

АКТИВНОСТЬ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ, КАТАЛАЗЫ И ПЕРОКСИДАЗЫ ПАСТУШЬЕЙ СУМКИ ОБЫКНОВЕННОЙ (CAPSELLA BURSA-PASTORIS (L.) MEDIK) В УСЛОВИЯХ ВЛИЯНИЯ ЭКОТОКСИКАНТОВ — ПОЛИХЛОРИРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ

Осинкина Татьяна Владимировна

кандидат биологических наук, доцент, Оренбургский
государственный медицинский университет
osinkina12@mail.ru

ACTIVITIES OF SUPEROXIDE DISMUTASE, CATALASE AND PEROXIDASE OF COMMON SHEPHERD'S PURSE (CAPSELLA BURSA-PASTORIS (L.) MEDIK) UNDER INFLUENCE OF ECOTOXICANTS — POLYCHLORINATED BIPHENYLS

T. Osinkina

Summary. The article is the result of the study of the role of environmental factors of chemical nature within the framework of a model ecosystem to assess the effect of polychlorinated biphenyls on the activity level of antioxidant enzymes — superoxide dismutase, catalase, and peroxidase of shepherd's purse (*Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik) as a medicinal plant with a short growing season. The material of the study was sprouts, developed leaf blades, flowers and forming seeds. The activity of superoxide dismutase was determined by direct spectrophotometry, peroxidase — photoelectrocolorimetrically, catalase — permanganatometry. In response to the action of the environmental factor — polychlorinated biphenyls, it was shown that throughout the growing season there was an increase in the activity of SOD and peroxidase enzymes: for SOD at the flowering stage by 10 times with a small «jump» in activity under the primary action of PCBs (0.0005 mg / l) compared to the control. In the case of peroxidase, at the minimum concentration of PCBs in sprouts, an increase of 1.6 times was noted, however, during vegetation, a decrease of 10 times was noted, during the flowering period — 15 times. Thus, for the enzyme's superoxide dismutase and catalase of shepherd's purse, the phenomenon of «paradoxical dependence «dose-effect»» was established under the influence of PCBs in a minimum concentration (0.0005 mg / l) at the MAC level. The nature of the change in peroxidase activity under the minimum (stimulating) and maximum (inhibiting) effects of PCBs in a short period of time, made it possible to assume the probable existence of a peroxidase isoform in shepherd's purse that is resistant to the action of environmental toxicants of organic nature and promotes the adaptation of the plant to changing environmental conditions with the growth of anthropogenic impact on natural ecotopes and phytocenoses.

Keywords: environmental factors, model ecosystem, phytocenoses, catalase, peroxidase, superoxide dismutase, shepherd's purse, polychlorinated biphenyls, ecotoxikants, ecotopes.

Аннотация. Статья является результатом исследования роли экологических факторов химической природы в рамках модельной экосистемы по оценке влияния полихлорированных бифенилов на уровень активности антиоксидантных ферментов — супероксиддисмутазы, каталазы и пероксидазы пастушьей сумки обыкновенной (*Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik) как растения с коротким периодом вегетации. Материалом исследования являлись проростки, развившиеся листовые пластинки, цветы и формирующиеся семена. Активность супероксиддисмутазы определяли прямой спектрофотометрией, пероксидазы — фотоэлектроколориметрически, каталазы — перманганатометрией. В ответ на действие экологического фактора — полихлорированных бифенилов, показано, что на протяжении всего периода вегетации наблюдался рост активности ферментов СОД и пероксидазы: для СОД на этапе цветения в 10 раз с небольшим «скачком» активности при первичном действии ПХБ (0,0005 мг/л) в сравнении с контролем. В случае пероксидазы при минимальной концентрации ПХБ в проростках отмечен рост в 1,6 раза, однако при вегетации отмечено снижение показателя в 10 раз, в период цветения в 15 раз. Таким образом, для ферментов супероксиддисмутазы и каталазы пастушьей сумки обыкновенной установлено явление «парадоксальной зависимости «доза-эффект»» при воздействии ПХБ в минимальной концентрации (0,0005 мг/л) на уровне ПДК. Характер изменения пероксидазной активности при минимальном (стимулирующем) и максимальном (ингибирующем) воздействии ПХБ в короткий период времени, позволил предположить вероятное существование у пастушьей сумки обыкновенной изоформы пероксидазы, устойчивой к действию экологических токсикантов органической природы и способствующей адаптации растения к меняющимся экологическим условиям при росте антропогенного влияния на природные экотопы и фитоценозы.

