

ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВЛИЯНИЯ ПОЛИХЛОРИРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ЧЕРЕДЫ ТРЕХРАЗДЕЛЬНОЙ (*BIDENS TRIPARTITA* L.)

Осинкина Татьяна Владимировна

кандидат биологических наук, доцент Оренбургского
государственного медицинского университета
osinkina12@mail.ru

ENVIRONMENTAL ASPECTS OF THE INFLUENCE OF POLYCHLORINATED BIPHENYLS ON THE ENZYME ACTIVITY OF *BIDENS TRIPARTITA* L

T. Osinkina

Summary. This article presents the results of an experimental study investigating the effects of polychlorinated biphenyls on the activity dynamics of certain oxidases in *Bidens tripartita* L. Superoxide dismutase and peroxidase activity were determined spectrophotometrically, and catalase activity was measured by permanganometry. Polychlorinated biphenyls were used in the formulation of «Sovtol», a mixture of 4-, 5-, and 6-chloro-substituted biphenyl derivatives. The activity of antioxidant enzymes, as factors of environmental adaptation, was determined during all stages of *Bidens tripartita* development: seedling, vegetation, and flowering. It was shown that, under the influence of polychlorinated biphenyls at a concentration of 0.001 mg/L, superoxide dismutase activity was highest at the seedling stage, exceeding the control by 3.6 times, and at the vegetation and flowering stages by 5.4 and 4.0 times, respectively. Primary exposure to toxicants at a concentration of 0.0005 mg/L had no significant effect on superoxide dismutase activity. The increase in superoxide dismutase activity at the seedling stage is possibly due to either the stabilizing effect of toxicants on the enzyme during initial exposure or to increased activity and production of enzyme forms more resistant to polychlorinated biphenyls, specifically during this period of plant development. Catalase and peroxidase activities exhibited similar dynamics at the seedling, vegetation, and flowering stages, showing a sharp increase following primary exposure to toxicants in a model experiment, demonstrating the phenomenon of a paradoxical dose-response relationship (hormesis). *Bidens tripartita* is a pharmacopoeial plant species. It is a source of biologically active compounds with a wide variety of chemical and pharmacological activities. A model experiment showed that the plant apparently forms ecological adaptations of biochemical parameters (antioxidant enzymes) to the action of polychlorinated biphenyls.

Keywords: ecological adaptations, bioindicators, toxicants, antioxidant enzymes, tripartite *Bidens*, polychlorinated biphenyls, superoxide dismutase, catalase, peroxidase, hormesis.

Аннотация. В статье отражены результаты эксперимента исследования влияния полихлорированных бифенилов на динамику активности некоторых оксидаз череды трехраздельной (*Bidens tripartita* L.). Активность супероксиддисмутазы и пероксидазы определяли спектрофотометрическим методом, активность каталазы методом перманганометрии. Полихлорированные бифенилы использовались в составе «Совтол» — смесь 4, 5 и 6-хлорзамещенных производных бифенила. Активность антиоксидантных ферментов как факторов экологической адаптации определена во все фазы развития череды трехраздельной «проростки», «вегетация», «цветение». Показано, что под воздействием полихлорированных бифенилов в концентрации 0,001 мг/л активность супероксиддисмутазы оказалась максимальной на стадии «проростки», превысив контроль в 3,6 раза, на стадиях «вегетация» и «цветение» в 5,4 и 4,0 раза, соответственно. Первичное воздействию токсикантов в концентрации 0,0005 мг/л не оказало значительного влияния на активность супероксиддисмутазы. Рост активности супероксиддисмутазы на стадии проростков обусловлен, возможно, либо стабилизирующим действием токсикантов на фермент при первичном воздействии, либо ростом активности и продукции форм фермента более устойчивого к влиянию полихлорированных бифенилов, именно в данный период онтогенеза растения. Каталазная и пероксидазная активности проявили сходную динамику на этапах «проростки», «вегетация», «цветение», показав резкий рост при первичном воздействии токсикантов в модельном эксперименте, обозначив явление парадоксальной зависимости «доза-эффект» (гормезис). Черда трехраздельная — фармакопейный вид растений. Выступает источником многообразных по химической природе и фармакологической активности биологически активных соединений. В модельном эксперименте показано, что растение, по-видимому, формирует экологические адаптации биохимических параметров (антиоксидантных ферментов) к действию полихлорированных бифенилов.

