

РОЛЬ ФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ РАСТЕНИЙ В БИОТРАНСФОРМАЦИИ АТРАЗИНА, ПРОПАЗИНА И СИМАЗИНА

Бозшатаева Г.Т., Оспанова Г.С., Турабаева Г.К., Мынбаева Р.О.

*Южно-Казахстанский государственный университет им. М.Ауэзова, Шымкент,
e-mail: gulzat_1976@mail.ru*

В статье приведены результаты исследования по изучению возможного биохимического механизма растительной биотрансформации триазинов в мутагены. Используя ингибиторы и индукторы растительной пероксидазы и цитохромов, показано, что мутагенная активация исследованных триазинов не протекает по пероксидазному механизму, а осуществляется в ходе микросомального окисления. Это продемонстрировано в экспериментах с использованием гомогенатов из обработанных индукторами растений.

Ключевые слова: биотрансформация, растительные промутагены, микросомальные монооксигеназы.

OF PLANT ENZYME SYSTEM ROLE IN BIOTRANSFORMATION OF PROMUTAGEN EQUIPMENT PROPASIN, ATRASIN AND SYMASIN

Bozhataeva G.T., Ospanova G.S., Turabaeva G.K., Minbaeva R.O.

South Kazakhstan State University from M.Auezov, Shymkent, e-mail: gulzat_1976@mail.ru

In article results of research on studying of the possible biochemical mechanism of vegetable biotransformation of triazines are given to mutagens. Using inhibitors and inducers of a vegetable peroxidase and cytochromes, it is shown that mutagen activation of the studied triazines doesn't proceed on the peroksidazny mechanism, and is carried out during a mikrosomalny okiseniye. It is shown in experiments with use homogenates from the plants processed by inducers.

Keywords: biotransformation, plants promutagens, microsomal monooxygenase.

Введение

Среди различных классов химических соединений, применяемых в современном сельском хозяйстве и лесоводстве, наиболее отрицательным сопутствующим действием обладают пестициды [2].

К настоящему времени накоплен значительный фактический материал, показывающий, что многие пестициды действуют непосредственно на наследственные структуры, вызывая их стойкие изменения, мутации [3].

Триазиновые гербициды используются в сельскохозяйственной практике для защиты зерновых, овощных культур и виноградников от сорных растений. Они весьма разнообразны как по химической природе, так и по генотоксичности. Изучение мутагенной активности на про- и эукариотных организмах показало, что среди триазиновых гербицидов обнаруживаются прямые мутагены и промутагены, генотоксичность которых регистрируется только с помощью растительных и животных клеток.

Для определения мутагенного действия пестицидов применяют различные тест-объекты: микроорганизмы, растения, насекомые, млекопитающие. 71% изученных пестицидов проявили мутагенную активность в бактериальных тестах с метаболической активацией и без нее.

Растения непосредственно контактируют с мутагенами среды, адсорбируя их на

поверхности и подземных органах или поглощая через корни. Дальнейшая судьба ксенобиотиков зависит от направленности ферментативных превращений в клетках и тканях растений. Известно, что некоторые мутагены подвергаются активации или дезактивации.

К настоящему времени известно, что биотрансформация пестицидов в растениях может осуществляться при помощи двух разных ферментных систем – микросомальными монооксигеназами, преимущественно ферментами цитохрома P-450 и пероксидазами, осуществляющими 1-электронное окисление.

Цель исследования: изучение механизмов метаболической трансформации триазиновых гербицидов под влиянием ферментных систем растений в мутагены.

Материал и методы исследования

В работе были использованы индикаторные системы: индикаторные штаммы: *Salmonella typhimurium*: TA-98 his D3052, rfa, uvr B, pKM 101; TA 100- his G46, rfa uvr B pKM 101; семена ячменя *Hordeum vulgare* L. сорта Черниговский-5.

При выполнении работ использовались следующие методы:

1. полуколичественный метод учета генных мутации у индикаторных бактерий *S. typhimurium*. Использовали чашечный тест Эймса. Мутагенный эффект учитывался по кратности превышения числа ревертантов, индуцированных препаратами, над спонтанным фоном [4];

