

АНАЛИЗ ДЕЙСТВИЯ ПОЛИХЛОРИРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ НА АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ (СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗА, КАТАЛАЗА, ПЕРОКСИДАЗА) ПОДСОЛНЕЧНИКА ОДНОЛЕТНЕГО (*HELIANTHUS ANNUUS*) В МОДЕЛЬНОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ

ANALYSIS OF THE EFFECT OF POLYCHLORINATED BIPHENYLS ON THE ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES (SUPEROXIDE DISMUTASE, CATALASE, PEROXIDASE) OF ANNUAL SUNFLOWER (*HELIANTHUS ANNUUS*) IN A MODEL EXPERIMENT

**T. Osinkina
G. Solovykh
G. Kolchugina
E. Kanunikova
G. Tikhomirova**

Summary. The article presents the results of an experimental study of the effect of PCBs on the biochemical parameters of antioxidant protection of annual sunflower (*Heliánthus ánnuus*) in a model experiment. For the level of SOD and catalase, a sharp increase in activity was recorded at all stages of development under the influence of the minimum concentration of PCBs (0.0005 mg / l), for SOD by 2.7 times (seedlings), during the flowering period by 3 times. In the case of catalase, the activity at a PCB concentration of 0.0005 mg/l during the flowering period exceeded the control value by 14 times and by 3.95 times at a PCB concentration of 0.0012 mg/g. The activity of peroxidase in response to the primary impact of PCBs changed insignificantly. Thus, for the enzymes superoxide dismutase and catalase of annual sunflower (*Heliánthus ánnuus*), the phenomenon of a «paradoxical dose-effect relationship» was established when exposed to PCBs at a minimum concentration (0.0005 mg/l) at the MAC level.

Keywords: biochemical parameters, model experiment, polychlorinated biphenyls, annual sunflower, superoxide dismutase, catalase, peroxidase, enzyme isoforms.

Осинкина Татьяна Владимировна

кандидат биологических наук, доцент, федеральное
государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Оренбургский
государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
osinkina12@mail.ru

Соловых Галина Николаевна

доктор биологических наук, профессор, федеральное
государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Оренбургский
государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
k_biology@orgma.ru

Кольчугина Гюзель Фарыховна

кандидат биологических наук, доцент, федеральное
государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Оренбургский
государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
k_biology@orgma.ru

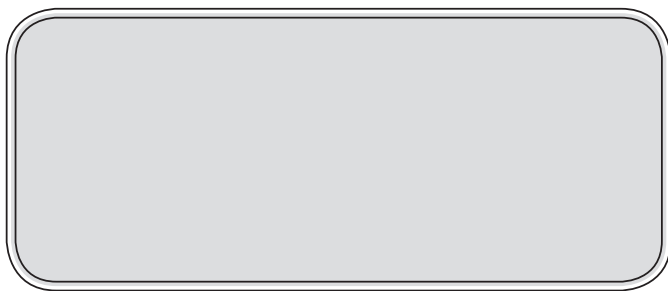
Кануникова Елена Александровна

кандидат медицинских наук, доцент, федеральное
государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Оренбургский
государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
k_biology@orgma.ru

Тихомирова Галина Михайловна

кандидат биологических наук, доцент, федеральное
государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Оренбургский
государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
k_biology@orgma.ru

Аннотация. Представлены результаты экспериментального исследования влияния ПХБ на биохимические показатели антиоксидантной защиты подсолнечника однолетнего (*Heliánthus ánnuus*) в модельном эксперименте. Для уровня СОД и каталазы фиксировался резкий рост активности на всех стадиях развития при действии минимальной концентрации ПХБ (0,0005 мг/л), для СОД в 2,7 раза (проростки), в период цветения в 3 раза. В случае каталазы активность при концентрации ПХБ (0,0005 мг/л) в период цветения превысила значение контроля в 14 раз и в 3,95 раз при концентрации ПХБ 0,0012 мг/г. Активность пероксидазы в ответ на первичное



Введение

В настоящее время, учитывая высокий уровень развития технологических процессов, в том числе особенно в сфере химической промышленности, а также областей, сопряженных с возможными залповыми выбросами фракций потенциальных загрязнителей природных биотопов, следует заострять внимание на наиболее динамичных компонентах природной среды. При проведении исследований, касаемых влияния токсикантов, одним из основных объектов анализа выступает почва. В этом слое реализуется накопление поллютантов и выстраивается путь их передачи по трофической цепи с вовлечением растений, приводящий прямо или опосредованно (через животных) в организм человека [1, С. 44–45].