Ключевые слова: экологические факторы, модельная экосистема, фитоценозы, каталаза, пероксидаза, супероксиддисмутазы, пастушья сумка обыкновенная, полихлорированные бифенилы, экотоксиканты, экотопы.

Актуальность

Наземные растения, формирующие фитоценозы в природных экосистемах, в условиях усиливающегося антропогенного воздействия на природные ландшафты, являются достаточно уязвимой группой живых организмов для влияния токсикантов различного происхождения. Особенно чувствительны высшие фотосинтезирующие растения к пыле-дымовым мелкодисперсным компонентам смогов, которые периодически покрывают лесные, луговые массивы по линии перемещения главенствующих воздушных масс и расположенные на пути основных направлений ветра [3, с. 44; 8, с. 264]. Также растительные организмы чувствительны к влиянию токсинов органической природы. Которые поступают преимущественно через почвенные горизонты из размытых терриконов, складированных отходов промышленности и твердых или жидких бытовых отходов. Опасность органических загрязняющих компонентов заключается в ряде особенностей их химической и биологической природы [10, с. 49]. Среди параметров следует выделить повышенное сродство к билипидному слою мембран клеток, в частности, растений, так как они относятся к прикрепленным жизненным формам и поглощают большую часть токсинов по причине неспособности к перемещению от эпицентра выброса или основного движения водных или воздушных масс, несущих загрязнитель [4, с. 890; 6, с. 214]. При этом существенно то, что в случае растений увеличивается время контакта среды, несущей токсины, со значительной площадью поверхности организма. Происходит усиление проникновения ксенобиотика и аккумуляция в нем [5, с. 145]. Особо выраженный токсический эффект в данных случаях оказывают органические соединения, обладающие подвижными, химически активными группами, содержащими анионы хлора (Cl⁻), гидроксогруппы (-OH), пероксидные радикалы (ROO) [11, с. 418]. К первой группе, включающие хлор, относятся полихлорированные бифенилы, содержащие атомы хлора в положениях 2, 4, 6 бензольных колец. Влияние подобных соединений чаще всего отражается на состоянии фотосинтезирующего аппарата растений [1, с. 42]. Приводит их к кислородному голоданию с одной стороны и нарушению функций антиоксидантных ферментативных систем с другой [9, с. 125]. Так как в подобных случаях активные центры основных антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы, каталазы и пероксидазы, подвергаясь влиянию ПХБ, меняют конформацию апофермента (белковой части) и теряют способность связывать и обезвреживать активные радикалы кислорода и перекиси.

Пастушья сумка обыкновенная — растение с коротким периодом вегетации и цветения, продолжительность жизни от всходов семян до их созревания составляет около 1–1,5 месяцев. Однако семена быстро созревают и способны к всходам в том же году, что позволяет ре-

гистрировать залповые выбросы токсикантов на ключевых стадиях развития растения. Пастушья сумка также источник биологически активных соединений, содержит филлохинон (витамин K₁), флавоноиды, сесквилангеновые и фенольные гликозиды, дубильные вещества, рамногликозид гиссолина, биогенные амины (холин, ацетилхолин), тирамин, инозит, соли калия (в золе до 40 %), в летучей фракции — пальмитиновая (284,54 мг/100г), линолевая (157,14 мг/100 г) кислоты. Пастушья сумка относится к фармакопейным видам, группе К-витаминное, гемостатическое средство, представляет большой интерес для клинической и фармацевтической практики как калий содержащее растение. В связи с достаточно широкой распространенностью, значением для экологии, медицины и фармации, экологической толерантностью пастушья сумки обыкновенной в условиях техногенного воздействия на природные фитоценозы, представилось актуальным исследовать активность супероксиддисмутазы, каталазы и пероксидазы пастушья сумки обыкновенной (*Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik) в условиях влияния экотоксикантов — полихлорированных бифенилов в модельной экосистеме.

