

**ВЛИЯНИЕ АРОМАТИЧЕСКИХ КСЕНОБИОТИКОВ
НА АКТИВНОСТЬ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ФЕРМЕНТОВ
ЭЛОДЕИ КАНАДСКОЙ (*ELODEA CANADENSIS*)**

**А. С. Трегуб¹, Н. Н. Позднякова², В. С. Гринев²,
М. Д. Гольдфейн¹, О. В. Турковская²**

¹ Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского
Россия, 410012, Саратов, Астраханская, 83.

² Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН
Россия, 410049, Саратов, просп. Энтузиастов, 13
E-mail: GoldfeinMD@info.sgu.ru

Поступила в редакцию 19.03.10 г.

Влияние ароматических ксенобиотиков на активность внутриклеточных ферментов элодеи канадской (*Elodea canadensis*). – Трегуб А. С., Позднякова Н. Н., Гринев В. С., Гольдфейн М. Д., Турковская О. В. – Изучено влияние ароматических углеводородов (фенола, толуола, нафталина, фенантрена и флуорена) на активность эндоферментов водного растения элодеи канадской. В растительной вытяжке выявлены активности оксидазы, тирозиназы и пероксидазы, меняющие свои значения в зависимости от pH и химической природы ксенобиотика. Обнаружена устойчивость тирозиназы к действию исследуемых соединений, в отличие от пероксидазы и оксидазы, активность которых, в основном, снижалась. Показана существенная убыль содержания фенола и толуола в вытяжке элодеи, свидетельствующая о процессах детоксикации этих веществ растительными ферментами.

Ключевые слова: *Elodea canadensis*, активность ферментов, ароматические углеводороды, ксенобиотики.

Effect of aromatic xenobiotics on the activity of intracellular enzymes of *Elodea canadensis*. – Tregub A. S., Pozdnyakova N. N., Grinev V. S., Goldfein M. D., and Turkovskaya O. V. – The effect of aromatic hydrocarbons (phenol, toluene, naphthalene, phenanthrene, and fluorene) on the activity of endoenzymes of the aquatic plant *Elodea canadensis* was investigated. In a plant extract, the activities of oxidase, tyrosinase, and peroxydase were revealed, which changed their values depending on pH and on the chemical nature of the xenobiotic. Tyrosinase was tolerant to the action of the compounds under study, as distinct from peroxydase and oxidase, whose activity decreased substantially. There was a considerable decline in the phenol and toluene content in the *Elodea* extract, attesting to the detoxication of these substances by plant enzymes.

Key words: *Elodea canadensis*, enzyme activity, aromatic hydrocarbons, xenobiotics.

ВВЕДЕНИЕ

Высокая степень вовлечения прибрежных зон морей и рек в хозяйственную деятельность приводит к накоплению в воде и осадках всевозможных загрязняющих веществ, в том числе ароматических углеводородов как моно-, так и полициклических, обладающих целым комплексом опасных для живых организмов свойств. Высшие водные растения являются одним из основных компонентов самоочищения водоёмов, обладая способностью поглощать, аккумулировать и метаболизировать многие поллютанты. Превращение ксенобиотиков в растениях сопро-

вождается процессами окислительной деградации, которые катализируются в основном такими ферментами, как пероксидазы и фенолоксидазы.

Пероксидазы – широко распространенная группа ферментов, осуществляющих окисление субстрата в присутствии H_2O_2 . Ввиду широкого функционального разнообразия они принимают участие во многих физиологических и детоксикационных процессах. Растительные пероксидазы способны окислять моно- и полициклические ароматические соединения, такие как фенол, гидрокситолуол, бенз[а]пирен, диметилаланин и др. (Заалишвили и др., 2000; Квеситадзе и др., 2005).

Фенолоксидазы также вносят значительный вклад в процесс деградации ароматических углеводов. Эта группа медьсодержащих ферментов, находящихся в растениях в активном и латентном состоянии, включает в себя фенолоксидазы тирозиназного и лакказного типа. Широкий ряд ароматических веществ фенольной природы может являться субстратом этих ферментов (Квеситадзе и др., 2005).

