

STRESUL OXIDATIV INDUS DE CĂTRE IONII DE CUPRU(II) ȘI FIER(II) ÎN FRUNZELE DE FLOAREA SOARELUI

**Carmen CIMPEANU,
Monica ENACHE,
Emilia MANOLE**

U.S.A.M.V. București
e-mail: carmencimpeanu@yahoo.com

"Oxidative stress induced by copper and iron ions in sunflower leaves".

Nowadays, numerous scientific data indicate that heavy metals act as catalysts in the oxidative deterioration of the biological macromolecules, which suggests that heavy metal-determined toxicity may result, at least partly, from the tissular oxidative stress. The copper ions are supposedly as efficient as the iron ions in catalysing the free-radical formation process (oxygen reactive species). The present study examines the hypothesis according to which the Cu(II) ions are more reactive than the Fe(II) ions in inducing the oxidative stress. It presents a comparative analysis of the heavy metal ion effects upon the content in chlorophyll, malondialdehyde (MDA), and glutathione (GSH) present in sunflower leaf fragments. Due to the toxic action of the metal ions, peroxidase activity in the cell increases about 2.5 times in Fe(II) ions, and 3.5 times in Cu(II), compared with the control. Glutathione concentration decreases by 40% in Fe(II) ions, and 50% in Cu(II) ions, compared with the control. Also, the content in chlorophyll decreases by 30% in Fe(II), and 40% in Cu(II). These results prove the oxidative stress produced in cells by the metal ions. The present study also tests the antioxidative efficiency of such free-radical consuming molecules as sodium benzoate and mannitol. Among the antioxidants tested, mannitol was observed to prevent the increase in lipid peroxidation more efficiently, being thus a better antioxidant than sodium benzoate.

Keywords: heavy metals, oxidative stress, reactive oxygen species, antioxidants, *Helianthus annuus*.

Metalele grele sunt elemente naturale, răspândite în diverse compartimente ale ecosistemului terestru. Cu toate că unele metale grele sunt micronutrienți esențiali, în cantități crescute ele pot fi toxice pentru majoritatea plantelor. De exemplu, fierul și cuprul sunt elemente esențiale pentru multe procese celulare, dar în concentrații toxice, ionii lor acționează ca generatori de radicali liberi (Neumann et al., 2003). Exista studii care arată că excesul de fier induce stres oxidativ în plante de *Nicotiana plumbaginifolia* (Lupu et al., 1980), iar formarea de radicali liberi mediată de cupru a fost demonstrată în cloroplaste izolate, în rădăcini intacte de *Silene cucubalus*, în segmente de frunză și în frunze întregi de tutun (Piqueras,

1999) sau în frunzele de *Helianthus annuus* (Galego et al., 1996). Pe de altă parte, s-a stabilit ca ionii de Cu(II) cresc activitatea unor enzime antioxidative, cum ar fi: superoxid dismutaza, peroxidaza și glutatión peroxidaza (Norvell, 1993).

Toate organismele aerobe au capacitatea de a se apăra de efectele toxice ale speciilor reactive de oxigen. La plante există câteva molecule cu proprietăți antioxidante (glutatióul, acidul ascorbic, alfa-tocoferolul și carotenoizii) precum și enzime care protejează împotriva deteriorărilor oxidative. Astfel, sub acțiunea superoxid-dismutazei, radicalii O^{2-} sunt convertiți la H_2O_2 , care e descompusă sub acțiunea catalazei, a ascorbat-peroxidazei sau a altor tipuri de peroxidaze. În ciclul ascorbat-glutatióului, acțiunea enzimatică a ascorbat-peroxidazei reduce H_2O_2 folosind ascorbatul ca donator de electroni. Ascorbatul oxidat este apoi redus prin reacții catalizate de monodehidroascorbat-reductaza, dehidroascorbat-reductaza și glutatió-reductaza. Glutatió-reductaza joacă de asemenea un rol esențial în protecția cloroplastelor împotriva perturbărilor produse de stresul oxidativ. Lipoxigenaza este implicată în creșterea și dezvoltarea plantei, în biosinteza moleculelor reglatoare, în răni și infecții patogene și în îmbătrânire. Substratul este reprezentat de acizii grași polinesaturați prezenți în membranele lipidice, ceea ce duce la pierderea integrității membranare. În plus nivelul aldehydei malonice este un parametru esențial în determinarea perturbărilor membranare.