2. приготовление растительной активирующей смеси. Проростки ячменя выращивали в течение 5 суток в лабораторных условиях с естественной фотопериодичностью, затем растения собирали, измельчали и замораживали. Растительный материал гомогенизировали в ступке, добавляя двойной объем фосфатного буфера (рН 7,4), и центрифугировали 15 минут при режиме 9000g и температуре 2-4°C. Супернатантную жидкость отбирали и сразу использовали в опыте. В экспериментах использовали полную активирующую смесь (ПАС) и неполную активирующую смесь (НАС). В состав ПАС входили: исследуемый препарат, суспензия бактерий, растительный гомогенат и кофакторы, необходимые для работы окислительно-восстановительных ферментов. В вариантах с НАС вместо кофакторов вносили соответствующий объем растворителя – воды;

3. полуквалификационный учет генных мутации с активацией препаратов ферментными системами растений в условиях *in vivo*. Проростки растений в течение двух недель обрабатывали различными концентрациями триазиновых гербицидов, затем из этих растений готовили гомогенат и на индикаторных бактериях определяли их мутагенную активность.

Результаты исследования и их обсуждение

Об участии тех или иных ферментов, осуществляющих мутагенную активацию пестицидов, можно судить по результатам экспериментов, в которых используются ингибиторы, или наоборот, индукторы энзимов. Этот подход мы использовали для выяснения возможных биохимических особенностей активации промутагенных триазиновых гербицидов атразина, пропазина и симазина.

В качестве ингибитора пероксидаз использовали диэтилдитиокарбамат (ДЭДК), а ингибитора цитохромного комплекса – метирапон. Микросомными индукторами служили – совол, фенобарбитал и 2,4-дихлорусная кислота (2,4-Д).

Растворами ДЭДК в концентрации 100, 250 и 500 мМ обрабатывали растения ячменя в течение всего времени их роста. Из обработанных проростков готовили микросомальные супернатанты, в которых определяли активность пероксидазы. ДЭДК в дозе 500 мМ почти полностью подавлял пероксидазную активность, поэтому в экспериментах по определению роли пероксидазы в мутагенной активации триазинов использовали гомогенаты растений, обработанные ДЭДК в концентрации 250мМ, в которых активность пероксидазы снижалась на 50-70%.

Активирующую способность гомогенатов оценивали по уровню мутагенного эффекта, индуцированного пропазином, симазинном и атразином у индикаторного штамма *S.typhimurium* TA98. В экспериментах использованием ДЭДК не наблюдалось статистически значимого снижения регистри-

руемого эффекта, что свидетельствует о несущественной роли пероксидазы в мутагенной активации триазиновых гербицидов.

Другим ферментом, принимающим участие в метаболизме ксенобиотиков в растениях, является цитохром P-450. Для выявления роли микросомальных монооксигеназ в мутагенной активации триазинов приведены три варианта экспериментов. Во-первых, определяли участие кофакторов в метаболической активации триазинов, что служит косвенным указанием на участие этой системы микросомального окисления трансформации триазинов. Во-вторых, изучали влияние ингибиторов и индукторов монооксигеназ на активность цитохромов P-450 в гомогенатах ячменя в условиях *in vivo* и *in vitro*. В третьих, исследовали влияние индукторов и ингибиторов микросом на трансформацию промутагену в мутагены.

Для активации триазинов наличие кофакторов в активирующей смеси является существенным – в этом случае число ревертантов, индуцированных пропазином в 2,1-2,5, симазинном в 1,9-2,5, атразином в 1,7-2,1 раза выше, чем в вариантах с неполной активирующей смесью. Влияние кофакторов, обеспечивающих более эффективное функционирование системы микросомального окисления на мутагенную активацию триазинов, косвенно указывает на участие этой системы в их трансформации в мутагены.

Для подтверждения этого предположения провели эксперименты с индукторами и ингибиторами микросомальных монооксигеназ. В качестве маркерной реакции на активность цитохрома P-450 у растений использовали реакцию гидроксирования коричной кислоты, которую измеряли по изменению интенсивности окраски.

Метирапон, являясь эффективным ингибитором растительных цитохромов P-450, в дозе 25мМ на 40% и дозе 50мМ, на 70% снижал уровень активности цитохромов в гомогенатах растений. Из индукторов цитохрома P-450 наиболее эффективное действие оказывал 2,4 Д, коэффициент индукции в дозе 200мМ составлял 3,2.

Из обработанных индукторами и ингибиторами (метирапон – 50мМ, совол – 100мМ, фенобарбитал, 2,4Д – 200мМ) гомогенатов растений готовили микросомальные супернатанты с целью выявления их роли в активации триазинов (таблица).