Исходя из того, что присутствие поллютантов в воде оказывает воздействие на биохимические процессы в клетках водных растений и, в первую очередь, на их ферментативный аппарат, целью проведенного исследования явилось изучение влияния ряда ароматических ксенобиотиков на активность эндоферментов элодеи канадской.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследований являлась элодея канадская (*Elodea canadensis*), культивируемая в комнатных условиях. Для получения вытяжки, представляющей собой грубый ферментный препарат, 0,5 г побегов элодеи измельчали и гомогенизировали в охлажденной керамической ступке с 2 мл 50 мМ ацетатного (рН 5.0), или 50 мМ Na-фосфатного (рН 6.5), или 50 мМ Трис-НСl (рН 9.0) буфера. Гомогенат сливали в мерную колбу и доводили объем тем же буфером до 25 мл. Неразрушенные клетки и их фрагменты осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 5000 об./мин. В вытяжку вносили тот или иной ксенобиотик до конечной концентрации 0,2 мМ и инкубировали в течение 3 ч. В качестве ксенобиотиков ароматического ряда были использованы монофенолы (фенол и толуол) и полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) (нафталин, фенантрен и флуорен). ПАУ предварительно растворяли в 100 мкл хлороформа, фенол – в 100 мкл H_2O , толуол вносили без разбавления. Для определения содержания ксенобиотиков в вытяжке после инкубирования проводили их экстрагирование 10 мл хлороформа с последующим определением методом газовой хроматографии: хроматограф Shimadzu 2010 (Япония), колонка Equity-1 (Supelco, США), пламенно-ионизационный детектор, газ-носитель – гелий.

Определение ферментативной активности вытяжки элодеи проводили спектофотометрически на СФ-26 в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующего превращение 1 мкмоль субстрата или образование 1 мкмоль продукта в мин и рассчитывали как единицы (Ед.) на мл вытяжки. Удельную активность определяли как мкмоль/мин/мг белка. Активность ферментов измеряли в начале эксперимента и через 3 ч их инкубирования с соответствующим ксенобиотиком или без него (кон-

троль). Активность тирозиназы выявляли по образованию продукта окисления из *L*-дигидроксифенилаланина (*L*-ДОФА) при 475 нм (Pomerantz and Myrthy, 1974). Активность лакказы оценивали по образованию продуктов окисления сирингальдазина при 525 нм (Leonowicz and Crzywnowicz, 1981), диаммонийной соли 2,2'-азино-бис-3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты (АБТС) (Niku-Paavola et al., 1988) и пирокатехина при 410 нм (Королева и др., 2001). Активность пероксидазы определяли при 436 нм по образованию продукта окисления АБТС в присутствии H_2O_2 и рассчитывали как разницу между активностью фермента в присутствии H_2O_2 и без нее.

Концентрацию белка определяли по методу Bradford (Bradford, 1976).

Все эксперименты проводили в трех повторах. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программы Microsoft Excel Office XP, а также общепринятым методом с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как уже отмечалось выше, в нейтрализации ароматических ксенобиотиков в растительной клетке могут быть задействованы две группы ферментов: фенолоксидазы (лакказного и тирозиназного типа) и пероксидазы (Лукнер, 1979).

Сирингальдазин – тестовый субстрат для определения активности лакказы (Leonowicz, Crzywnowicz, 1981). В ходе эксперимента была выявлена только следовая активность вытяжки по отношению к данному веществу, не превышающая 0.1 Ед./мл. При использовании АБТС, который также является субстратом лакказы, ее активности не обнаружено. Вместе с тем в вытяжке была выявлена активность по отношению к пирокатехину (15.4 Ед./мл), причем достаточно высокая по сравнению с таковой к АБТС и сирингальдазину. Сопоставляя полученные результаты с данными литературы (Pozdnyakova et al., 2006), можно предположить, что выявленное нами окисление пирокатехина может быть результатом реакции, катализируемой оксидазой нелакказной природы.

Тестовым субстратом для определения активности тирозиназы является *L*-ДОФА. Было обнаружено присутствие этого фермента в исследуемом материале с активностью, достигающей 28 Ед./мл. В растительной вытяжке наблюдалась активность еще одного фермента – пероксидазы, которая превышала тирозиназную в 3 раза и составляла 86 Ед./мл.

Таким образом, в вытяжке элодеи установлены активности трех ферментов: оксидазы, тирозиназы и пероксидазы, которые существенно реагировали на рН и природу вносимого ксенобиотика.

Известно, что оптимум активности оксидаз и пероксидаз находится в кислой области (McEldoon et al., 1995), а тирозиназ – в нейтральной и щелочной (Sanches-Ferre, 1995). В этой связи для дальнейших исследований были выбраны буферные растворы с рН 5.0, 6.5 и 9.0. Их использование для получения вытяжек показало, что при повышении рН увеличивается количество экстрагируемого белка от 1.75 мг/мл (рН 5.0) до 14.1 мг/мл (рН 9.0) (рисунок).