În prezent, numeroase date științifice sugerează că metalele grele acționează pe post de catalizatori în deteriorările oxidative ale macromoleculelor biologice, ceea ce sugerează că toxicitatea datorată acestor metale poate fi rezultatul, cel puțin parțial, al stresului oxidativ tisular. Se presupune ca ionii de cupru sunt cel puțin la fel de eficienți ca cei de fier, în catalizarea proceselor formative de specii de oxigen reactive. Anterior, studii in vitro la floarea-soarelui cv. Sunspot (culturi de calus) au arătat o toxicitate crescută a ionilor de cupru lucru observat și în alte cercetări la floarea-soarelui, atât in vitro cât și in vivo (Enache, 1999). Studiul de față investighează ipoteza potrivit căreia ionii de Cu(II) sunt mai reactivi decât cei de Fe(II) în inducerea stresului oxidativ. Sunt analizate comparativ efectele ionilor acestor metale asupra conținutului de clorofilă, de malondialdehidă și asupra conținutului de glutatió. De asemenea, prin prezentul studiu se testează eficiența antioxidantă a unor molecule consumatoare de radicali liberi (așa cum sunt benzoatul de sodiu și manitolul).

MATERIAL ȘI METODĂ

Materialul vegetal și condițiile de creștere

Semințele de floarea soarelui (*Helianthus annuus* L., procurate de la ICCPT-Fundulea) au fost germinate și crescute pe perlit-vermiculit în laborator, în condiții controlate ($24 \pm 2^\circ\text{C}$, 6 ore lumină - 8 ore întuneric, intensitatea luminoasă 3000 lx). Plantele au fost udate cu soluție nutritivă Hoagland. Pentru experiențe s-au folosit fragmente recoltate din a doua pereche de frunze adevărate. Discurile de frunze (12 mm) au fost așezate pe plăci Petri și au fost imersate în câte 20 ml soluție de $FeSO_4$, și respectiv $CuCl_2$, fiecare soluție având o concentrație de 0,5 mM de ion metalic corespunzător (Fe^{2+} și Cu^{2+}). Discurile de frunze s-au menținut imersate în soluțiile metalice timp de 12 ore, la lumină. Din fragmentele de frunze supuse astfel

tratamentului cu ioni de metale grele s-au efectuat extracții și s-au determinat efectele nocive induse de ionii metalici.

Experiențele s-au repetat de alte două ori, adăugând în fiecare din soluțiile metalice benzoat de sodiu (10 mM) și respectiv manitol (10 mM).

pH-ul acestor soluții a fost ajustat la 6 cu NaOH. Experiențele au fost repetate de 2 ori și câte cinci replicate de fragmente foliare au fost supuse fiecărui tratament în parte. Fragmentele de frunze care au fost folosite drept martor au fost imersate în apă demineralizată. După 12 ore de tratament fragmentele foliare s-au spălat cu apă distilată și s-au supus extracției pentru realizarea diferitelor determinări.

Determinarea conținutului de clorofilă

Pentru extracția clorofilei fragmentele de frunze proaspete în greutate de 0,3 g sau omogenizat în 35 ml de alcool etilic 80%. Omogenatul s-a supus centrifugării timp de 10 min. la 5000 rpm, după care conținutul de clorofilă s-a determinat în supernatantul obținut. Determinarea conținutului de clorofilă s-a realizat prin analiză spectrofotometrică la 654 nm.

Determinarea concentrației malondialdehidei

Concentrația de malondialdehidă (MDA) reprezintă un parametru esențial pentru aprecierea integrității membranelor celulare.

Peroxidarea lipidelor s-a măsurat indirect prin determinarea MDA. Fragmentele foliare (0,3 g) s-au omogenizat în 2 ml acid tricloracetic (0,1%). Omogenatul s-a supus centrifugării la 10.000 x g timp de 20 min. S-a măsurat 1ml din supernatantul rezultat, iar peste acesta s-a adăugat 1ml acid tricloracetic (20%), care conținea 0,5% acid tiobarbituric și de asemenea s-au adăugat 100 μ l hidroxitoluen butilat (4% în etanol). Amestecul s-a încălzit la 95⁰ C timp de 30 min., după care s-a răcit brusc în gheață. Amestecul s-a supus din nou centrifugării la 10.000 x g timp de 15 min., după care s-a măsurat absorbanta la 532 nm. Concentrația MDA s-a calculat folosind un coeficient de extincție (155mM per cm).

