arborescens*, выращенные в комнатных условиях при естественном освещении и фотопериоде. Для опытов отбирали побеги со сформировавшимися листьями, которые выдерживали в течение 12 сут на средней полке холодильника (4–8°C, темнота) в полиэтиленовом пакете для предотвращения высыхания.

Спектрофотометрическое определение в фильтратах из листьев количества АК проводили по методу Ермакова и др. [14], общего содержания флавоноидов – по Государственной фармакопеи IX [15], активности аскорбатоксидазы – по методике Гавриленко и др. [16].

Результаты опытов, выполненных в 2–3-х биологических повторностях, каждая из которых имела по 4 аналитических, статистически обработаны [17]. На рисунках представлены средние арифметические величины и доверительные интервалы при $P = 0.95$.

2. Результаты и обсуждение

Результаты наших исследований показали, что количество АК в фильтратах из листьев каллизии и алоэ было примерно одинаковым и составляло 3.7 мг на грамм сухого веса (рис. 1) или 0.37%. Имеющиеся литературные данные по содержанию АК в продуктах и видах лекарственного сырья достаточно сложно сравнивать, поскольку они приводятся в разных единицах. В медицинских источниках чаще всего используется мг%, когда содержание рассчитано на 100 г продукта (сырого или сухого). Например, ягоды черной смородины содержат до 400 мг% АК или 400 мг на 100 г свежего продукта, тогда как «рекордсмены» – плоды шиповника – не менее 1000 мг% или 1 г в пересчете на 100 г сухого веса (10 мг/г сухого веса) [15, 18]. Ранее полученные нами данные о содержании АК в отварах плодов шиповника (от 8.6 до 15.5 мг/г сухого веса в зависимости от способов приготовления и хранения [19]) в целом согласовались со стандартами Государственной фармакопеи [15] и свидетельствовали о высокой степени экстрагируемости АК из данного вида лекарственного сырья.

Известно, что содержание АК видоспецифично и варьирует в зависимости от комплекса внешних и внутренних факторов, в том числе периода вегетации растений [20–22]. Например, максимальным содержанием АК в листьях *Allium obliquum* было в фазу цветения, а у *A. altaicum* – в фазу бутонизации [20, 21]. Г.Ф. Антоновой и др. [22] установлено, что суммарное содержание АК в ранней древесине лиственниц почти в два раза превышает ее количество в поздней древесине. По мнению авторов, это связано с сезоном года, стадией и степенью дифференцировки трахеид, а также типом формирования древесины.

После выдерживания сырья в стрессовых условиях содержание АК как в каллизии, так и в алоэ увеличивалось в среднем на 20% и достоверно не различалось между видами (рис. 1). Вместе с тем, по данным Н.Ю. Таракановой с соавт. [23], исходный уровень АК в побегах проростков озимой пшеницы был выше, чем в корнях, на 50%, причем холодное закаливание (3°C, 7 сут) поднимало его в листьях почти вдвое, а в корнях, наоборот, снижало на 25%, что

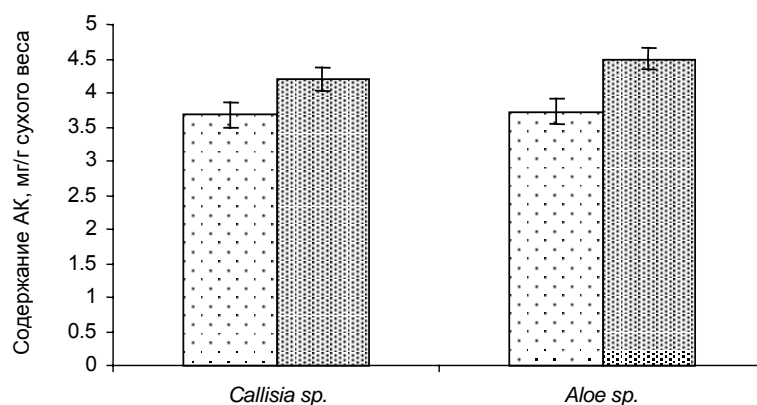




Рис. 1. Содержание АК в листьях каллизии и алоэ:  – в комнатных условиях (23°C);  – в стрессовых условиях (4–8°C, 12 сут, темнота)