Материалы и методы исследования

Материал исследования — 3–4-дневные проростки, неповрежденные развившиеся листовые пластинки во время вегетации, цветки и молодые семена пастушья сумки обыкновенной. Растения выращивались в контейнерах с почвой, предназначенной для цветочных культур в течение двух месяцев. В течение этого времени с определенной периодичностью (проростки, вегетация и цветение) растения подвергались воздействию раствора «Совол» (смесь полихлорированных бифенилов) в концентрациях 0,0005 мг/л, 0,001 мг/л, 0,0012 мг/л — полив однократно. Контрольные образцы растений поливали отстоянной водопроводной водой.

Активность супероксиддисмутазы определяли методом, основанном на способности СОД ингибировать аутоокисление адреналина в адренохром щелочной среде. Процент ингибирования вычисляли по формуле:

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

Где А — активность фермента, %;

Е_к — экстинкция контроля;

Е_о — экстинкция опыта.

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

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

К — количество KMnO_4 , пошедшего на титрование в контроле, мл;

О — 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. 120].

Фотоэлектроколориметрический метод определения активности 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 (50–100 мг) растирали в ступке с водой, переносили в мерную колбу на 25 мл и доводили дистиллированной водой до метки. Растительную вытяжку настаивали в течение 5–10 мин, затем центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об./мин. Надосадочную жидкость использовали для определения пероксидазной активности. Для определения активности фермента брали две кюветы толщиной 1 см. По контрольной кювете устанавливали ноль прибора, предварительно заполнив ее 2 мл бензидина, 2 мл фильтрата и 2 мл воды. Во вторую опытную кювету вливали 2 мл бензидина, 2 мл фильтрата и 2 мл 0,3 %-ного раствора перекиси водорода, при этом сильная струя перекиси перемешивала содержимое кюветы. Добавление перекиси служило стартом 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:

$$A = \frac{D \times E}{t \times d}$$

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) [2, с. 677].

Результаты и обсуждение

В результате анализа установлено, что активность СОД растет по мере роста пастушьей сумки и к моменту цветения увеличивается от 0,24 % в 2,4 раза, т.е. в 10 раз (рис. 1). Небольшой скачок активности СОД в 1,4 раза зафиксирован при первичном воздействии ПХБ (0,0005 мг/л), далее при повышении концентраций ПХБ шло снижение активности, однако в целом уровень её оставался высоким. Пастушья сумка обыкновенная (*Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik) — растение с коротким периодом вегетации. В связи с этим обменные процессы протекают от всходов до цветения всего в течение около 1–1,5 месяцев и активность основных групп ферментов возрастает значительно к периоду цветения. В случае СОД пастушьей сумки рассмотрение линий тренда четко отражает динамику изменения активности фермента. Наиболее выраженная и стабильная активность СОД по линии тренда видна в период вегетации. Линейный характер графика в данном случае наиболее надежный, поскольку величина достоверности аппроксимации находится близко к 1 (0,7591) — происходит рост активности фермента так как протекает активный фотосинтез, сопровождающийся выделением значительных