Ключевые слова: экологические адаптации, биоиндикаторы, токсиканты, антиоксидантные ферменты, черда трехраздельная, полихлорированные бифенилы, супероксиддисмутазы, каталаза, пероксидаза, гормезис.

Введение

Экологические адаптации растений в силу их анатомо-морфологических (прикрепленный образ жизни) и биохимических особенностей (большое количество биологически активных соединений) являются приоритетными для оценки их состояния. Анализ метаболизма растений приобретает особую значимость, если речь идет о лекарственных растениях и видах-биоиндикаторах состояния среды обитания в условиях стресса, вызванного влиянием токсических веществ [1, с. 9]. Значительный интерес вызывает состояние лекарственных растений. Так как адаптационные способности данной группы определяют во многом синтез вторичных метаболитов. А именно вторичные метаболиты, как правило, обладают лекарственными свойствами.

Одним из основных адаптационных механизмов растений по причине их подверженности окислительному стрессу является работа систем антиоксидантной защиты. У растений система представлена специфическими для данной группы организмов оксидоредуктазами. В состав группы входят ферменты супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза, глутатионредуктаза. По принципу действия супероксиддисмутаза выступает ферментом, реагирующим на наиболее агрессивный супероксид-анион радикал ($O_2^{\cdot-}$) [7, с. 155]. Фермент катализирует его превращение в пероксид водорода и кислород. Пероксид водорода разрушается каталазой. Пероксидазная активность направлена на уничтожение уже образовавшихся в клетках растения перекисных соединений органической и неорганической природы [3, с. 163; 6, с. 29].

Среди стойких в окружающей среде (в том числе почве) органических загрязнителей следует учитывать полихлорированные бифенилы. Механизм действия их на фотосинтезирующие растения заключается в активации свободнорадикального окисления [9, с. 177]. Следствием подобного процесса является снижение активности антиоксидантных ферментов, способствующее угнетению жизнедеятельности растения и продукции биологически активных соединений [8, с. 123]. В связи с достаточной распространенностью полихлорированных бифенилов в почве и устойчивостью их в составе почвенных коллоидов [10, с. 672]. Актуальным является анализ действия соединений в ограниченные сроки действия и в ограниченном пространстве (в модельной экосистеме). На примере лекарственных растений, используемых в медицине и фармации.

Материалы и методы исследования

Материал исследования — вегетативные части череды трехраздельной (*Bidens tripartita* L.), семядольные проростки, побеги и листья, нераскрывшиеся и раскрыв-

шиеся цветки растения. Выращивалось растение в контейнерах с почво-смесью для цветочных культур, а именно грунт «Универсальный» в течение 1,0–1,5 месяцев. С периодичностью (проростки, вегетация и цветение) растение подвергалось воздействию раствора «Совтол» (смесь полихлорированных бифенилов) в концентрациях 0,0005 мг/л, 0,001 мг/л, 0,0012 мг/л. Концентрации подобраны в соответствии с проведенными ранее исследованиями Н.В. Винокуровой (2013г.), установившей содержание полихлорированных бифенилов в почве на уровне данных значений. Полив производился однократно. От лишнего раствора поддон освобождался сразу же после полива, в остальные дни растения поливали по мере подсыхания земляного кома водопроводной, отстоявшейся водой. Контрольные образцы растений поливали водопроводной водой без минеральных и органических добавок.

Активность антиоксидантного фермента супероксиддисмутаза (СОД) определяли методом, основанном на способности ингибировать аутоокисление адреналина в адrenoхром (окрашенный) 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 СОД, %;
 E_k — экстинкция контроля;
 E_o — экстинкция опыта.

Активность каталазы определяли методом перманганометрии. Показатель рассчитывали по стандартной 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 (15 мин);
 E — разведение [4, с. 72].

Метод определения активности фермента пероксидазы — фотоэлектроколориметрический основан на изменении времени, за которое опытный раствор достигнет определенной оптической плотности. В качестве субстрата использовался раствор 1 % бензидина.