В доступной литературе есть описание вероятного механизма губительного воздействия полихлорированных бифенилов (ПХБ). Он основан на выраженной индукции монооксигеназной системы, содержащей цитохром P450. Данная система отвечает за окислительную деструкцию ксенобиотиков, имеющих гидрофобную природу [2, С. 69]. Известно, что под действием ПХБ в организме начинаются реакции свободнорадикального окисления. С течением времени наблюдается снижение общей антиоксидантной защиты по причине выраженного угнетения уровня активности супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, глутатионтрансферазы, γ -глутамилтрансферазы и заметного падения потенциала неферментативного звена антиоксидантных компонентов в виде уменьшения тканевого содержания восстановленного глутатиона, аскорбата, α -токоферола и свободных сульфгидрильных групп [3, С. 435].

Достаточно высокое содержание полихлорированных бифенилов в почвенном слое продолжительное время (период полураспада составляет около 5–8 лет) зачастую определяет повышенное содержание данных соединений в грунтовых водах, воздухе атмосферном и, часто, жилых помещениях [4, С. 70]. В связи с выше сказанным, анализ влияния ПХБ в модельном эксперименте на биохимические показатели растений разных возрастов представляется актуальным. В свете специфического

воздействие ПХБ менялась незначительно. Таким образом, для ферментов супероксиддисмутазы и каталазы подсолнечника однолетнего (*Helianthus annuus*) установлено явление «парадоксальной зависимости «доза–эффект»» при воздействии ПХБ в минимальной концентрации (0,0005 мг/л) на уровне ПДК.

Ключевые слова: биохимические показатели, модельный эксперимент, полихлорированные бифенилы, подсолнечник однолетний, супероксиддисмутазы, каталаза, пероксидаза, изоформы ферментов.

метаболизма растений, характеризующимся достаточно быстрой ответной реакцией на ксенобиотики, прикрепленного образа жизни и роли в биоценозах.

Материалы и методы

Материалом исследования выступили 2–5-ти дневные проростки подсолнечника однолетнего (*Helianthus annuus*), неповрежденные механически листовые пластинки во время вегетации, цветки и молодые семена растения. Выращивались в контейнерах с почвой, предназначенной для цветочных культур и рассады в течение 1,5 месяцев. В течение этого времени с периодичностью (проростки, вегетация и цветение) растения подвергались воздействию раствора «Совтол» (смесь полихлорированных бифенилов: три-, тетра-, пентахлоридов) в концентрациях 0,0005 мг/л, 0,001 мг/л, 0,0012 мг/л — полив производили однократно — от излишков раствора поддон растений освобождался сразу после полива. Контрольные образцы растений поливали отстоянной водопроводной водой без добавления удобрений и стимуляторов роста [5, С. 159].

Активность супероксиддисмутазы определяли методом, основанном на способности СОД ингибировать аутоокисление адреналина в адренохром в щелочной среде (карбонатный буферный раствор pH=10,2). Процент ингибирования вычисляли по формуле:

$$A(\%) = \frac{(E_k - E_o) \times 100}{E_k} \quad (1)$$

Где А — активность фермента, %;

E_k — экстинкция контроля;

E_o — экстинкция опыта [6, С. 5].

Активность каталазы определяли стандартным методом перманганатометрии. Активность фермента рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{(K - O) \times 0,85 \times E}{T} \quad (2)$$

K — количество $KMnO_4$, пошедшего на титрование в контроле, мл;

O — количество $KMnO_4$, пошедшего на титрование в опыте, мл;

0,85 — количество мл H_2O_2 , соответствующее 1 мл 0,05н $KMnO_4$;

T — время инкубации (10 мин);

E — разведение [7, С. 72].

Фотоэлектроколориметрический метод определения активности фермента пероксидазы основан на изменении времени, за которое опытный раствор достигнет определенной оптической плотности. В качестве субстрата использовался бензидин, в результате окисления которого образовывались продукты реакции синего цвета.