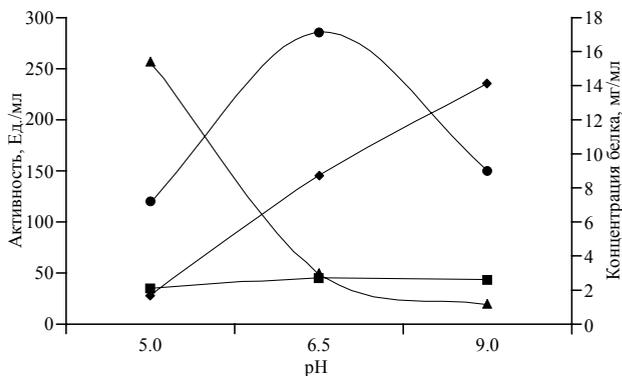
Вместе с тем наибольшая активность пероксидазы (285 Ед./мл) и тирозиназы (44.9 Ед./мл) была выявлена при значении рН экстрагирующего буфера 6.5, тогда

ВЛИЯНИЕ АРОМАТИЧЕСКИХ КСЕНОБИОТИКОВ

как максимальная активность оксидазы была обнаружена при pH 5.0. Эта особенность может быть как результатом большей экстракции ферментов, так и их большей стабильности при кислых значениях pH. Инкубирование полученной вытяжки в течение 3 ч при комнатной температуре показало, что выявленные ферменты сохраняли активность независимо от pH экстрагирующего буфера.

В ходе инкубации вытяжки *E. canadensis* с моноароматическими веществами и ПАУ контролировалось содержание ксенобиотиков (через 3 ч), в результате была обнаружена их убыль из реакционной смеси, зависящая от pH и химической природы ксенобиотика. По опубликованным ранее данным (Тумайкина и др., 2008), убыль фенола увеличивалась при смещении pH в щелочную сторону и была максимальной (53.2%) при pH 9.0. Убыль толуола также была максимальной (61%) при щелочном значении pH. По нашим данным, в случае ПАУ содержание нафталина во всех вариантах не менялось, максимальное снижение содержания фенантрена и флуорена – на 23% – обнаружено при pH 5.0 и 6.5 соответственно, убыли всех ПАУ при pH 9.0 не происходило. Полученные результаты (табл. 1) и сопоставление их с данными литературы позволяют предположить, что убыль фенола и толуола может быть результатом реакции, катализируемой тирозиназой, так как эти вещества являются субстратами данного фермента (Лукнер, 1979), а убыль ПАУ может быть отнесена к действию пероксидазы и/или оксидазы, которые, как известно (Günther et al., 1998), могут катализировать окисление подобных соединений.

В табл. 2 представлены результаты исследования влияния ксенобиотиков на активность ферментов при инкубировании вытяжки элодеи в буферах с различными значениями pH. Обнаружено, что независимо от pH активность тирозиназы увеличивалась от 1.3 до 4 раз в зависимости от использованного ксенобиотика.



Зависимость активности тирозиназы (■), пероксидазы (●), оксидазы (▲) и концентрации белка (◆) от pH экстрагирующего буфера

Таблица 1
Убыль ксенобиотиков под воздействием вытяжки *E. canadensis* (% от контроля)

Ксенобиотик	pH		
	5.0	6.5	9.0
Фенол	19.8*	22.2*	53.2*
Толуол	57.1*	10.1*	61.2*
Нафталин	0	0	0
Фенантрен	23	0	0
Флуорен	12	23	0

Примечание. Ошибка всех результатов не превышала 10%; * – данные из работы Ю. А. Тумайкиной и др. (2008).

В табл. 2 представлены результаты исследования влияния ксенобиотиков на активность ферментов при инкубировании вытяжки элодеи в буферах с различными значениями pH. Обнаружено, что независимо от pH активность тирозиназы увеличивалась от 1.3 до 4 раз в зависимости от использованного ксенобиотика.

Исключение составили нафталин и толуол, в присутствии которых происходило незначительное снижение активности этого фермента.

Таблица 2

Влияние ароматических ксенобиотиков на активность внутриклеточных ферментов элодеи канадской, Ед./мл

рН	Фенол		Толуол		Нафталин		Фенантрен		Флуорен	
	Исх.	3 ч	Исх.	3 ч	Исх.	3 ч	Исх.	3 ч	Исх.	3 ч
Тирозиназа										
5.0	35.	67.3	28.1	113.5	103.5	100.0	65.4	84.6	98.4	107.6
6.5	44.9	126.2	128.4	107.3	77.8	90.5	75.1	119.5	59.5	110.3
9.0	43.2	73.5	53.8	93.5	70.3	65.7	72.2	110.0	59.2	99.5
Оксидаза										
5.0	7.1	15.6	18.1	28.1	43.2	16.6	26.6	9.0	32.8	13.8
6.5	30.8	25.2	22.8	12.8	21.4	22.3	25.6	17.1	17.6	5.2
9.0	29.0	17.6	11.8	12.3	16.1	5.2	16.2	12.4	19.0	3.8
Пероксидаза										
5.0	86.0	102.0	166.3	157.1	99.6	98.2	136.2	103.2	139.1	129.0
6.5	209.3	285.2	243.7	227.9	100.3	111.8	180.6	120.4	141.9	149.1
9.0	202.1	150.5	301.0	236.5	80.3	103.2	147.7	176.3	202.1	137.6

* – Ошибка всех результатов не превышала 10%.