Determinarea conținutului de glutatation

Conținutul de glutatation total (GSH plus GSSG) s-a determinat în omogenatul de fragmente foliare spectrofotometric la 340 nm, după precipitarea cu HCl 0,1 N, folosind glutatation – reductaza de drojdie, acid ditio-bis-2-nitrobenzoic (DTNB) și NADPH. Conținutul de GSSG s-a determinat prin aceeași metodă în prezență de 2-vinilpiridina, iar conținutul de GSH s-a calculat prin diferența dintre glutatationul total și GSSG.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Efectul ionilor de metale grele asupra clorofilei, malondialdehidei (MDA) și glutatationului (GSH)

În fragmentele de frunze tratate cu ioni de Fe²⁺ și Cu²⁺ și ținute la lumină timp de 12 ore s-a constatat o diminuare semnificativă a conținutului de clorofilă (30% pentru Fe²⁺ și respectiv 40% pentru Cu²⁺) față de conținutul de clorofilă din martor (figura 1). Peroxidarea lipidelor măsurată prin conținutul de MDA a manifestat o creștere importantă față de martor pentru ambii ioni metalici testați. Astfel, s-a constatat o creștere a activității peroxidatice de 2,5 ori în cazul ionilor de Fe²⁺ și 3,5 ori în cazul ionilor de Cu²⁺, comparativ cu valorile martorului (figura 3).

Glutatationul (GSH) reprezintă unul din compuși antioxidanți principali care apar în plantă. De aceea, este de așteptat ca ionii metalici folosiți în acest experiment să inducă formarea oxidanților (măsurați indirect prin concentrația de MDA) și prin urmare aceștia să influențeze negativ nivelul glutatationului. În urma

experimentelor realizate s-a constatat, într-adevăr, că în celule a crescut activitatea oxidativă (măsurată prin concentrația crescută de MDA) și a scăzut în mod semnificativ concentrația GSH-ului (cu 40% în cazul ionilor de Fe^{2+} și cu 50% în cazul ionilor de Cu^{2+}), comparativ cu martorul. Aceste rezultate demonstrează faptul că ionii metalici în exces produc stresul oxidativ la nivel celular.

Efectul benzoatului de sodiu și al manitolului asupra radicalilor liberi

La adăugarea unor antioxidanți, așa cum sunt benzoatul de sodiu și manitolul, în soluțiile cu ioni de metale grele (Fe^{2+} și Cu^{2+}) s-a constatat că aceștia previn – parțial- descreșterea conținutului de clorofilă (figura 1) și respectiv de GSH (figura 2). De asemenea, adăugarea de antioxidanți previne parțial creșterea peroxidării lipidice (figura 3). Dintre cei doi antioxidanți folosiți, s-a constatat că manitolul are o activitate antioxidantă mult mai eficientă decât are benzoatul de sodiu.

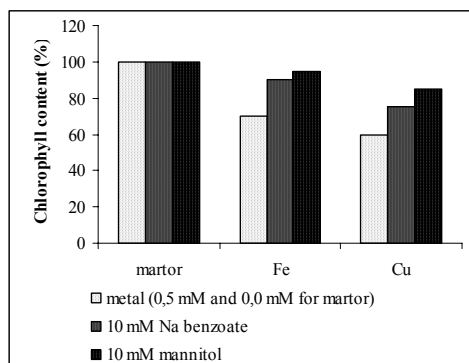


Figura 1. Efectele ionilor de metal și ale radicalilor liberi asupra conținutului de clorofilă din frunzele de floarea soarelui. Datele reprezintă fiecare valoarea medie $\pm$ abaterea standard (n = 5 replicate foliare)

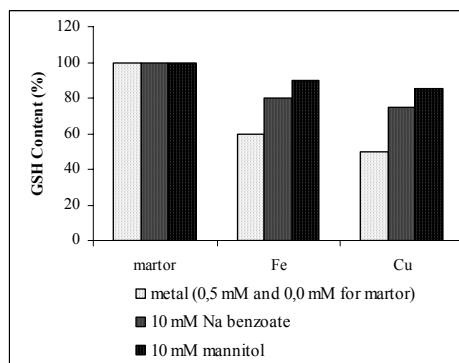


Figura 2. Efectele ionilor de metal și ale radicalilor liberi asupra conținutului de glutatoin din frunzele de floarea soarelui. Datele reprezintă fiecare valoarea medie $\pm$ abaterea standard (n = 5 replicate foliare)

