

УДК 547.56 + 547.567 + 547.569.1

БИОХИМИЯ

Д. И. СТОМ, Л. П. БОБОВСКАЯ, С. С. ТИМОФЕЕВА, Г. В. КАЛМЫЧКОВ,
О. М. КОЖОВА

ВЛИЯНИЕ ФЕНОЛОВ И ПРОДУКТОВ ИХ ОКИСЛЕНИЯ НА ВОДНЫЕ РАСТЕНИЯ И СОДЕРЖАНИЕ В НИХ СУЛЬФИДРИЛЬНЫХ ГРУПП

(Представлено академиком М. Х. Чайлаханом 25 I 1974)

Фенольные соединения являются ингредиентами сточных вод многих производств, в частности предприятий целлюлозно-бумажной промышленности. Повышенная токсичность некоторых полифенолов связана с образованием хиноидных продуктов их окисления (¹⁻²). Изучение звеньев биохимического обмена, нарушающихся при воздействии фенолов на растения, представляется существенным по следующим соображениям: 1) позволяет выявить наиболее опасные для гидробионтов соединения фенольной природы, которые необходимо устранить прежде всего; 2) дает возможность наметить пути ослабления отрицательного влияния фенолов; 3) помогает в исследовании физиологической роли эндогенных фенолов и условий проявления их активности в самой клетке.

Образующиеся при окислении фенолов хиноны могут вступать во взаимодействие со многими химическими компонентами протоплазмы, но особенно высокую реакционную способность они проявляют по отношению к тиолам (³). От состояния SH- и SS-групп зависит нормальное протекание основных физиологических процессов (⁴). Важная роль отводится SH-группам в представлениях о регуляции ферментативных реакций в организмах и в гипотезах, предложенных для объяснения действия ингибиторов роста и различных экстремальных факторов на растения (⁵).

На основании вышесказанного нам представлялось интересным проследить возможную взаимосвязь между способностью водных растений окислять фенолы и действием фенольных соединений на содержание SH- и SS-групп в растительных тканях.

Из водных растений использовали *Elodea canadensis*, *Nitella* sp., *Dunaliella* sp. Критерием токсичности испытуемых соединений служила минимальная концентрация веществ, останавливающих движение протоплазмы хары или хлоропластов элодеи через 15 мин. (⁶⁻⁷) и вызывающая обездвиживание клеток *Dunaliella* sp. Для получения ортохинонов использовали окисление соответствующих фенолов солями четырехвалентного церия (⁸). Кислород определяли полярографически на платиновом электроде, покрытом полистироловой пленкой (⁹). Точность полярографических определений $\pm 3\%$. Растительный материал брали в количестве 300 мг на 10 мл буферного раствора. Количество сульфгидрильных групп находили амперометрическим титрованием с AgNO_3 (¹⁰) (средняя ошибка в наших условиях 8%). Перед гомогенизированием растения замораживали жидким азотом. Титрование проводили в аммиачно-метанольной смеси pH 9 ($0,25\text{ M NH}_4\text{OH}$, $0,05\text{ M NH}_4\text{NO}_3$ и $13\% \text{CH}_3\text{OH}$). Содержание SH-групп находили по (¹⁰). В качестве основных фенольных соединений в работе использовали пирокатехин, гидрохинон, резорцин. Причины выбора этих соединений обсуждены ранее (²).

В табл. 1 показано увеличение поглощения кислорода водными растениями при добавлении растворов полифенолов. Из приведенных данных

видно, что наиболее интенсивное поглощение кислорода происходит в опытах с харой на растворах пирокатехина, а в случае *Dunaliella* и элодеи — на растворах гидрохинона.

Добавление к смеси бензолсульфиновой кислоты или анилина и последующее хроматографирование продуктов реакции ⁽¹¹⁾ показало, что окисление водными растениями пирокатехина приводит к образованию ортобензохинона, а гидрохинона — к появлению парабензохинона, причем на окисление 1 моля фенола расходуется 1 моль кислорода, что находится в соответствии с литературными данными ⁽¹²⁾. В гомогенатах

Таблица 1

Увеличение поглощения кислорода и снижение содержания SH-групп при обработке водных растений полифенолами