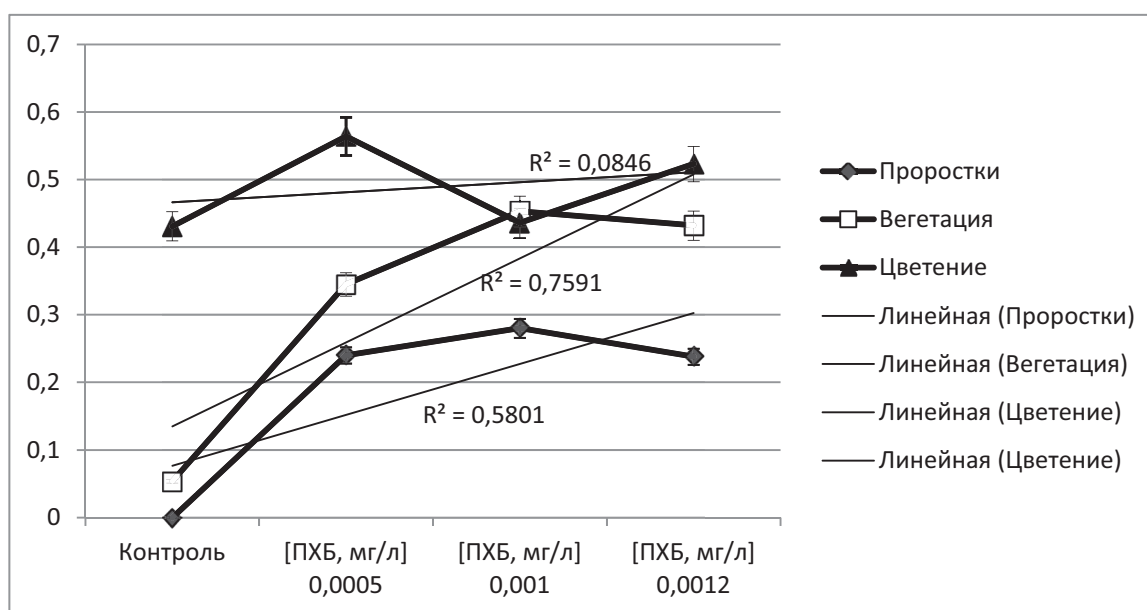


Рис. 1. Активность супероксиддисмутазы (ед. А, %) пастушьей сумки обыкновенной (*Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik)

количеств молекулярного кислорода и, соответственно, неизбежным образованием супероксидного анион-радикала $\cdot\text{O}_2^-$. Таким образом, процессы эти ведут к росту концентрации субстрата для СОД — в ответ увеличивается количество и активность продуцируемого фермента.

На этапе проростков устойчивая тенденция к росту активности СОД — линия тренда линейно растет, но менее выражено, чем во время вегетации (рис. 1): величина аппроксимации в целом стремится к 1 (0,5801). Для периода цветения стабильно высокий устойчивый уровень СОД в сравнении с остальными периодами подтверждается малой величиной аппроксимации отличной от 1 (0,0846).

Характер динамики активности каталазы пастушьей сумки обыкновенной отличался во все периоды опреде-

лений: показатель снижался в сравнении с контролем. В фазе проростков в 1,6 раза, на стадии вегетации и цветения в 1,7 раза (рис. 2).

В отношении пероксидазы (рис. 3) пастушьей сумки во все три этапа исследования отмечено устойчивое резкое повышение активности фермента при минимальной концентрации ПХБ в проростках в 1,6 раза, при вегетации снижение показателя в 10 раз, в период цветения в 15 раз.

«Встреча» растения с токсикантами впервые вызывает активацию защитных механизмов и ферменты в растениях с коротким периодом вегетации синтезируются значительно быстрее, чем у растений с длинным периодом наращивания фотосинтезирующей массы. В этом случае, по-видимому, есть основания предполагать

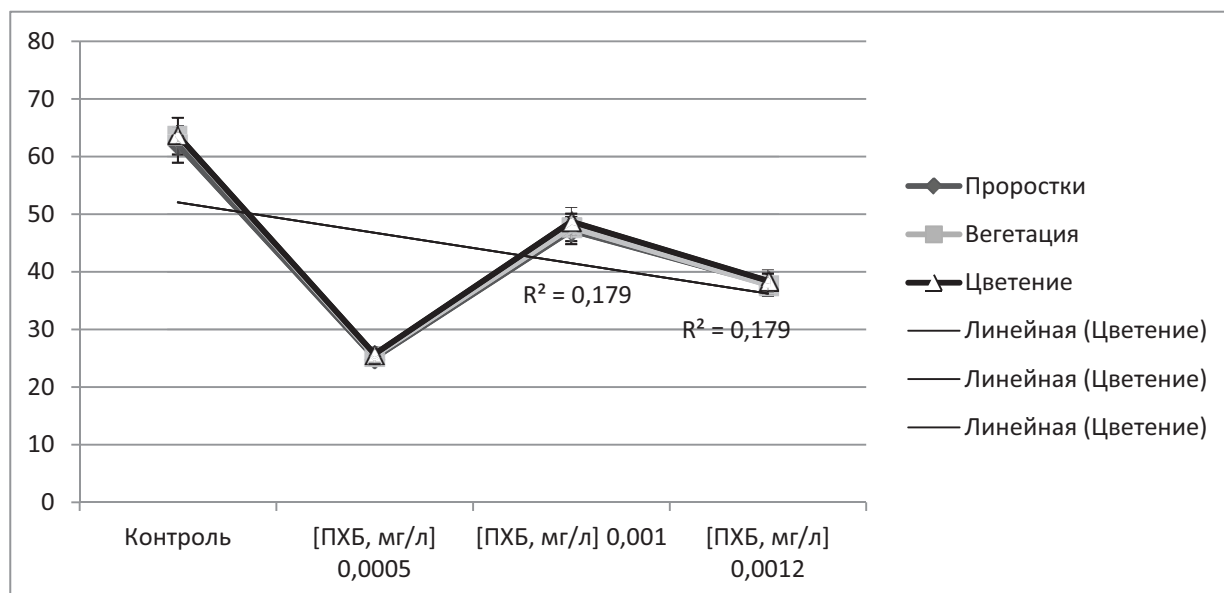


Рис. 2. Активность каталазы (мл O_2 / гхмин) пастушьей сумки обыкновенной (*Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik)