Навеску растительного материала (65–110 мг) растирали в ступке с водой, переносили в мерную колбу на 50 мл и доводили дистиллированной водой до метки.

Растительную вытяжку настаивали в течение 20–25 мин, затем центрифугировали в течение 15–18 мин при 1500 об./мин. Надосадочную жидкость (супернатант) использовали для определения активности фермента пероксидазы. Для определения активности брали две кварцевые кюветы толщиной около 1 см (оптический путь). По контрольной кювете устанавливали ноль прибора, предварительно заполнив ее 0,9 мл бензидина (1-й % раствор), 0,9 мл фильтрата и 1,6 мл воды. Во вторую опытную кювету вливали 0,9 мл бензидина, 0,9 мл фильтрата и 1,6 мл 0,3 %-ного раствора пероксида водорода, при этом сильная струя пероксида перемешивала содержимое кюветы. Добавление пероксида служило началом реакции. Одновременно с приливанием пероксида водорода включали секундомер. В опытной кювете раствор постепенно синел, стрелка прибора медленно перемещалась справа налево. Отмечали время, за которое стрелка достигнет 0,2 делений прибора (единицы оптической плотности). Активность фермента рассчитывали по следующей 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) [4, с. 68].

Определения активности антиоксидантных ферментов производились в трех повторностях. Статистическую обработку результатов, полученных в ходе эксперимента, производили с использованием пакета MS Excel 2010 «Анализ данных» раздел «Описательная статистика» (Microsoft, USA).

Основные результаты и их обсуждение

Анализ данных по результатам модельного эксперимента показал: ферменты супероксиддисмутаза, каталаза и пероксидаза проявляли некоторую активность на всех стадиях вегетации. В отношении супероксиддисмутазы показано, что наибольшая активность в контроле отмечена на стадии «проростки» и «цветение». В «проростках» активность превышала в 1,34 раза остальные фазы роста. На стадии «вегетация» активность супероксиддисмутазы в черede трехраздельной на 59 % оказалась снижена по сравнению с «проростками» и «цветением».

Воздействие полихлорированных бифенилов (ПХБ) значительно повлияло на рост активности супероксиддисмутазы только на стадии «проростков» при концентрации ПХБ 0,001 мг/л. Активность фермента возросла в 3,6 раза при сравнении с контролем; в 5,4 раза и 4,0 раза при «вегетации» и «цветении», соответственно (рис. 1).

Следовательно, проростки череды трехраздельной, по-видимому, содержат супероксиддисмутазу более чувствительную к повышенным концентрациям ПХБ в сравнении с формами фермента «работающими» в растении на этапе «вегетации» и «цветения» [2, с. 56].

В отношении каталазы череды отмечена иная тенденция динамики активности. В контроле значимых изменений не происходило — на этапах «проростки», «вегетация», «цветение» показатель незначительно варьировал в пределах 45,05–46,71 мл O_2 /гхмин. В опыте даже при воздействии минимальных концентраций ПХБ — 0,0005 мг/л отмечен резкий скачок активности фермента в среднем в 2 раза на всех этапах анализа (рис. 2).