Полифенол	Концентрация фенолов, М		Время обработки, час. *	Снижение содержания SS-групп, % к контролю	Содержание SS-групп, мкмол/г	Увеличение поглощения кислорода, % к контролю
	ΔSH—	ΔO ₂				
Nitella sp.						
Пирокатехин	1·10 ⁻²	2·10 ⁻³	2,5	38	0,38	91,7
Гидрохинон	1·10 ⁻²	2·10 ⁻³	2,5	26	0,40	50,6
Резорцин	1·10 ⁻²	2·10 ⁻³	2,5	2,3	0,40	12,3
Elodea canadensis						
Пирокатехин	1·10 ⁻²	2·10 ⁻³	2,5	40,7	0,62	27,3
Гидрохинон	1·10 ⁻²	2·10 ⁻³	2,5	54,8	0,88	42,4
Резорцин	1·10 ⁻²	2·10 ⁻³	2,5	2,1	0,58	12,3
Dunaliella sp.						
Пирокатехин	1·10 ⁻³	5·10 ⁻⁵	0,5	51,9	2,18	27,3
Гидрохинон	1·10 ⁻³	5·10 ⁻⁵	0,5	72,5	2,18	65,5

* Время обработки при определении Δ O₂ равно во всех случаях 1 часу.

хары, элодеи и *Dunaliella* sp. сохранялось то же самое соотношение в скоростях окисления диоксипбензолов, что и при окислении полифенолов целыми растениями. Из этого следует, что преимущественное окисление под действием одних растений — пирокатехина, а других — гидрохинона не есть результат избирательного проникновения фенолов в эти растения, а является следствием субстратной специфичности их оксидаз. Поглощение кислорода водными растениями при добавлении резорцина во всех случаях не выходило за пределы ошибки опыта.

При оценке действия фенольных соединений на водные растения получили, что наиболее токсичным для хары является пирокатехин, для элодеи и *Dunaliella* sp. — гидрохинон ⁽¹³⁾. Наименьшую токсичность на всех трех объектах проявлял резорцин. Сопоставление результатов по определению влияния полифенолов на сульфгидрильные группы растений и на потребление кислорода позволяет установить наличие прямой связи между токсичностью фенольных соединений и способностью водных растений окислять данные фенолы (табл. 1). Полученный вывод хорошо согласуется с ослаблением действия пирокатехина, гидрохинона и парабензохинона на движение протоплазмы в присутствии тиоловых соединений ⁽¹³⁾, которые могут восстанавливать хиноны и предотвращать окисление фенолов.

Как видно из табл. 1, наибольшее падение содержания тиоловых групп в растениях имело место при обработке их растворами хинонов и тех фенолов, которые вызывали наиболее интенсивное поглощение кислоро-

да. В случае хары — это пирокатехин, а элодеи и *Dunaliella* sp. — гидрохинон. Так как фенольные соединения не способны окислять сульфгидрильные группы, то падение содержания SH-групп при обработке гидрохиноном и пирокатехином можно рассматривать как довод в пользу того, что токсичное действие фенолов на водные растения тесно связано с появлением продуктов их окисления — хинонов. Это положение подтверждают и данные по отсутствию влияния резорцина на содержание SH-групп

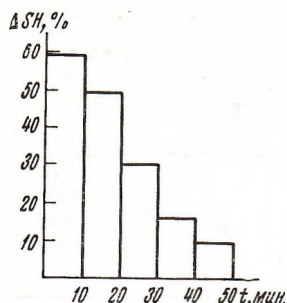


Рис. 1. Изменение содержания SH-групп элодеи при обработке раствором *o*-бензохинона, взятым в разное время с момента его получения

в растениях (табл. 1). Уменьшение содержания тиолов в тканях элодеи зависит от концентрации и времени обработки парабензохиноном. Из этого следует, что влияние хинонов не сводится к каталитическому окислению SH-групп, а заключается в непосредственном химическом взаимодействии с ними. Независимо от того, чем было вызвано снижение числа SH-групп, действием полифенолов или хинонов, количество SS-групп оставалось постоянным. Поэтому с большей вероятностью можно говорить о том, что взаимодействие между тиолами и продуктами окисления фенолов прежде всего протекает по типу 1,4-присоединения, а не за счет окисления SH-групп до образования SS-связей.

Окислительные превращения фенолов сопровождаются появлением большого числа различных продуктов. Какие из них несут основную ответственность за уменьшение содержания

SH-групп? В связи с этим изучали полярографически кинетику распада ортобензохинона, хинонов кофейной и хлорогеновой кислот и способность их растворов снижать концентрацию сульфгидрильных групп в элодее.

Из рис. 1 видно, что наиболее сильное падение содержания SH-групп происходит при обработке элодеи раствором ортобензохинона в момент его образования, т. е. когда концентрация хинона наиболее высокая. Аналогичный характер имели кривые зависимости между скоростью распада хинонов (ортобензохинона, хинонов кофейной и хлорогеновой кислот) и уменьшением концентрации сульфгидрильных групп в растворе цистеина, взятом в качестве модельного соединения. По мере распада ортохинонов и снижения их концентрации падала и способность растворов уменьшать содержание тиоловых групп в растворе.

