

**П. В. Масленников, Г. Н. Чупахина
А. Г. Краснопёров**

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ГАЗОРАЗРЯДНОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ
ПРИ ОЦЕНКЕ АНТИОКСИДАНТНОГО СТАТУСА РАСТЕНИЙ
В УСЛОВИЯХ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ КАДМИЯ**

Проведена оценка антиоксидантного статуса растений с применением ГРВ-метода в условиях токсического действия кадмия. Выявлено, что высокие концентрации Cd в почве стимулируют накопление антоцианов, каротиноидов, аскорбиновой кислоты и способствуют снижению содержания водорастворимых антиоксидантов в листьях исследуемых растений. Показано, что ГРВ-энтропия может использоваться в качестве информативной характеристики состояния растительного организма, с помощью которой можно определять антиоксидантный статус растений и степень их адаптации к токсическому действию ионов кадмия.



This article presents an evaluation of the antioxidant status of plants with the use of the GDV-method under the toxic effect of cadmium. A high concentration of Cd in the soil is proven to stimulate the accumulation of anthocyanins, carotenoids, and ascorbic acid and to contribute to a reduction in the concentration of water-soluble antioxidants in the leaves of the plants under consideration. It is shown that GDV-entropy can be used as a principal characteristic of the state of a vegetative organism when estimating the antioxidant status of plants and the degree of their adaptation to the toxic effect of cadmium ions.

Ключевые слова: окислительный стресс, кадмий, антиоксиданты, ГРВ-метод.

Key words: oxidative stress, cadmium, antioxidants, GDV-method.

15

Исследования биологических объектов методом газоразрядной визуализации основываются на усилении сверхслабых процессов, протекающих в них. Метод ГРВ-графии позволяет регистрировать в виде цифровых изображений и количественно оценивать свечение, возникающее вблизи поверхности объекта при помещении его в электромагнитное поле высокого напряжения. При этом исследуется стимулированная электромагнитным полем и газовым разрядом эмиссия фотонов, электронов и других частиц биологического объекта. В основе всех излучений тканей организма в видимой и ультрафиолетовой областях спектра лежит одна из разновидностей люминесценции, индуцированная различными физическими факторами: ультрафиолетовым и видимым излучением – фотолюминесценция, ионизирующим излучением – радиолюминесценция, электрическим током – электролюминесценция, химическими реакциями – хемилюминесценция [1; 2]. Развитие метода ГРВ-графии способствовало открытию новых перспектив исследований живых объектов. Биологическая эмиссия усиливается в газовом разряде, переводится в цифровой код посредством системы видеопреобразования и поступает в компьютер. В основе параметрического анализа ГРВ-грамм лежат компьютерные методы обработки изображений, которые включают вычисление амплитудных, геометрических, яркостных, фрактальных и вероятностных параметров. Геометрические параметры ГРВ-грамм, несущие информацию о характеристиках изучаемого объекта: площадь газоразрядного изображения (ГРИ), нормализованная площадь, интегральный коэффициент площади, коэффициенты эмиссии, формы, фрактальности [3; 4].

Одной из наиболее информативных характеристик ГРВ-грамм является показатель энтропии, которая представляет собой следующую величину:

$$S = - \int_{f_{\min}}^{f_{\max}} p(f) \ln p(f) df, \quad (1)$$

где

$$p(f) = P(f) / \int_{f_{\min}}^{f_{\max}} P(f) d(f); \quad (2)$$



$$f(x) = 2\pi F(x) / \int_0^{2\pi} F(x) dx; \quad (3)$$

$F(x)$ – распределение яркости как функции некоторого аргумента x в пределах $[0, 2\pi]$; $P(f)$ – распределение плотности функции $f(x)$ в интервале $[f_{\min}, f_{\max}]$; f_{\min} и f_{\max} соответствуют выражению (3) при 2π и 0 .

Функции $f(x)$ и $p(f)$ удовлетворяют следующим условиям нормировки:

$$\int_0^{2\pi} f(x) dx = 1, \quad \int_{f_{\min}}^{f_{\max}} P(f) df = 1.$$

16

Изменение энтропии открытой системы может происходить лишь за счет процессов обмена системы энергией и веществом с внешней средой либо за счет возникновения энтропии внутри самой системы вследствие происходящих там необратимых процессов, что отражается на течении метаболических процессов [5; 6]. С этой точки зрения остается открытым вопрос о возможности использования показателя информационной энтропии, который вычисляется при обработке ГРВ-грамм, в качестве параметра, характеризующего физиологическое состояние организма, скорость протекания обменных процессов и степень адаптации растений к неблагоприятным факторам окружающей среды.