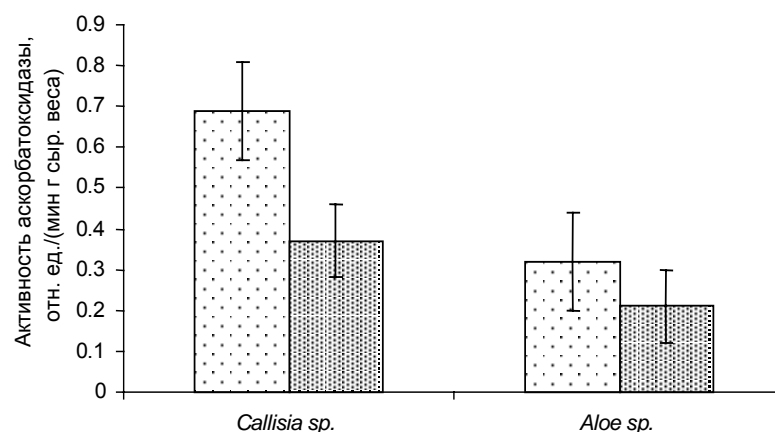


Рис. 2. Активность аскорбатоксидазы в листьях каллизии и алоэ. Обозначения те же, что и на рис. 1

можно объяснить органоспецифичностью аскорбатного обмена как у незакаленных, так и закаленных к холоду растений.

Уровень восстановленной АК в клетках, как отмечалось выше, зависит от активности ряда ферментов, в том числе аскорбатоксидазы (АО), которая свойственна растительным организмам [3, 8, 24]. Согласно полученным данным, активность АО у листьев растений, выращенных в комнатных условиях, составила в среднем 0.7 ед. падения оптической плотности за минуту на грамм сырого веса в варианте с каллизией и 0.3 ед. – с алоэ (рис. 2).

Таким образом, наблюдали более чем двухкратную разницу в активности АО (рис. 2) при одинаковом уровне восстановленного аскорбата у изучаемых объектов (рис. 1). Это может быть связано с видоспецифическими особенностями процессов, составляющих и/или влияющих на метаболизм аскорбиновой кислоты, в первую очередь, на функционирование аскорбат-глутатионового цикла, от которого зависит регенерация восстановленной АК [1–3].

В стрессовых условиях наблюдали снижение активности АО, которое было достоверным и более выраженным у каллизии – на 40% по сравнению с 20% у алоэ от контроля, сама же активность составила 0.37 и 0.2 ед. соответственно (рис. 2). Таким образом, неблагоприятные условия, наряду с повышением уровня восстановленной АК (рис. 1), вызывали у обоих видов подавление активности одного из основных АК-окисляющих ферментов – АО (рис. 2).

Анализ литературных данных также позволяет говорить о существовании обратной зависимости между содержанием в тканях АК и активностью АО. Так, для корней пшеницы разными авторами были выявлены относительно высокий уровень активности АО (3.7 ед.) [24] и низкое содержание АК [23]. При этом в экстраклеточном растворе активность АО практически отсутствовала (0.031 ед.), что, по мнению А.В. Часова [24], способствует лучшему проявлению аскорбатом антиоксидантных свойств, тем более что апопластной АК отводится важная роль в защите от внешних повреждающих факторов, в том числе озона [1, 4].

Между тем одной из основных физиологических функций апопластной АК считается регуляция зависимой от пероксидаз скорости биосинтеза лигнина: пока АК доступна для H_2O_2 , процессы полимеризации и сшивки фенольных соединений тормозятся [22]. Действительно, иммуноцитохимические исследования, проведенные на корневых апексах проростков тыквы, выявили преимущественную локализацию АО в клеточных стенках и вакуолях без детекции в последних АК и, наоборот, отсутствие АО в ядре, митохондриях, пластидах, цитозоле на фоне максимальной компартментации АК в ядерной и плазматической мембранах [8]. Эти факты противоречат цитированному выше положению о низкой активности экстраклеточного АО в корнях пшеницы [24], так как логично предположить существование прямой зависимости между содержанием и активностью изучаемого фермента. На настоящий момент остается неясным, если это только не связано с видоспецифическими особенностями, как может апопластная АК одновременно эффективно выполнять антиоксидантную функцию с негативной регуляцией процессов лигнификации, которые, как хорошо известно, также усиливаются при действии неблагоприятных факторов? Возможно, что функции апопластной АО преимущественно связаны с модуляцией концентрации кислорода наподобие ситуации, которая имеет место в корнях, где от локализации АО, как считают авторы [8], зависит дифференцированная доступность кислорода к разным клеткам и тканям. Последнее, в конечном итоге, определяет их метаболизм и темпы деления: минимальные в случае покоящегося центра и ксилемных сосудов и максимальные – у проксимальной меристемы и корневых примордий.