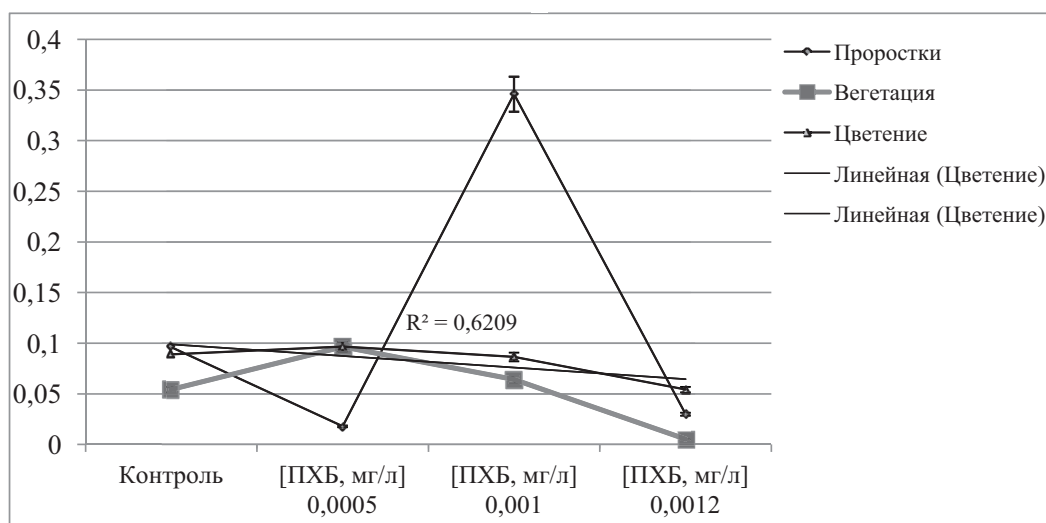


Рис. 1. Активность супероксиддисмутазы (СОД) (ед. А, %) череды трехраздельной (*Bidens tripartita* L) в разные периоды вегетации

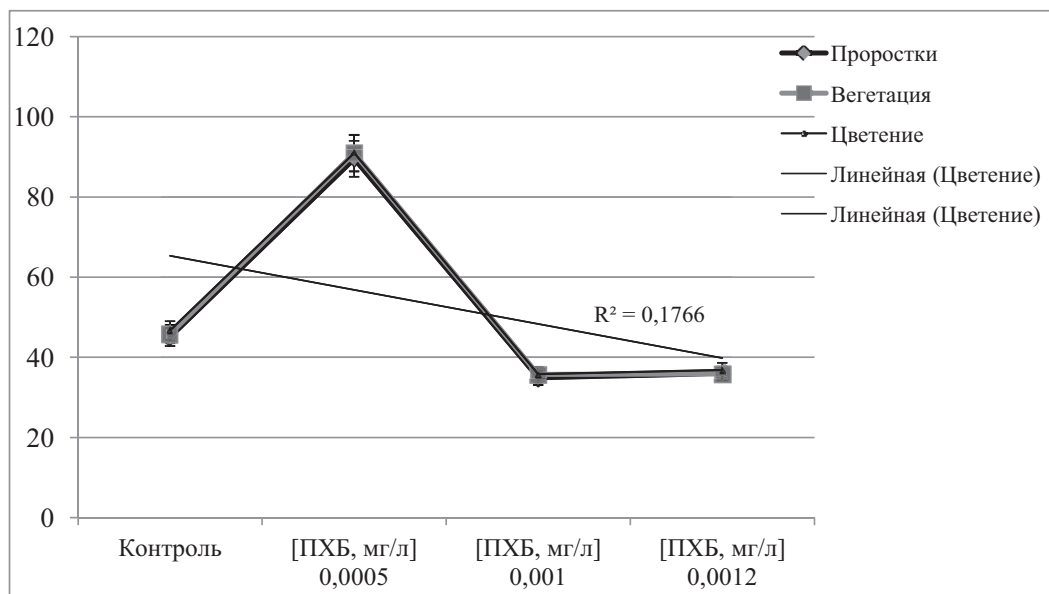


Рис. 2. Активность каталазы (мл O₂ / гхмин) череды трехраздельной (*Bidens tripartita* L) в разные периоды вегетации

Дальнейшее увеличение концентрации ПХБ до 0,001 и 0,0012 мг/л привело лишь к падению активности каталазы в среднем на 39 %. Подобная реакция растений на воздействия токсикантов может быть свидетельством проявления гормезиса или «парадоксальной зависимости «доза-эффект»». Данное явление зачастую возникает в ответ на первичное и кратковременное действие токсического вещества на организм. Реакция защитных систем организма на молекулярном уровне может быть обусловлена состоянием, возрастом, влиянием стрессовых факторов. «Острота» реакции антиоксидантных ферментов иллюстрирует, возможно, уровень стрессоустойчивости организма. Учитывая создание условий воздействия полихлорированных бифенилов, оказывающих даже в малых концентрациях ингибирующее действие на активные центры ферментов и конформацию белковой части (апофермента) [2, с.57; 5, с.38].