В связи с этим целью нашего исследования стала оценка антиоксидантного статуса растений с использованием технологии газоразрядной визуализации (ГРВ-метод) в условиях токсического действия кадмия, для реализации которой вычислялось суммарное содержание водорастворимых фенольных антиоксидантов, определялись уровень некоторых антиоксидантов (аскорбиновой кислоты, антоцианов, каротиноидов) в листьях растений, произрастающих в присутствии различных концентраций CdCl_2 , а также фрактально-энтропийные характеристики ГРВ-грамм исследуемых растений и растворов антиоксидантов.

В качестве объектов исследований были выбраны листья растений озимой ржи (*Secale cereale* L.) сорта Пуховчанка, овсяницы красной (*Festuca rubra* L.) сорта Maxima, мятлики лугового (*Poa pratensis* L.) сорта Valin, выращенных в установке ТКШ-1 «Флора» (температура выращивания $18-22$ °C) при постоянном освещении светом люминесцентных ламп ЛБУ-30 интенсивностью $7 \text{ Дж/м}^2 \cdot \text{с}$. В течение 20-дневного вегетационного периода экспериментальные растения находились в почве (легкий суглинок), в которую одноразово внесли при закладке опыта от 2 до 200 мг/кг CdCl_2 . Контрольные растения находились в почве, имеющей фоновый уровень Cd. Для нейтральных и близких к нейтральным суглинистым и глинистым почв ОДК Cd составляла 2 мг/кг [7]. В листьях исследуемых растений спектрофотометрически определялся уровень каротиноидов, антоциановых пигментов [8]. Количество аскорбиновой кислоты вычисляли методом титра [8], а суммарное содержание антиоксидантов (АОА) – ампе-



рометрически по методике Я.И. Яшина на приборе «Цвет Яуза 01-ААА» [9]. Оценка фрактально-энтропийных характеристик ГРВ-грамм исследуемых растений и растворов антиоксидантов, витаминов различной концентрации (кверцетин, аскорбиновая кислота, рибофлавин (рибофлавин-моноклеотид), никотиновая кислота – 3-пиридинкарбоновая кислота) осуществлялась с использованием технологии газоразрядной визуализации [1]. Полученные данные обработаны статистически и представлены в таблицах в виде средних арифметических значений и их стандартных ошибок. Содержание изученных веществ приводится на грамм сухого веса. Достоверность различий между вариантами определяли с помощью t-критерия Стьюдента ($p \leq 0,05$), корреляцию – с помощью критерия Пирсона.

Анализировалось влияние различных концентраций CdCl_2 в почве на антиоксидантный статус растений и уровень некоторых антиоксидантов и фенольных соединений – каротиноидов, аскорбиновой кислоты, антоциановых пигментов. С увеличением концентрации Cd в почве наблюдалось накопление каротиноидов в исследуемых растениях: при концентрации CdCl_2 в почве 200 мг/кг (100 ОДК) их содержание превышало контрольный уровень в проростках ржи в 2,14 раза, листьях овсяницы красной – в 7 и листьях мятлика лугового – в 6,5 (табл. 1). Минимальная концентрация CdCl_2 в почве, стимулирующая накопление каротиноидов в исследуемых растениях, составила 10 ОДК.