Навеску растительного материала (70–150 мг) растирали в ступке с водой, переносили в мерную колбу на 50 мл и доводили дистиллированной водой до метки. Растительную вытяжку настаивали в течение 5–15 мин, затем центрифугировали в течение 10–15 мин при 3000 об./мин. Надосадочную жидкость использовали для определения активности пероксидазы. Для определения активности фермента брали две кюветы толщиной 1 см. По контрольной кювете устанавливали ноль прибора, предварительно заполнив ее 1,5 мл бензидина (1%- раствор), 1,5 мл фильтрата и 1,5 мл воды. Во вторую опытную кювету вливали 1,5 мл бензидина, 1,5 мл фильтрата и 1,5 мл 0,3 %-ного раствора пероксида водорода, при этом сильная струя пероксида перемешивала содержимое кюветы. Добавление пероксида служило началом реакции. Одновременно с вливанием пероксида водорода включали секундомер. В опытной кювете раствор синел, стрелка прибора передвигалась справа налево. Отмечали время, за которое стрелка достигнет 0,2 делений прибора (единицы оптической плотности). Активность пероксидазы рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{D \times E}{t \times d} \quad (3)$$

D — оптическая плотность (0,1–0,2);

E — разведение (пересчет на 1 г сырой массы);

t — время, с;

d — толщина слоя жидкости, толщина кюветы (1 см) [8, С. 69].

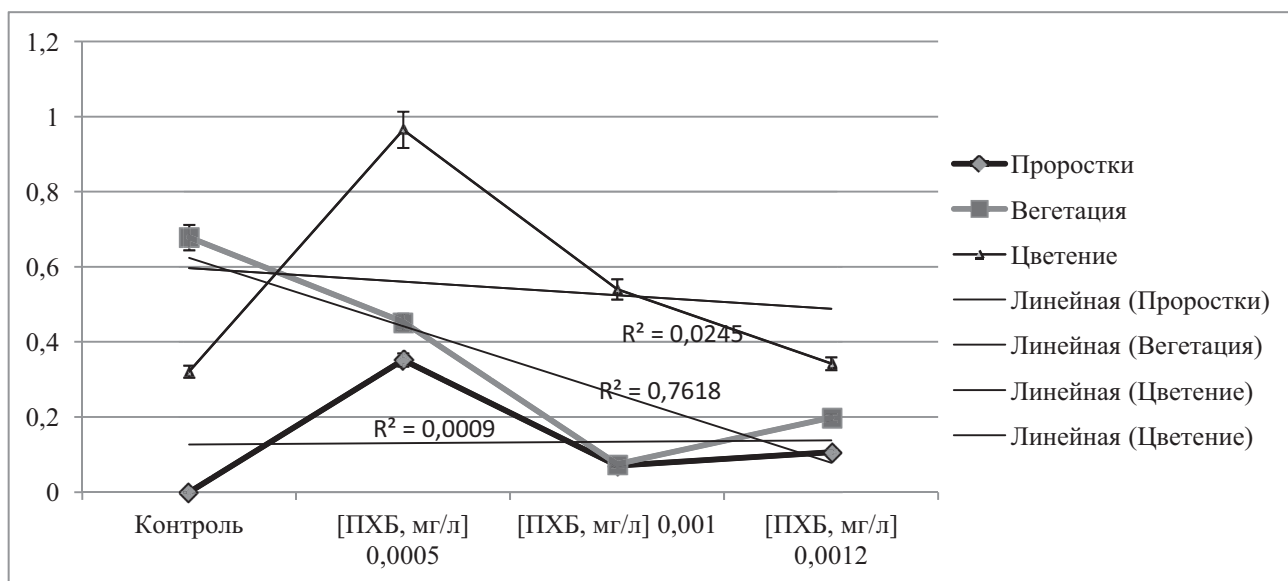
Определение активности ферментов производилось в трех повторностях на каждом этапе анализа — стадии «проростков», «вегетации», «цветения».

Статистическую обработку результатов эксперимента проводили с использованием пакета MS Excel 2010 «Анализ данных» (Microsoft, USA).