Каталаза в растении реагирует на pH среды и уровень закисления/защелачивания. Резкое кратковременное увеличение ее активности при наличии в среде ПХБ в концентрации 0,001 мг/л может быть следствием нарушения оптимума активности фермента (pH 7,1–7,2). С другой стороны — проникновение в клетку полихлорированных бифенилов могло спровоцировать рост концентраций субстратов (пероксид водорода H₂O₂). В ответ на данный процесс, по-видимому, усилился синтез защитного фермента, и, возможно, именно той его формы, которая способна ликвидировать перекисные соединения в экстремальных условиях.

Пероксидазная активность по характеру проявления оказалась схожа с активностью супероксиддисмутазы, однако ее максимум в этом случае обозначился уже при минимальном значении ПХБ (рис. 3).

Наибольшие показатели активности фиксировались только при воздействии ПХБ в концентрации 0,0005 мг/л. Для «проростков» и «вегетации» в 4,9 раза и в 5,5 раза больше чем в контроле, соответственно. Достаточно высокая активность фермента отмечена для периода «цветения» и составила 0,0063 ΔD₆₇₀/гхс в сравнении с другими этапами и контролем. Подобный характер динамики активности отмечен и в случае каталазы, что свидетельствует, по-видимому, о возможности явления парадоксальной зависимости «доза-эффект» для данных ферментов. Острая реакция организма растения, проявившаяся в росте активности защитных оксидаз, в данном случае может быть формированием биохимической экологической адаптации череды трехраздельной к стрессовым факторам среды обитания (полихлорированным бифенилам в почве). Учитывая факт того, что активные центры выше указанных оксидаз содержат ионы Fe²⁺ (каталаза) и Cu²⁺ (супероксиддисмутаза) следует предположить химическую «атаку» и последующую блокировку металл-зависимых оксидаз. Особо химически активными считаются планарные конгенеры с 4, 5 и 6 подвижными атомами хлора в составе конденсированных бифенилов.

Заключение

Таким образом, полученные данные позволяют сделать следующие выводы:

- 1) Активность антиоксидантных ферментов как факторов экологической адаптации определена во все фазы развития череды трехраздельной «проростки», «вегетация», «цветение»;
- 2) Показано, что под воздействием полихлорированных бифенилов в концентрации 0,001 мг/л активность супероксиддисмутазы оказалась максимальной на стадии «проростки», превысив кон-

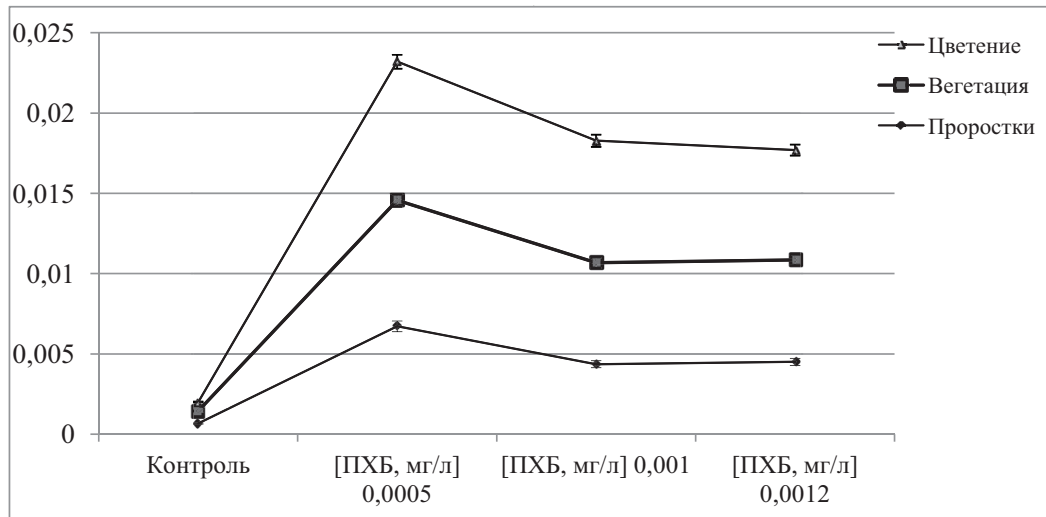


Рис. 3. Активность пероксидазы ($\Delta D_{670}/г \times с$) череды трехраздельной (*Bidens tripartita* L) в разные периоды вегетации