17

Таблица 1

Влияние различных концентраций CdCl_2 в почве на накопление антиоксидантов в листьях растений

ОДК	Озимая рожь	Мятлик луговой	Овсяница красная
	<i>Содержание каротиноидов, мг/г</i>		
Фон	0,19 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,13 ± 0,02
1	0,21 ± 0,02	0,17 ± 0,02	0,21 ± 0,02
10	0,27 ± 0,02	0,39 ± 0,02	0,49 ± 0,03
25	0,37 ± 0,03	0,66 ± 0,02	0,79 ± 0,03
50	0,36 ± 0,02	0,68 ± 0,03	0,81 ± 0,03
100	0,41 ± 0,02	0,71 ± 0,02	0,89 ± 0,03
	<i>Содержание антоцианов, 10⁻³ %</i>		
Фон	232,1 ± 35,1	38,1 ± 3,1	49,2 ± 3,3
1	320,1 ± 45,2	43,4 ± 2,5	51,1 ± 2,9
10	602,1 ± 50,1	59,8 ± 3,2	69,7 ± 3,5
25	663,3 ± 51,2	73,1 ± 4,3	81,5 ± 4,9
50	697,6 ± 71,1	81,4 ± 5,2	95,4 ± 6,3
100	885,8 ± 80,6	102,7 ± 7,1	128,6 ± 8,3
	<i>Содержание аскорбиновой кислоты, мг %</i>		
Фон	180,1 ± 7,1	155,4 ± 7,9	153,1 ± 7,2
1	192,8 ± 8,5	162,1 ± 7,6	159,6 ± 8,3
10	201,6 ± 8,3	165,3 ± 8,5	175,6 ± 7,7



ОДК	Озимая рожь	Мятлик луговой	Овсяница красная
25	228,5 ± 8,9	194,3 ± 8,4	188,9 ± 9,1
50	224,3 ± 9,6	211,6 ± 8,2	201,7 ± 9,5
100	240,5 ± 9,1	221,3 ± 9,2	215,5 ± 9,9
Фон	Содержание водорастворимых антиоксидантов, мг/г		
	2,17 ± 0,11	0,53 ± 0,03	0,74 ± 0,03
1	2,08 ± 0,12	0,41 ± 0,03	0,48 ± 0,03
10	1,7 ± 0,09	0,35 ± 0,02	0,43 ± 0,03
25	1,27 ± 0,08	0,23 ± 0,03	0,34 ± 0,03
50	1,12 ± 0,09	0,19 ± 0,03	0,27 ± 0,02
100	0,94 ± 0,11	0,14 ± 0,02	0,21 ± 0,02

Выявлена стимуляция накопления антоциановых пигментов и аскорбиновой кислоты при увеличении содержания кадмия в почве. Высокие концентрации CdCl_2 в почве (100 ОДК) усиливали накопление антоциановых пигментов в проростках ржи в 3,8 раза, овсяницы красной – в 2,6, мятлика лугового – в 2,7. Уровень аскорбиновой кислоты повышался в проростках ржи в 1,35 раза, листьях овсяницы красной – в 1,4, листьях мятлика лугового – в 1,42 по сравнению с контролем (табл. 1). Минимальная концентрация CdCl_2 в почве, стимулирующая активацию биосинтеза антоцианов, – 10 ОДК, аскорбата – 25.

Оценка суммарной антиоксидантной активности растений в условиях высоких концентраций CdCl_2 показала, что содержание водорастворимых антиоксидантов снижалось с ростом концентрации CdCl_2 в почве: у растений ржи – в 2,3 раза, листьях овсяницы красной – в 3,5, листьях мятлика лугового – в 3,7 (100 ОДК) по сравнению с контрольным уровнем (табл. 1).

Исследовались фрактально-энтропийные характеристики ГРВ-грамм растений в условиях токсического действия кадмия. С увеличением в почве CdCl_2 наблюдалось повышение индекса энтропии ГРВ-грамм листьев исследуемых растений в среднем в 1,4–1,6 раза (100 ОДК) по сравнению с аналогичным показателем в контроле. Изменения параметра фрактальности ГРВ-грамм растений не имели достоверных различий по сравнению с фоном (табл. 2). Выявлена отрицательная корреляционная связь между содержанием водорастворимых антиоксидантов и показателем энтропии ГРВ-грамм (K_3) листьев ржи, мятлика и овсяницы ($r \approx -0,9$). Обнаружена высокая положительная корреляционная связь в растениях между K_3 и АК ($r \approx 0,72-0,95$), между K_3 и содержанием антоцианов ($r \approx 0,81-0,88$), между K_3 и каротиноидами ($r \approx 0,64-0,98$).

Исследования растворов антиоксидантов и витаминов с использованием технологии газоразрядной визуализации выявили наличие высокой положительной корреляции между показателем энтропии K_3 растворов биологически активных веществ и их концентрацией (табл. 3).