Таким образом, на основании проведенных опытов и литературных данных можно сделать вывод, что более высокая по сравнению с другими фенолами токсичность пирокатехина и гидрохинона для водных растений связана с их способностью окислять фенолы, причем одним из наиболее вероятных биохимических механизмов проявления токсичного действия продуктов окисления фенолов является блокирование ими SH-групп. Окисление пирокатехина и гидрохинона при их поступлении в клетку, сопровождающееся снижением содержания сульфгидрильных групп, неспособность растворов парабензохинона, пирокатехина и гидрохинона при наличии в инкубационной среде тиоловых соединений подавлять движение протоплазмы, наличие общих черт в воздействии на растения хинонов и метаболического яда — парахлормеркурбензоата натрия — все это факты, позволяющие говорить о специфичном, избирательном влиянии хинонов, пирокатехина и гидрохинона на водные растения. Достоверность подобного вывода подтверждается также: 1) отсутствием снятия эффекта действия хинонов и *o*, *p*-диоксибензолов при отмывании растений и последующего перенесения их со среды с токсикантами на среду без них; 2) результатами влияния, по принципу Фергюсона, эффектов хинонов, фенольных соединений и заведомо известных наркотиков на движение протоплазмы хары. В противоположность этому, быстрое

падение токсичности, как и у наркотиков, по мере снижения термодинамических концентраций ⁽¹⁴⁾, восстановление движения протоплазмы после отмывания, отсутствие поглощения кислорода и сохранение на прежнем уровне меркаптогрупп при добавлении фенолов имело место при испытании другой группы фенольных соединений, а именно гваякола, диметилвых эфиров гидрохинона и пирокатехина, тимола, *n*-, *m*-крезолов, β -нафтола. Из этого следует, что влияние второй группы фенольных соединений на водные растения сходно с характером действия биологических депрессантов (наркотиков, неэлектролитов, структурно-неспецифических агентов). Подобное заключение находится в хорошем соответствии с данными ^(15, 16) о неспецифическом действии некоторых фенолов на высшие наземные растения.

В заключение авторы пользуются случаем выразить благодарность О. Н. Чернышевой за помощь при проведении эксперимента, К. С. Бокареву, Л. В. Метлицкому, О. Л. Озерецковской и В. И. Кефели за ценные советы.

Иркутский государственный университет
им. А. А. Жданова

Поступило
18 I 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Р. Х. Турецкая, В. И. Кефели, Физиол. раст., т. 10, 98 (1963). М. Tomoszewski, Flora, v. 145, 146 (1957); Л. В. Метлицкий, О. Л. Озерецковская и др., ДАН, т. 202, 228 (1972). ² Д. И. Стом, ДАН, т. 186, 714 (1969). ³ H. S. Mason, Advances in Enzymol., v. 16, 105 (1955). ⁴ Ю. М. Торчинский, Сульфгидрильные и дисульфидные группы белков, М., 1971. ⁵ К. С. Бокарев, Л. М. Капелюшникова и др., Физиол. раст., т. 13, 705 (1966); I. L. J. Vilbao, Rev. cienc. apl., v. 20, 132 (1966); Д. И. Стом, в кн. Рост, развитие и устойчивость растений (Тр. III конф. физиол. и биохим. растений Сибири и Дальнего Востока), Иркутск, 1969; Н. М. Эмануэль, в кн. Фенольные соединения и их биологические функции, М., 1968. ⁶ С. В. Тагеева, Э. Н. Кизанцев, Изв. АН СССР, сер. биол., № 6, 885 (1962). ⁷ Д. И. Стом, Г. Г. Иванова и др., Информ. бюлл. СО АН СССР, в. 10, Иркутск, 1972, стр. 23. ⁸ Д. И. Стом, С. С. Тимофеева и др., там же, стр. 92. ⁹ Е. Н. Мохова, Л. Н. Некрасова, Л. П. Плетнева, Научн. докл. высш. школы, Биол. науки, № 1, 126 (1972). ¹⁰ S. Waisel, H. Kohn, J. Levitt, Plant Physiol., v. 37, 272 (1962). ¹¹ Д. И. Стом, С. С. Тимофеева и др., ДАН, т. 205, 989 (1972). ¹² М. Н. Запрометов, Биохимия катехинов, М., 1964. ¹³ Д. И. Стом, Г. Г. Иванова и др., Матер. координационного совещ. по водной токсикологии, Киев — Борок, 1973. ¹⁴ Э. Альберт, Избирательная токсичность, М., 1971. ¹⁵ В. И. Кефели, Р. Х. Турецкая, Физиол. раст., т. 14, 796 (1967). ¹⁶ В. Б. Иванов, Журн. общ. биол., т. 27, № 3, 299 (1966).