троль в 3,6 раза, на стадиях «вегетация» и «цветение» в 5,4 и 4,0 раза, соответственно;

- 3) Рост активности супероксиддисмутазы на стадии проростков обусловлен, возможно, либо стабилизирующим действием токсикантов на фермент, либо ростом продукции форм фермента более устойчивого к влиянию полихлорированных бифенилов;
- 4) Каталазная и пероксидазная активности проявили сходную динамику, показав резкий рост при

первичном воздействии токсикантов в модельном эксперименте, показав явление парадоксальной зависимости «доза-эффект»;

- 5) Черда трехраздельная — фармакопейный вид растений, выступающий источником биологически активных соединений. В модельном эксперименте показано, что растение, по-видимому, формирует экологические адаптации биохимических параметров (антиоксидантных ферментов) к действию полихлорированных бифенилов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авальбаев А.М. Влияние модельной засухи на физиолого-биохимические параметры разных экотипов пшеницы на начальном этапе онтогенеза / А.М. Авальбаев, Р.А. Юлдашев, А.Р. Лубянова, А.А. Плотников, А.И. Якупова, Н.А. Герасимов, Ч.Р. Аллагулова // Таврический вестник аграрной науки. — 2023. — № 3 (35) — С. 8–22.
2. Балакина А.А. Влияние регуляторов роста на изоферментный состав супероксиддисмутазы в растениях люпина узколистного (*Lupinus angustifolius* L.) in vitro / А.А. Балакина, А.А. Терентьев, Е.А. Калашникова, С.Л. Белопухов // Бутлеровские сообщения. — 2012. — № 1–3. — т. 29. — С. 55–60.
3. Безрукова М.В. Влияние 24-эпибрассинолида на водный обмен отличающихся по засухоустойчивости сортов пшеницы при осмотическом стрессе / М.В. Безрукова, Г.Р. Кудоярова, А.Р. Лубянова, Д.Р. Масленникова, Ф.М. Шакирова // Физиология растений. — 2021. — Т. 68. — № 2. — С. 161–169. DOI: 10/31857/S0015330321010048.
4. Воскресенская О.Л. Большой практикум по биоэкологии: уч. пособ. / ГОУ ВПО Марийский государственный университет / О.Л. Воскресенская, Е.А. Алябшева, М.Г. Половникова. — Йошкар-Ола. — 2006. — 107 с.
5. 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.
6. Рахматуллина Н.Ш. Показатели антиоксидантной системы *Artemisia annua* L., *Matricaria chamomilla* L. и *Tanacetum vulgare* L. в естественных условиях произрастания и в городской среде / Н.Ш. Раматуллина, Н.Г. Акиншина, А.А. Азизов, Г.Г. Раджабова // Научное обозрение. — 2020. — № 4. — С.28–32.
7. Сидякин А.И. Активность каталазы и пероксидазы пшеницы и томатов при инокуляции *trichoderma* sp. на ранних этапах онтогенеза / А.И. Сидякин, С.И. Чмелева, В.В. Белоусов, Э.Р. Джелдубаева, К.Н. Туманянц // Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Биология. Химия. — 2025. — № 1. — Т 11(77). — С. 151–161.
8. Guizani A. Drought responsiveness in six wheat genotypes: identification of stress resistance indicators / A. Guizani, H. Askri, M.L. Amenta, R. Defez, E. Babay, C. Bianco, N. Rapana, M. Finetti-Sialer, F. Gharbi // *Frontiers in Plant Science*. — 2023. — Vol. 14. — Art. — No. 1232583. DOI: 10.3389/fpls.2023.1232583.
9. Hura T. Drought-stress induced physiological and molecular changes in plants 2.0 / T. Hura, K. Hura, A. Ostrowska // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2023. — Vol. 24. — Art. — No. 1773. DOI: 10.3390/ijms24021773.
10. Razi K. Drought stress-induced physiological mechanisms, signaling pathways and molecular response of chloroplasts in common vegetable crops / K. Razi, S. Muneer // *Critical Reviews in Biotechnology*. — 2021. — Vol. 41. — P. 669–691. DOI: 10.1080/07388551.2021.1874280.

© Осинкина Татьяна Владимировна (osinkina12@mail.ru)

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»