Основные результаты

В ходе модельного эксперимента показано, что в периоде активного вегетативного роста подсолнечника однолетнего (*Helianthus annuus*) начиная от стадии проростков до стадии вегетации — фиксировался рост активности супероксиддисмутазы (СОД) (см. рисунок 1). В среднем в 2,7 раза, при первичном воздействии даже минимальных концентраций полихлорированных бифенилов (ПХБ) со значением 0,0005 мг/л.

В период цветения при данной концентрации ПХБ активность СОД увеличилась в 3 раза в сравнении с контролем. Максимальная концентрация воздействия ПХБ (0,0012 мг/л) приводила к падению активности СОД в фазе цветения в 1,58 раза. Супероксиддисмутаза — металлсодержащий фермент в активном центре которого находится медь (Cu^{2+}). В связи с тем, что ПХБ чаще всего представляют собой смесь веществ (реактив «Совтол»)



Источник: составлено автором на основании [результаты эксперимента https://docs.google.com/spreadsheets/d/1YqPGTBW3kDR_Rnbh0xSgA06ngQupugXv/edit?usp=drive_link&oid=112134356927575780838&rtpof=true&sd=true]

Рис. 1. Активность супероксиддисмутазы (ед. А, %) подсолнечника однолетнего (*Helianthus annuus*)

состоящих из соединенных между собой нескольких, обычно 2–3 бензольных колец, каждое из которых содержит по 4–5 хлорид-ионов, логично предположить факт соединения свободных валентностей меди в активном центре СОД с хлорид-анионами [9, С. 68]. С уменьшением возможности утилизации супероксидного анион-радикала, уровень которого возрастает в растении именно при подготовке его к цветению и в ходе цветения, в связи с блокировкой активного центра фермента ПХБ — в некоторой степени снижается его активность. При этом на стадиях проростков и вегетации значительных изменений показателя при действии данной концентрации ПХБ не происходило.

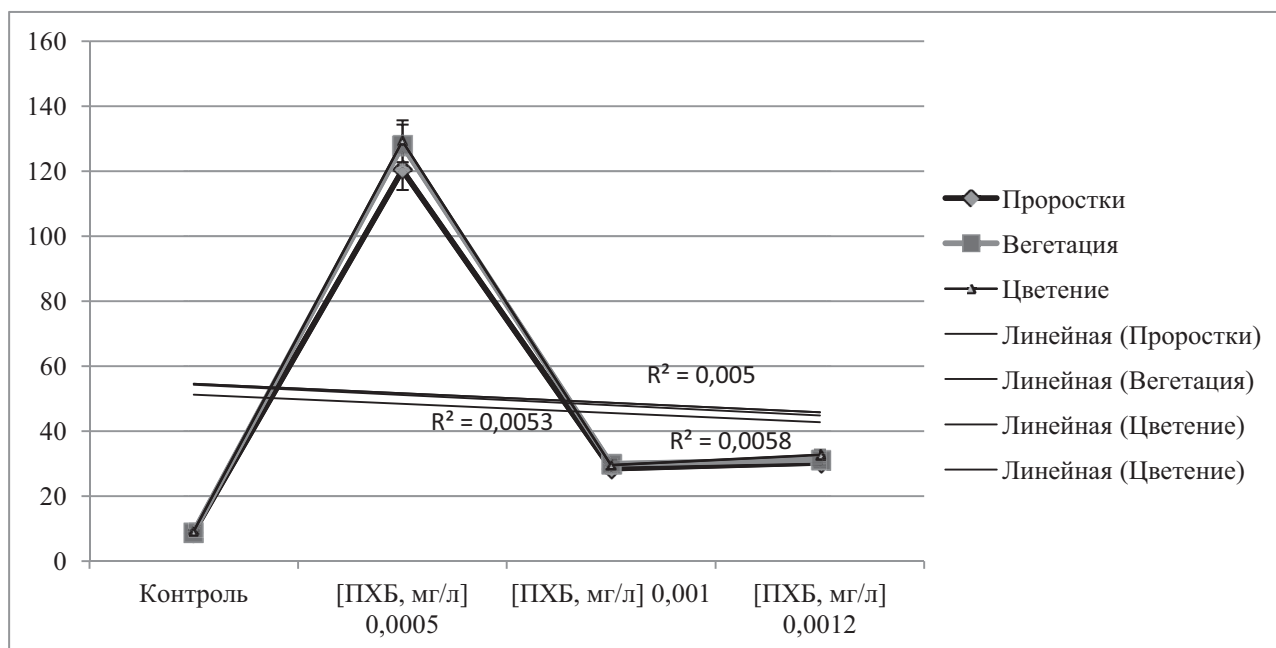
Анализ линий тренда для «проростков», «вегетации» и «цветения» показал, что на стадии «проростки» линия тренда для активности СОД не является надежным критерием оценки изменения показателя и характеризуется незначительной динамикой снижения активности фермента: величина достоверности аппроксимации сильно отлична от 1 (0,0009), поскольку в целом значения лежат в пределах 0,07–0,352 %. Для стадии вегетации линия тренда является надежной, так как величина её достоверности аппроксимации лежит близко к 1 (0,7618) в этом случае значения показателя СОД имеют тенденцию к росту. Рост активности СОД в периоде цветения подтверждается и характером линии тренда, что согласуется с общей тенденцией роста, поскольку хотя график имеет наклон, свидетельствующий о снижении средних значений показателя в данном случае это не является достоверным, так как величина аппроксимации значительно меньше 1 (0,0245).