Изменение энтропии (K_s) и фрактальности (K_f) ГРВ-грамм листьев растений при действии на них различных концентраций $CdCl_2$ в почве

ОДК	Озимая рожь		Мяглик луговой		Овсяница красная	
	K_s	K_f	K_s	K_f	K_s	K_f
Фон	1,17 ± 0,09	1,74 ± 0,01	0,83 ± 0,07	1,77 ± 0,02	0,80 ± 0,05	1,75 ± 0,02
1	1,47 ± 0,05	1,69 ± 0,01	1,07 ± 0,03	1,78 ± 0,02	0,92 ± 0,08	1,73 ± 0,02
10	1,53 ± 0,05	1,72 ± 0,01	1,07 ± 0,09	1,71 ± 0,03	1,11 ± 0,04	1,75 ± 0,01
25	1,47 ± 0,05	1,69 ± 0,01	0,99 ± 0,05	1,77 ± 0,02	1,19 ± 0,05	1,71 ± 0,01
50	1,59 ± 0,05	1,71 ± 0,02	1,1 ± 0,03	1,77 ± 0,01	1,28 ± 0,05	1,72 ± 0,01
100	1,66 ± 0,05	1,70 ± 0,01	1,29 ± 0,05	1,71 ± 0,01	1,28 ± 0,03	1,71 ± 0,02

Таблица 3

Зависимость энтропии (K_s) ГРВ-грамм растворов антиоксидантов и витаминов от их концентрации (С)

С, %	АК	С, мг/л	Кверцетин	С, %	Никотиновая кислота	С, мг/л	Рибофлавин
5	1,88 ± 0,12	4	1,8 ± 0,02	1	1,23 ± 0,05	7,5	1,97 ± 0,02
2,5	1,57 ± 0,11	1	1,68 ± 0,02	0,5	1,22 ± 0,05	5	1,79 ± 0,01
1	1,29 ± 0,1	0,5	1,43 ± 0,02	0,1	1,02 ± 0,04	2,5	1,54 ± 0,01
0,5	0,94 ± 0,09	0,2	1,25 ± 0,02	0,01	1,01 ± 0,05	1	1,42 ± 0,01
БД	0,74 ± 0,01	БД	0,74 ± 0,01	БД	0,74 ± 0,01	БД	0,74 ± 0,01

Наблюдается высокая положительная корреляция между концентрацией рибофлавин-мононуклеотида и показателем энтропии ГРВ-грамм растворов B_2 ($r = 0,89$), кверцетина ($r = 0,72$), аскорбиновой кислоты ($r = 0,95$) и никотиновой кислоты ($r = 0,79$).

Между концентрацией витаминов и параметром фрактальности ГРВ-грамм выявлена слабая корреляционная связь: у АК $r = -0,25$, у никотиновой кислоты $r = 0,18$, у рибофлавина $r = 0,08$, у кверцетина $r = 0,21$ (табл. 4).

Таблица 4

Зависимость коэффициента фрактальности (K_f) ГРВ-грамм растворов антиоксидантов и витаминов от их концентрации (С)

С, %	АК	С, мг/л	Кверцетин	С, %	Никотиновая кислота	С, мг/л	Рибофлавин
5	1,38 ± 0,05	4	1,63 ± 0,02	1	1,51 ± 0,02	7,5	1,47 ± 0,02
2,5	1,31 ± 0,06	1	1,72 ± 0,03	0,5	1,59 ± 0,03	5	1,71 ± 0,02
1	1,44 ± 0,05	0,5	1,72 ± 0,02	0,1	1,37 ± 0,03	2,5	1,69 ± 0,02
0,5	1,49 ± 0,05	0,2	1,68 ± 0,05	0,01	1,69 ± 0,02	1	1,73 ± 0,01
БД	1,33 ± 0,02	БД	1,33 ± 0,02	БД	1,33 ± 0,02	БД	1,33 ± 0,02



Таким образом, высокие концентрации кадмия в почве стимулируют накопление антоцианов, каротиноидов, аскорбиновой кислоты ($r \approx 0,79-0,9$) и способствуют снижению суммарного содержания водорастворимых антиоксидантов в листьях озимой ржи, овсяницы красной и мятлика лугового ($r \approx -0,9$).