Следовательно, можно констатировать, что физиологическое значение АО не ограничено лишь утилизацией АФК, хотя оба окисляющих АК в ДАК фермента – АО и АПО – относятся к антиоксидантным, поскольку в результате их функционирования образуется окислительно-восстановительная система, способная как отдавать, так и принимать электроны и протоны [3, 24]. При этом именно АПО, будучи компонентом аскорбат-глутатионового цикла, является основным ферментом, утилизирующим H_2O_2 у растений [1, 3–6]. Вместе с тем, литературные данные относительно активности АПО при действии факторов,

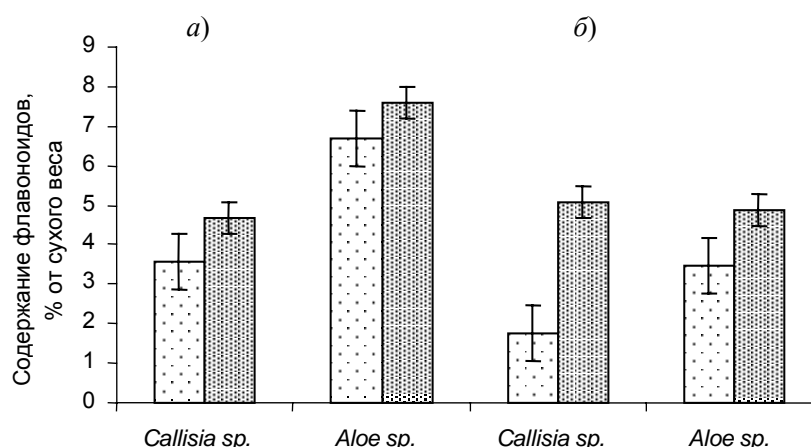


Рис. 3. Содержание флавоноидов в листьях растений в зимний (а) и летний (б) сезоны. Обозначения те же, что и на рис. 1

индуцирующих образование АФК, противоречивы. Так, при добавлении в среду выращивания проростков горчицы сарептской солей тяжелых металлов, а именно сульфата меди (50–200 мкМ, 2 сут), активность АПО в корнях и листьях увеличивалась в среднем на 25 и 110% соответственно [6]. Вместе с тем, холодовая экспозиция (2°C, 1–24 ч) целого ряда теплолюбивых видов приводила лишь к небольшим и разнонаправленным изменениям АПО, в целом некоррелировавших со степенью повреждений [5]. Следовательно, вопрос о связи антиоксидантного статуса клеток и их устойчивости остается открытым, и его дальнейшее решение представляется важным для поиска и идентификации молекулярно-биохимических маркеров при стресс-диагностике растений.

При определении содержания другой группы антиоксидантов – флавоноидов – в качестве стандартов были использованы виды аптечного лекарственного сырья бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium*) и горца птичьего (*Poligonum aviculare*). Суммарное количество флавоноидов в этих видах сырья составило, соответственно, 20 и 10% от сухой массы, что соответствует Государственной фармакопеи [15].

Исходное суммарное содержание флавоноидов в листьях каллизии составляло 1.7% (летом) и 3.6% (зимой), а у алоэ – 3.4 и 6.6% соответственно (рис. 3). Следовательно, у алоэ исходная сумма флавоноидов была практически в два раза больше, чем у каллизии, и приближалась к таковому *P. aviculare*, причем у «зимних» вариантов обоих видов она повышалась почти вдвое по сравнению с «летними», что можно объяснить одинаковым снижением температуры выращивания на подоконнике (рис. 3, а). В стрессовых условиях увеличение количества флавоноидов отмечалось у обоих видов, причем в зимний период оно было недостоверным (рис. 3, а), а летом – более существенным – 60% у каллизии и 30% у алоэ (рис. 3, б). В последнем случае содержание флавоноидов было примерно одинаковым и составляло около 5% от сухого веса.