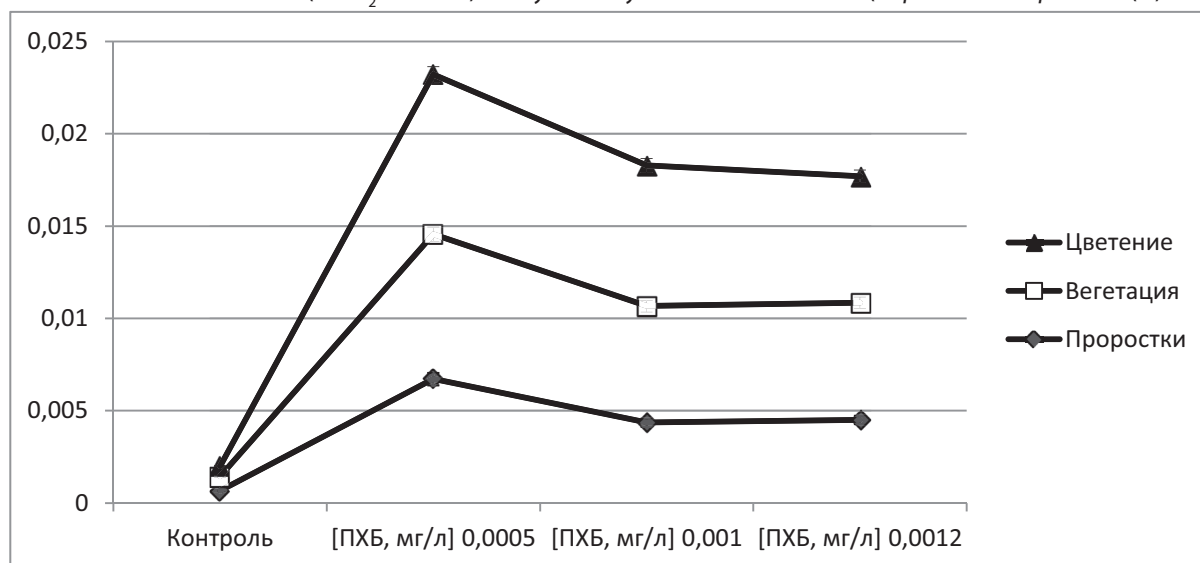


Рис. 3. Активность пероксидазы (ΔD_{670} / гхс) пастушьей сумки обыкновенной (*Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik)

большую чувствительность и реакционно способность ферментов из семейства пероксидаз в организме растений с меньшим периодом вегетации и ранним сроком созревания семян. В целом активность пероксидазы пастушьей сумки варьировала в пределах от 0,00056 до 0,00864 $\Delta D_{670}/\text{гхс}$ во время цветения. Значительное варьирование показателя активности, когда минимальные и максимальные значения находятся в пределах одного возраста растения, указывает на высокую чувствительность и выраженное реагирование ферментной системы растений на токсиканты органической природы в данном случае — полихлорированные бифенилы в условиях повышения антропогенного воздействия на фитоценозы через загрязнения верхних горизонтов экотопов органическими экотоксикантами.

Заключение

Таким образом, в ходе исследования воздействия экологических факторов химической природы на растения в модельной экосистеме, получены следующие результаты:

1. Установлена неодинаковая реакция группы защитных антиоксидантных ферментов — супероксиддисмутазы, каталазы и пероксидазы пастушьей сумки обыкновенной на минимальные концентрации органических эко токсикантов ПХБ (0,0005 мг/л) на уровне ПДК для вод водно-питьевого и культурно-бытового водопользования;