Активность каталазы также возрастала от стадии проростков и в период цветения превысила фазу прорастающих семян в 1,2 раза (см. рисунок 2).

Следует отметить, что при воздействии концентрации ПХБ (0,0005 мг/л) в период цветения показатель превысил значение контроля в 14 раз и в 3,95 раза возросла активность каталазы при воздействии концентрации ПХБ (0,0012 мг/л). Согласно рисунку 2 динамика активности каталазы имела сходный характер изменения во все три периода определения — «проростки», «вегетация», «цветение» об этом свидетельствуют и линии тренда, имеющие тенденцию снижения активности фермента.

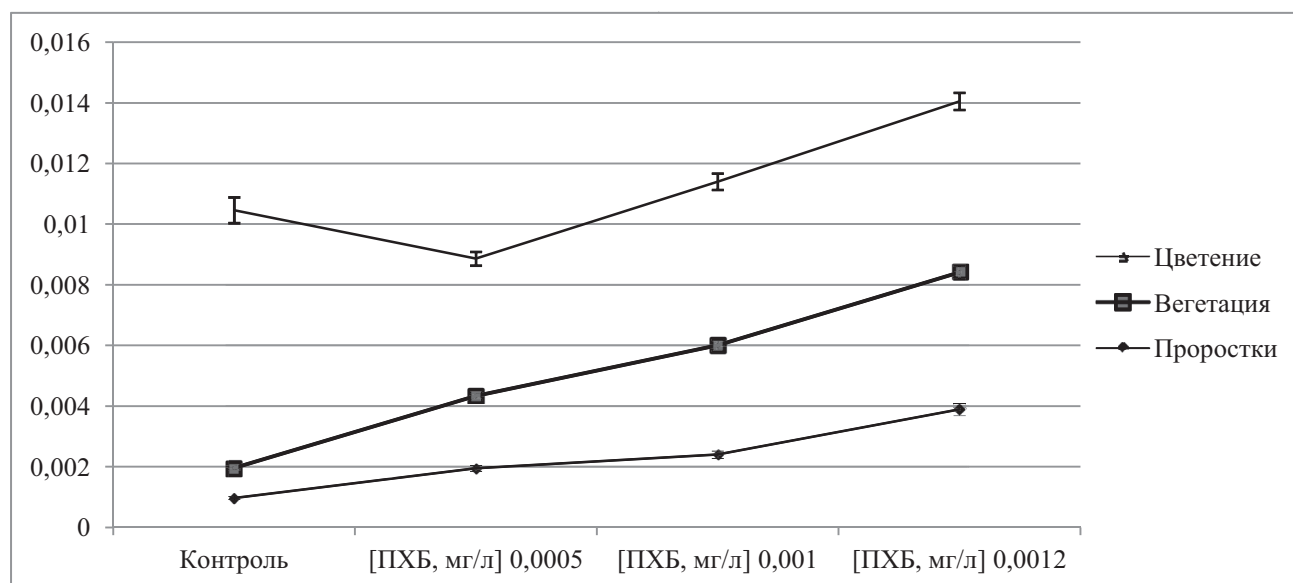
В случае каталазы, как и при рассмотрении СОД, отмечена сходная ответная реакция растительных ферментов на воздействие ПХБ: при первичном попадании токсикантов в клетки растений в модельной системе — активность СОД и каталазы резко возрастала, а затем снижалась при росте концентрации ПХБ в связи с воздействием поллютантов на активные центры металл-содержащих ферментов. В случае каталазы нарушению подвергается и апофермент — поскольку при действии ПХБ возможно разрушение целостной структуры фермента, распадающегося на неактивные субъединицы. Глобулы фермента, находясь в неассоциированном состоянии, при росте их количества в среде сами дополнительно снижают активность неизменной каталазы.