Метирапон почти полностью подавлял активацию атразина, симазина и пропазина. Наблюдалось снижение мутагенной активности пропазина в 5-5,6, симазина в 6-7, атразина в 4-6 раза по сравнению с контролем. Увеличение микросомальной активности растительных гомогенатов приводило

Влияние индукторов и ингибиторов
на растительную активацию пропазина, атразина и симазина

Препарат	Концентрация мг/мл	Количество ревертантов на чашку					
		-S9	+S9	S9			
				совол	Фенобарбитал	2,4Д	Метирапон
Пропазин	10	32±1,6	390±21,0	452±26,0	610±35,0	1716±100,0	70±3,9
	1	23±1,2	312±18,0	390±22,0	446±27,0	23±1,2	58±3,5
	0,1	17±0,9	170±10,0	231±14,0	351±21,0	17±0,9	34±1,8
	контроль	21±1,0	26±1,3	32±1,8	36±1,9	21±1,0	30±1,6
Атразин	10	24±1,3	172±11,0	361±20,0	550±33,0	600±40,0	43±2,2
	1	18±0,9	146±8,3	310±18,0	503±27,0	510±31,0	30±1,6
	0,1	17±1,0	131±7,7	225±13,0	390±23,0	415±24,0	22±1,1
	контроль	17±0,9	22±1,2	21±1,0	36±1,9	30±1,6	20±1,0
Симазин	10	26±1,5	212±11,0	394±23,0	482±29,0	623±38,0	30±1,6
	1	21±1,1	165±8,7	341±19,0	395±23,0	609±35,0	27±1,5
	0,1	19±1,1	145±8,8	236±13,0	260±15,0	500±31,0	24±1,4
	контроль	17±1,0	22±1,2	30±1,6	32±1,7	32±1,6	20±1,0

соответственно к возрастанию мутагенного эффекта всех трех препаратов. Наиболее эффективным микросомальным индуктором оказался 2,4Д, мутагенная активность пропазина – активированного гомогенатом, индуцированным 2,4Д в 4,4, атразина в 4, симазина в 4,1 раза превосходила таковую без индукции.

Известно, что трансформация пестицидов в растениях осуществляется как микросомальными монооксигеназами, преимущественно ферментами цитохрома Р-450, вызывающими гидроксирование, эпоксидирование и дезалкилирование, так и 1-электронным окислением, индуцируемым пероксидазой.

Нами впервые изучен возможный биохимический механизм растительной биотрансформации триазинов в мутагены. Используя ингибиторы и индукторы растительной пероксидазы и цитохромов, нам удалось показать, что мутагенная активация исследованных триазинов не протекает по пероксидазному механизму, а осуществляется в ходе микросомального окисления. Это особенно наглядно продемонстрировано в экспериментах с использованием гомогенатов из обработанных индукторами растений [1].

Для индуцирования растительных микросом используются различные агенты Fe³⁺, Mn²⁺ ионы, свет, гербициды, этанол, инкубирование в воде. Нами впервые была предпринята попытка индуцировать микросомы с помощью фенобарбитала, совола и 2,4Д, обычно применяемые для индукции микросом печени. Наибольшее усиление

мутагенного эффекта триазинов отмечено в присутствии фракции S9 ячменя, предварительно обработанного 2,4 Д, что коррелирует с увеличением активности цитохрома Р-450 в растениях, обработанных индукторами. Это позволяет рекомендовать 2,4 Д в качестве наиболее эффективного индуктора растительных микросомальных монооксигеназ.

Выводы

По результатам проведенных исследований были сделаны следующие выводы:

1. Ингибитор пероксидазы ДЭДК не влияет или слабо влияет на мутагенную активность триазинов, т.е. пероксидазы не играют существенной роли в биотрансформации промутагенных триазинов;
2. В биотрансформации промутагенов в мутагены участвуют микросомальные монооксигеназы.

Список литературы

1. Бозшатаева Г.Т., Савицкая И.С., Мухитдинов А.С., Шигаева М.Х. Метаболическая активация триазиновых гербицидов гомогенатами растений // Вестник КазГУ. Сер. биол. – 2003. – №4. – С.78-81.
2. Ваганов П.А. Как рассчитать риск угрозы здоровью из-за загрязнения окружающей среды: задачи с решениями. – СПб.: Изд-во СПбГУ, 2012. – 128с.
3. Кесельман М.Л. Свободнорадикальные механизмы пестицидной интоксикации в эколого-гигиенических исследованиях. – М., 2007. – 298 с.
4. Фонштейн Л.М., Калинина Л.М., Полухина Г.Н., Абилов С.К., Шапиро А.А. Тест-система оценки загрязнителей среды на *S. Typhimurium*: методическое указание. – М.: ВИНТИ, 1997. – 52 с.