2. Для ферментов супероксиддисмутазы и пероксидазы пастушьей сумки обыкновенной зафиксировано явление «парадоксальной зависимости «доза-эффект»» при воздействии ПХБ в минимальной концентрации (0,0005 мг/л) на уровне ПДК, что может отражать динамику экологической адаптации вида при изменении параметров среды обитания;
3. Наибольшая чувствительность, проявляющаяся быстрой реакцией к действию ПХБ даже на уровне минимальной концентрации эко токсиканта, показана в модельной экосистеме для пастушьей сумки обыкновенной как растения с коротким периодом вегетации (группа эфемеры);
4. В ответ на действие выраженного эко токсиканта характер изменения пероксидазной активности при минимальном (стимулирующем) и максимальном (ингибирующем) воздействии полихлорированных бифенилов в короткий период инкубации, позволил предположить вероятное существование у пастушьей сумки обыкновенной изоформы пероксидазы, более устойчивой к действию токсикантов органической природы. Появление подобной изоформы могло быть вызвано, вероятно, усиливающимся антропогенным воздействием на природные фитоценозы в составе экосистем и способствовало повышению адаптации пастушьей сумки к существованию в среде обитания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антонова Е.В. Временная изменчивость реакций растений в условиях хронического облучения: возможные подходы к оценке адаптации к абиотическому стрессу / Е.В. Антонова, Н.С. Шмалкина, В.Н. Позолотина // Траектория исследований — человек, природа, технологии. — 2022. — №1 (1) — С. 39–53.
2. Емельянов В.В. Активность каталазы и пероксидазы в растениях пшеницы и риса в условиях аноксии и постаноксической азирации / В.В. Емельянов, В.В. Ласточкин, Е.Г. Приказюк [и др.] // Физиология растений. — 2022. — Т. 69. — № 6. — С. 675–690
3. Жусупова Г.Е. Антиоксидантная активность некоторых препаратов, полученных на основе растений Казахстана / Г.Е. Жусупова, Т.М. Шалахметова, М.К. Мурзахметова [и др.] // Вестник Новосибирского государственного педагогического университета. — 2013. — № 5(15) — С. 43–65
4. Иванова К.А. Антиоксидантная система защиты в симбиотических клубеньках бобовых растений / К.А. Иванова, В.Е. Цыганов // Сельскохозяйственная биология. — 2017. — Т. 52. — № 5 — С. 878–894.
5. Игнатенко А.А. Участие антиоксидантной системы в регуляции холодоустойчивости растений пшеницы и огурца салициловой кислотой и метилжасмонатом / А.А. Игнатенко — дисс. на соискание ученой степени канд. биол. наук. — Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН. — Санкт-Петербург, 2019. — 324 с.
6. Никерова К.М. Определение активности супероксиддисмутазы и полифенолоксидазы в древесине *Betula pendula* var. *Carelica* (*Betulaceae*) при разной степени нарушения ксилогенеза / К.М. Никерова, Н.А. Галибина, Ю.Л. Мощенская [и др.] // Растительные ресурсы. — 2019. — Т. 55. — № 2 — С. 213–230.
7. Никерова К.М. Участие каталазы и пероксидазы в процессах ксилогенеза у карельской березы / К.М. Никерова, Н.А. Галибина, Ю.Л. Мощенская [и др.] // Лесоведение. — 2019. — № 2. — С. 115–127.
8. Смагина Е.А. Результаты определения основных групп биологически активных веществ в листьях шиповника собачьего / Е.А. Смагина, Н.Н. Вдовенко-Мартынова // Беликовские чтения: материалы VI Всероссийской научно-практической конференции. — 2018. — С. 264–267
9. Станишевская И.Е. Контроль качества лекарственного сырья и фитопрепаратов валерианы лекарственной (*VALERIANA OFFICINALIS* L.) И.Е. Станишевская, А.И. Марахова, М.Ю. Грязнов [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. — 2015. — № 1(10) — С. 122–128
10. Филькин С.Ю. Использование рекомбинантных белков в современной пищевой биотехнологии: обзор предметного поля / С.Ю. Филькин, А.В. Липкин, А.Н. Федоров // Пищевая метаинженерия. — 2024. — Т. 2. — № 2 — С. 48–74.
11. Шкляревский М.А. Вовлечение нитратредуктазы и оксида азота в реализацию стресс-протекторного действия донора монооксида углерода на проростки пшеницы при гипертермии / М.А. Шкляревский, Ю.Е. Колупаев, Ю.В. Карпец [и др.] // Физиология растений. — 2021. — Т. 68. — № 4. — С. 412–420.

© Осинкина Татьяна Владимировна (osinkina12@mail.ru)

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»