Резкое возрастание показателя при условии первичного попадания концентрации ксенобиотика нехарактерного для данного организма является проявлени-



Источник: составлено автором на основании [результаты эксперимента https://docs.google.com/spreadsheets/d/1YqPGTbW3kDR_Rnbh0xSgA06ngQupugXv/edit?usp=drive_link&oid=112134356927575780838&rtpof=true&sd=true]

Рис. 2. Активность каталазы (мл O₂ / г·мин) подсолнечника однолетнего (*Helianthus annuus*)



Источник: составлено автором на основании [результаты эксперимента https://docs.google.com/spreadsheets/d/1YqPGTbW3kDR_Rnbh0xSgA06ngQupugXv/edit?usp=drive_link&ouid=1121343569275780838&rtf=true&sd=true]

Рис. 3. Активность пероксидазы ($\Delta D_{670}/\text{гхс}$) подсолнечника однолетнего (*Helianthus annuus*)

ем «парадоксальной зависимости «доза-эффект»» [10, С. 73], явление которое в целом иллюстрирует характер реакции «протеста» организма в ответ на токсикант при первой встрече защитных механизмов (в данном случае антиоксидантных ферментов) с ним.

В отличие от реакций СОД и каталазы на первичное воздействие ПХБ активность пероксидазы при данных концентрациях не возрастала (см. рисунок 3), а достигала максимума только при наибольшей концентрации ПХБ (0,0012 мг/л) на стадии вегетации в 4,56 раза.

При цветении активность фермента снизилась в 1,5 раза, что может свидетельствовать о присутствии в подсолнечнике однолетнем одной из изоформ пероксидазы [11, С. 37], [12, С. 125], [13, С. 189] активность которой возрастает именно в период цветения и является наиболее эффективной для утилизации пероксида водорода и перекисных продуктов, концентрация которых закономерно возрастает в период цветения на фоне усиления скорости обменных процессов, направленных на синтез фитогормонов и сигнальных молекул, стимулирующих развитие генеративных тканей растений. Однако подобная форма пероксидазы, по-видимому, более чувствительна к действию повышенного содержания токсикантов экзогенной природы, в частности ПХБ, чем и объясняется некоторое снижение её активности.

Таким образом, оценивание воздействия полихлорированных бифенилов на развитие подсолнечника однолетнего (*Helianthus annuus*) в модельном эксперименте, позволяет сформулировать следующие основные выводы:

- 1) Зафиксирована неодинаковая реакция антиоксидантных ферментов — супероксиддисмутазы, каталазы и пероксидазы подсолнечника однолетнего (*Helianthus annuus*) на минимальные концентрации полихлорированных бифенилов на уровне ПДК для вод водно-питьевого и культурно-бытового водопользования;
- 2) Для ферментов супероксиддисмутазы и каталазы подсолнечника однолетнего (*Helianthus annuus*) установлено явление «парадоксальной зависимости «доза-эффект»» при воздействии ПХБ в минимальной концентрации (0,0005 мг/л) на уровне ПДК;
- 3) Характер изменения активности пероксидазы при минимальном (стимулирующем) и максимальном (ингибирующем) воздействии ПХБ в короткий период времени, позволил предположить вероятное существование у подсолнечника однолетнего (*Helianthus annuus*) изоформы пероксидазы, устойчивой к действию токсикантов органической природы;
- 4) Результаты, полученные при анализе воздействия ПХБ на активность основных антиоксидантных ферментов в модельном эксперименте могут быть использованы для диагностики повреждающего влияния полихлорированных бифенилов на антиоксидантный аппарат растений в природных экосистемах в сходных условиях произрастания и стадиях развития, а также степени вовлечения почвенного покрова в циркуляцию органических поллютантов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белинская Е.А. Влияние стойких органических загрязнителей и бенз(а)пирена на прорастание семян ячменя обыкновенного (*Hordéum vulgäre*, L.) / Е.А. Белинская, С.Е. Мазина, Е.К. Пичугина, Г.В. Зыкова // Токсикологический вестник. — 2020. — № 4(163). — С. 44–48.
2. Баева И.Ю. Оценка токсичности почв полихлорированными бифенилами для высших растений / И.Ю. Баева, Н.А. Черных // Вестник РУДН серия «Экология и безопасность жизнедеятельности». — 2015. — №4. — С. 100–105.
3. Sridevi N. Oxidative stress modulates membrane bound ATPases in brain regions of PCB (Aroclor 1254) exposed rats: protective role of alpha-tocopherol / N. Sridevi, P. Venkataraman, K. Senthilku mar et al. // Biomed. Pharmacother. — 2007. — Vol. 61. — N7. — P. 435–40.
4. Баева И.Ю. Оценка токсичности почв полихлорированными бифенилами для высших растений / И.Ю. Баева, Н.А. Черных // Вестник РУДН серия «Экология и безопасность жизнедеятельности». — 2015. — №4. — С. 100–105.
5. Винокурова Н.В. Влияние полихлорированных бифенилов на фотосинтезирующий аппарат макрофитов на примере роголистника (*Ceratophyllum demersum* L.) / Н.В. Винокурова, Г.Н. Соловых // ИНТЕЛЛЕКТ. ИННОВАЦИИ. ИНВЕСТИЦИИ. — 2013. — № 1. — С. 158–161.
6. Способ определения антиоксидантной активности супероксиддисмутазы и химических соединений Текст: пат. 2144674 С1 Рос. Федерация: МПК7 G01 N 33|52, 33|68
7. Воскресенская О.Л. Большой практикум по биоэкологии: уч. пособ. / ГОУ ВПО Марийский государственный университет / Воскресенская О.Л., Алябисева Е.А., Половникова М.Г. — Йошкар-Ола, 2006. — 107 с.
8. Воскресенская О.Л. Большой практикум по биоэкологии: уч. пособ. / ГОУ ВПО Марийский государственный университет / Воскресенская О.Л., Алябисева Е.А., Половникова М.Г. — Йошкар-Ола, 2006. — 107 с.
9. Аладин Д.Ю. Влияние микрорельефа на распределение полихлорбифенилов в почвах / Д.Ю. Аладин // Теоретическая и прикладная экология. — 2017. — №2. — С. 64–70.
10. Шитиков В.К. Модели «доза — эффект» для оценки экологического риска при техногенном загрязнении почвы / В.К. Шитиков, В.А. Терехова, Б.А. Узбеков, К.А. Кыдралиева, Б.М. Худайбергенова // Принципы экологии. — 2015. — № 3. — С. 73–88.
11. Мишко А.Е. Динамика активности пероксидазы и ее изоформ в листьях разных сортов яблони / А.Е. Мишко, Е.О. Луцкий // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. — 2021. — 182(3). — С. 37–43.
12. Рач А. Селективная реакция изоформ растительной пероксидазы класса на экологически значимые дозы УФ-В / А. Рач // Физиология растений — 2018 (февраль). — С. 125–131.
13. Стаценко А.П. Растительные пероксидазы — маркеры химического загрязнения природных сред / А.П. Стаценко, Л.И. Тужилова, А.А. Вьюговский // Вестник ОГУ. — № 10(92). — 2008. — С. 188–191.

© Осинкина Татьяна Владимировна (osinkina12@mail.ru); Соловых Галина Николаевна (k_biology@orgma.ru);
 Кольчугина Гюзель Фарыховна (k_biology@orgma.ru); Кануникова Елена Александровна (k_biology@orgma.ru);
 Тихомирова Галина Михайловна (k_biology@orgma.ru)

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»