На растениях озимой пшеницы также показано, что длительное холодовое закаливание вызывало увеличение пула растворимых фенольных соединений, основными компонентами которых служили флавоноиды, почти в 2 раза по

сравнению с незакаленным контролем [25]. Эти изменения были выражены только в листьях, в которых функционируют как фенилпропаноидный, так и флавоноидный пути биосинтеза фенольных соединений, тогда как у узлов кущения и корней отсутствие последнего, по-видимому, обуславливало в основном усиление лигнификации. Совокупность полученных нами и литературных данных указывает на универсальный характер холод-индуцированного концентрирования флавоноидов в листьях растений, что может являться одной из приспособительных реакций в ответ на воздействие стресс-факторов. Это, возможно, связано с тем, что флавоноиды, как и АК, играют важную роль в антиоксидантной защите клеток благодаря наличию в своей структуре ароматического кольца, которое связано с одной или несколькими гидроксильными группами, способными тормозить радикальные процессы окисления [2, 7]. Экспериментальные данные А.И. Потапович и В.А. Костюк [7] по иницированию свободно-радикальных процессов в микросомальных мембранах показали, что с увеличением гидроксильных групп возрастает антирадикальная активность соединений, поэтому у флавоноидов она является даже более выраженной, чем у АК.

Как отмечалось выше, действие холодового стресса в зимний период на растения обоих видов было наименее выражено (рис. 3, а). Более высокое исходное содержание флавоноидов и незначительное влияние низких температур зимой, на наш взгляд, связано с преадаптацией растений к пониженным температурам в комнатных условиях. По результатам исследований Н.В. Загоскиной и др. [26], в культуре ткани грузинского чайного растения содержание растворимых фенольных соединений, в основном флавоноидов, и активность ключевого фермента фенольного метаболизма – L-фенилаланин-аммиак-лиазы – проявляли сезонную вариабельность, несмотря на факторостатность условий культивирования. Изучаемые показатели были минимальными в феврале, а максимальными – в июле, что согласовалось с интенсивностью сезонного образования полифенолов в побегах исходного чайного растения в естественных условиях произрастания. Возможно, что комнатные растения, как и культура клеток, сохраняют генетическую память о сезоне роста, что может быть отражаться на накоплении вторичных метаболитов. Вместе с тем учитывая происхождение *C. fragrans* и *A. arborescens*, наиболее вероятным представляется влияние в зимний период *per se* пониженных температур и освещенности, а также атмосферной засухи, что приводило, в свою очередь, к снижению реакции в ответ на помещение отсеченных побегов в стрессовые условия (рис. 3).

Таким образом, увеличение содержания АК и флавоноидов в листьях разных видов лекарственных растений (*C. fragrans* и *A. arborescens*) можно отнести к стратегии их вовлечения в антиоксидантную защиту клеток в стрессовых условиях, а данный прием повышения количества ценных биологически активных веществ в лекарственном сырье рекомендовать для практического использования.

Summary

Y.R. Abdrakhimova, U.A. Tsvetkova. The stress-induced changes of antioxidants content in plant leaves.

The quantitative contents of the antioxidants (ascorbate and flavonoids) in leaves of domestic medical plants (*Callisia fragrans* и *Aloe arborescens*) under influence of stress-factors (4–8°C, 12 d, dark) were investigated. It has been revealed that the initial levels of ascorbic acid in leaves of different species were similar, and its raising at stress was accompanied by the reduction of the ascorbic acid oxidase activities. Simultaneously, total contents of flavonoids increased, and in winter period they were higher than in summer one. This is evidence that the antioxidant concentrating is adaptive reaction to the stresses and can be recommended for the practical applications with the purpose of increasing of the valuable biological active compounds in the medical herbs.