Было выявлено, что накопление антоцианов и аскорбиновой кислоты, обладающих различной функциональной внутриклеточной компартментацией, в исследуемых растениях, произрастающих в условиях загрязнения почвы кадмием, может повысить эффективность антиоксидантной системы в процессах нейтрализации продуктов окислительного стресса и способствовать повышению устойчивости растений к действию металла. Высокая положительная корреляционная зависимость между содержанием Cd в почве и накоплением антоцианов в вакуолях исследуемых растений ($r = 0,86-0,98$) позволяет отнести их биосинтез к неспецифическим механизмам адаптации растений к высоким концентрациям поллютанта, а их содержание использовать в качестве теста, характеризующего реакцию растений на уровень загрязнения территории ионами кадмия.

Наличие высокой положительной корреляционной связи между показателем энтропии растворов антиоксидантов, витаминов и их концентрацией (витамин B₂, $r = 0,89$; витамин C, $r = 0,95$; витамин P, $r = 0,72$; витамин B₃, $r = 0,79$) и между содержанием отдельных антиоксидантов (АК, каротиноиды, антоцианы) в исследуемых растениях и их К₃ позволяет использовать показатель энтропии ГРВ-грамм в качестве параметра, характеризующего антиоксидантный статус растений как в норме, так и при различных патологиях, а также при оценке степени воздействия различных факторов окружающей среды. С увеличением в почве CdCl₂ наблюдается повышение индекса энтропии ГРВ-грамм листьев исследуемых растений ($r \approx 0,72-0,82$). В условиях токсического действия кадмия показатель энтропии может служить информативной характеристикой состояния растительного организма, с помощью которой можно оценивать его физиологическое состояние и степень адаптации к токсическому действию ионов кадмия.

Список литературы

1. Коротков К. Г. Принципы анализа в ГРВ биоэлектрографии. СПб., 2007.
2. Муromцев Д. И. Практические основы метода газоразрядной визуализации (ГРВ). СПб., 2009.
3. Коротков К. Г. Основы ГРВ биоэлектрографии. СПб., 2001.
4. Шейн А. А., Хлебный Е. С., Кершенгольц Б. М. Газоразрядная визуализация – перспективы количественного и качественного определения веществ в жидкофазных растворах и смесях // *Фундаментальные исследования*. 2004. №7. С. 43–43.
5. Опритов В. А. Энтропия биосистем // *Соросовский образовательный журнал*. 1999. №6. С. 33–38.
6. Масленников П. В., Костерина Е. А. Использование ГРВ-метода при оценке состояния растений в условиях токсического действия кадмия // *Биология – наука XXI века: 14-я Пушкинская междунар. шк.-конф. молодых ученых* : сб. тез. Пушкино, 2010. С. 326.



7. ГН 2.1.7.2511-09. Ориентировочно-допустимые концентрации (ОДК) химических веществ в почве. URL: <http://base.consultant.ru/> (дата обращения: 01.05.2013).

8. Чупахина Г.Н., Масленников П.В. Методы анализа витаминов : практикум. Калининград, 2004.

9. Яшин А.Я., Яшин Я.И. Новый прибор для определения антиоксидантной активности пищевых продуктов, биологически активных добавок, растительных лекарственных экстрактов и напитков // Приборы и автоматизация. 2004. №11. С. 45 – 48.

Об авторах

Павел Владимирович Масленников — канд. биол. наук, доц., Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград.

E-mail: pashamaslennikov@mail.ru

Галина Николаевна Чупахина — д-р биол. наук, проф., Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград.

E-mail: tchoupakhina@mail.ru

Андрей Геннадьевич Краснопёров — д-р с.-х. наук, зам. директора по научной работе Калининградский НИИСХ Россельхозакадемии.

E-mail: akras_01@rambler.ru

About the authors

Dr Pavel Maslennikov, Ass. Prof., Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad.

E-mail: pashamaslennikov@mail.ru

Prof. Galina Chupakhina, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad.

E-mail: Choupakhina@mail.ru

Andrei Krasnoperov, Deputy Director for Research, Kaliningrad Research Institute for Agriculture, Russian Academy of Agricultural Sciences.

E-mail: akras_01@rambler.ru