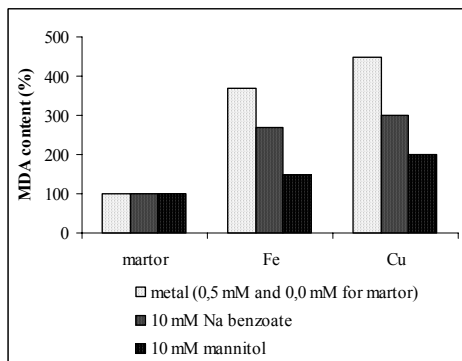


Figura 3. Efectele ionilor de metal și ale radicalilor liberi asupra conținutului de malondialdehidă din frunzele de floarea soarelui. Datele reprezintă fiecare valoarea medie $\pm$ abaterea standard (n = 5 replicate foliare)

CONCLUZII

Ionii metalelor grele, așa cum sunt Fe(II) și Cu(II) acționează pe post de catalizatori în deteriorările oxidative ale macromoleculelor biologice;

Ionii de Cu(II) sunt mai reactivi decât cei de Fe(II) în inducerea stresului oxidativ tisular (în frunzele de floarea soarelui);

În fragmentele de frunze tratate cu ioni de Fe(II) și de Cu(II) s-a constatat o diminuare semnificativă a conținutului de clorofilă, 30% pentru Fe(II) și respectiv 40% pentru Cu(II) față de conținutul de clorofilă din martor;

Activitatea peroxidazică a crescut de aproximativ 2,5 ori în cazul ionilor de Fe(II) și de 3,5 ori în cazul ionilor de Cu(II), comparativ cu valorile martorului;

Sub influența negativă a ionilor de metale grele, în celule a crescut activitatea oxidativă (măsurată prin concentrația crescută de MDA) și a scăzut în mod semnificativ concentrația glutatoniului (cu 40% în cazul ionilor de Fe(II) și cu 50% în cazul ionilor de Cu(II)), comparativ cu martorul.

Aceste rezultate demonstrează faptul că ionii metalici în exces produc stresul oxidativ la nivel celular;

Dintre antioxidanții testați (benzoatul de sodiu și manitolul) s-a constatat că manitolul previne mai eficient creșterea peroxidării lipidice, fiind un antioxidant mai bun decât este benzoatul de sodiu.

BIBLIOGRAFIE

1. Anderson, M.E., 1985 - *Determination of glutathione and glutathion disulfide in biological samples. Method Enzimol.*, 113, 548-545.
2. Gallego SM, Benavides MP, Tomaro ML. 1996. *Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress.* Plant Science 121, 151–159.
3. Gupta M, Cuypers A, Vangronsveld J, Clijsters H. 1999. *Copper affects the enzymes of the ascorbate–glutathione cycle and its related metabolites in the roots of Phaseolus vulgaris.* Physiologia Plantarum 106, 262–267.
4. Herbic, A., et al, 1996 – *Iron and copper nutrition-dependent changes in protein expression in a tomato wild type and nicotianamine-free mutant chloronerva.* Plant Physiol., 111, 533-540.
5. Lupu, R., Cohen, I., 1980. *The involvement of lipoxygenase and antioxidants in pathogenesis of powdery mildew on tobacco plants.* Physiol. Plant Pathol., 16, 241-248.
6. Meharg, A.A., 1993. *The role of plasmalemma in metal tolerance in angiosperms.* Plant. Physiol., 88, 191-198.
7. Neumann D., Clemens St., 2003. *Metal Homeostasis. Research Report*, Inst. of Plant Biochemistry, Leibniz.
8. Piqueras A, Olmos E, Martinez-Solano JR, Hellin E. 1999. *Cd-induced oxidative burst in tobacco BY2 cells: time-course, subcellular location and antioxidant response.* Free Radical Research 31, 33–38.
9. Polle A, Rennenberg H. 1993. *Significance of antioxidants in plant adaptation to environmental stress.* In: Mansfield T, Fowden L, Stoddard F, eds. *Plant adaptation to environmental stress.* London: Chapman & Hall, 263–273.
10. Polle A. 2001. *Dissecting the superoxide dismutase–ascorbate–glutathione pathway by metabolic modeling: computer analysis as a step towards flux analysis.* Plant Physiology 126, 445–462.

11. Shainberg O, Rubin B, Rabinowitch HD, Libal Y, Tel OE. 2000. *Acclimation of beans to oxidative stress by treatment with sublethal iron levels*. Journal of Plant Physiology 157, 93–99.
12. Teisseire H, Guy V. 2000. *Copper-induced change in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (Lemna minor)*. Plant Science 153, 65–72.
13. Vranová E, Inzé D, Van Breusegem F. 2002. *Signal transduction during oxidative stress*. Journal of Experimental Botany 53, 1227–1236.
14. Williams LE, Pittman JK, Hall JL. 2000. *Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants*. Biochimica et Biophysica Acta 1465, 104–126.