Литература

1. Чиркова Т.В. Физиологические основы устойчивости растений. – СПб: Изд-во С.-Петербург. ун-та, 2002. – 240 с.
2. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщиков Е.Б. Окислительный стресс. – М.: Наука/Интерпериодика, 2001. – 343 с.
3. Дэвис М., Остин Дж., Патридж Д. Витамин С. Химия и биохимия. – М.: Мир, 1999. – 176 с.
4. Bräuning H., Pahlich E., Muller D., Jüger H.-J. Changes of the redox status of glutathione and ascorbate in leaves and apoplast of *Phaseolus vulgaris* cultivars under ozone stress // *Phyton* (Austria) Special Issue. – 2005. – V. 45. – P. 293–297.
5. Лукаткин А.С. Вклад окислительного стресса в развитии холодового повреждения в листьях теплолюбивых растений. 2. Активность антиоксидантных ферментов в динамике охлаждения // *Физиология растений*. – 2002. – Т. 49, № 6. – С. 878–885.
6. Дэви С.Р., Прасад М.Н.В. Антиоксидантная активность растений *Brassica juncea*, подвергнутых действию высоких концентраций меди // *Физиология растений*. – 2005. – Т. 52, № 2. – С. 233–237.
7. Потапович А.И., Костюк В.А. Сравнительное исследование антиоксидантных свойств и цитопротекторной активности флавоноидов // *Биохимия*. – 2003. – Т. 68, Вып. 5. – С. 632–638.
8. Liso R., Tullio M.C.D., Ciraci S. Localization of Ascorbic Acid, Ascorbic Acid Oxidase, and Glutathione in Roots of *Cucurbita maxima* L. // *J. Exp. Botany*. – 2004. – V. 55, No 408. – P. 2589–259
9. Машковский М.Д. Лекарственные средства. – М.: Медицина, 1993. – 685с.
10. Барабой В.А. Растительные фенолы и здоровье человека. – М.: Наука, 1984. – 160 с.
11. Филатов В.П. Тканевая терапия (Учение о биогенных стимуляторах). – М.: Знание, 1952. – 48 с.
12. Нестерова Д.В. Золотой ус – домашний доктор. – М.: РИПОЛ классик, 2004. – 63 с.
13. Воробьева Г.Н. Золотой ус, или кукурузница // *Айболит*. – 2004. – № 20. – С. 3–5.
14. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Смирнова-Иконникова М.И., Ярош Н.П., Луковникова Г.А. Методы биохимического исследования растений. – Л.: Колос, 1972. – 455 с.
15. Государственная фармакопея СССР. Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. – М.: Медицина, 1990. – 397 с.

16. Гавриленко В.Ф., Ладыгина М.Е., Хандобина Л.М. Большой практикум по физиологии растений. – М.: Высш. шк., 1975. – 392 с.
17. Акберова Н.И. Сравнение данных. Параметрические критерии значимости. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2004. – 30 с.
18. Муравьева Д.А. Фармакогнозия. – М.: Медицина, 1978. – 656 с.
19. Цветкова Ю.А., Хасанова Л.Н., Абдрахимова Й.Р. Сравнительный анализ биологически активных веществ у разных видов лекарственных растений // Тез. докл. I (IX) Международ. конф. молодых ботаников. – СПб.: 2006. – С. 280.
20. Данилова А.Н. Содержание аскорбиновой кислоты и растворимых сахаров у *Allium altaicum* Pall. при выращивании в Алтайском ботаническом саду АН Казахстан // Растительные ресурсы. – 1993. – Вып. 4. – С. 55–59.
21. Кучеров Е.В., Хайретдинов С.С. Продуктивность *Allium obliquum* L. и содержание в нем аскорбиновой кислоты // Растительные ресурсы. – 1982. – Вып. 3. – С. 185–189.
22. Антонова Г.Ф., Чаплыгина И.А., Вараксина Т.Н., Стасова В.В. Аскорбиновая кислота и развитие клеток ксилемы в стволе лиственницы сибирской // Физиология растений. – 2005. – Т. 52, № 1. – С. 97–107.
23. Тараканова Н.Ю., Хохлова Л.П., Палих Э. Стабильность цитоскелета к холоду: микротрубочки и окислительно-восстановительная система цитоплазмы озимой пшеницы // Грани сотрудничества между Казанским и Гиссенским университетами. – Казань: УНИПРЕСС, 1999. – С. 324–338.
24. Часов А.В. Генерация супероксид-аниона и активность пероксидазы при модификации проводимости плазмалеммы корневых клеток пшеницы: Дис. ... канд. биол. наук. – Казань, 2002. – 133 с.
25. Загоскина Н.В., Олениченко Н.А., Климов С.В., Астахова Н.В., Живухина Е.А., Трунова Т.И. Изменения в CO₂ газообмене и образование фенольных соединений у растений озимой пшеницы как следствие холодового закаливания // Физиология растений. – 2005. – Т. 52, № 3. – С. 366–371.
26. Загоскина Н.В., Усик Т.В., Запрометов М.Н. Культура ткани чайного растения: активность L-фенилаланинаммиак-лиазы (ФАЛ), образование фенольных соединений и сезонная вариабельность // Физиология растений. – 1990. – Т. 37, № 3. – С. 511–517.

Поступила в редакцию
15.12.06

Абдрахимова Йолдыз Раисовна – кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии и биотехнологии растений Казанского государственного университета.
E-mail: yoldez.abdrahimova@ksu.ru

Цветкова Юлия Александровна – студентка кафедры физиологии и биотехнологии растений Казанского государственного университета.