При исследовании активности оксидазы обнаружено ингибирующее действие ксенобиотиков при рН 6.5 и 9.0, за исключением нафталина и толуола, которые оказывали лишь слабое влияние. Вместе с тем при рН 5.0 воздействие исследуемых веществ было неоднозначным: монофенолы приводили к повышению активности, тогда как ПАУ – к ее снижению.

Пероксидаза *E. canadensis*, в отличие от тирозиназы, оказалась более подверженной ингибирующему действию ксенобиотиков. Так, при рН 5.0 все исследованные вещества снижали ее активность. Исключение составил фенол, в присутствии которого отмечено незначительное повышение активности этого фермента, которое наблюдалось и при рН 6.5. При этом значении рН толуол и фенантрен ингибировали активность пероксидазы, а нафталин и флуорен на нее практически не влияли. При рН 9.0 монофенолы и флуорен ингибировали активность этого фермента, тогда как нафталин и фенантрен ее повышали.

Таким образом, в вытяжке элодеи канадской были выявлены активности трех ферментов: тирозиназы, пероксидазы и оксидазы. Обнаружено, что они менялись в присутствии ряда ароматических ксенобиотиков и были рН-зависимыми. В целом тирозиназа оказалась более устойчивой к действию исследованных ароматических соединений, тогда как активности пероксидазы и оксидазы ингибировались их присутствием.

Полученные результаты важны для понимания процессов адаптации, происходящих в клетках водных растений в ответ на присутствие ароматических углеводородов, которые могут попадать в водоёмы с нефтепродуктами и стоками промышленных предприятий и, обладая определенной растворимостью в воде, прони-

кать в растения. Выявленные особенности биохимической активности элодеи в зависимости от воздействующих факторов могут быть использованы при разработке экологически значимых биотехнологий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Заалишвили Г. В., Хатисаишвили Г. А., Угрехелидзе Д. Ш., Гордезиани М. Ш., Квеси-тадзе Г. И. Детоксикационный потенциал растений // Прикл. биохимия и микробиология. 2000. Т. 36, № 5. С. 515 – 524.

Квеси-тадзе Г. И., Хатисаишвили Г. А., Садунишвили Т. А., Евстигнеева В. Г. Метаболизм антропогенных токсикантов в высших растениях. М. : Наука, 2005. 199 с.

Королева О. В., Явметдинов И. С., Шлеев С. В., Степанова С. В., Гаврилова В. П. Выделение и изучение некоторых свойств лакказы из базидиального гриба *Cerrena maxima* // Биохимия. 2001. Т. 66, вып. 6. С. 762 – 767.

Лукнер М. Вторичный метаболизм у микроорганизмов, растений и животных. М. : Мир, 1979. 548 с.

Тумайкина Ю. А., Турковская О. В., Игнатов В. В. Деструкция углеводов и их производных растительно-микробной ассоциацией на основе элодеи канадской // Прикл. биохимия и микробиология. 2008. Т. 44, № 4. С. 422 – 429.

Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72, № 1. P. 248 – 254.

Günther T., Sack U., Hofrichter M., Lätz M. Oxidation of PAH and PAH-derivatives by fungal and plant oxidoreductases // J. Basic Microbiol. 1998. Vol. 38, № 2. P. 113 – 122.

Leonowicz A., Grzywnowicz K. Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate // Enzyme Microb. Technol. 1981. Vol. 3. P. 55 – 58.

McEldoon J. P., Pokora A. R., Dordick J. S. Lignin peroxidase-type activity of soybean peroxidase // Enzyme Microb. Technol. 1995. Vol. 17. P. 359 – 365.

Niku-Paavola M.-L., Karhunen E., Salola P., Paunio V. Ligninolytic enzymes of the white-rot fungus *Phlebia radiata* // Biochem. J. 1988. Vol. 254. P. 877 – 883.

Pozdnyakova N. N., Rodakiewicz-Novak J., Turkovskaya O. V., Haber J. Oxydative degradation of polyaromatic hydrocarbons catalyzed by blue laccase from *Pleurotus ostreatus* D1 in the presence of synthetic mediators // Enzyme and microbial technology. 2006. Vol. 39. P. 1242 – 1249.

Pomerantz S. H., Murthy V. V. Purification and properties of tyrosinases from *Vibrio tyrosinaticus* // Arch. Biochem. Biophys. 1974. Vol. 160, № 1. P. 73 – 82.

Sanches-Ferrer A., Rodrigues-Lopez J. N., Garcia-Canovas F., Garcia-Carmona F. Tyrosinase : a comprehensive review of its mechanism // Biochimica Biophysica Acta. 1995. Vol. 1247. P. 1 – 11.