

УДК 577.1.01

Демина А.А., Конин Д.Н.

*Российский химико-технологический университет
им. Д.И. Менделеева*

**ВЛИЯНИЕ ГАЛОГЕНООРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ
НА АКТИВНОСТЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ
ФЕРМЕНТОВ ПЕЧЕНИ БИОФИЛЬТРАТОРОВ
*VIVIPARUS VIVIPARUS L.***

A. Demina, D. Konin

D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia

**EFFECT OF ORGANOHALOGEN COMPOUNDS ON ACTIVITY
OF PROTEOLYTIC LIVER ENZYMES OF THE MOLLUSKS
*VIVIPARUS VIVIPARUS L.***

Аннотация. Данная работа посвящена изучению набора протеолитических ферментов моллюсков *Viviparus Viviparus L.* Исследовано воздействие хлорбензола, бромбензола и йодбензола с концентрацией в 1 ПДК и 10 ПДК на протяжении 24, 48 и 72 ч. на протеолитическую активность в печени моллюсков. Полученные данные указывают на высокую токсичность изученных соединений. Наибольшую токсичность из исследованных веществ оказал хлорбензол.

Ключевые слова: протеолитические ферменты, моллюски, хлорбензол, бромбензол, йодбензол.

Abstract. We consider a set of proteolytic enzymes of the mollusks *Viviparus Viviparus L.* We study the influence of chlorobenzene, bromobenzene and iodobenzene with a concentration of 1 MPC and 10 MPC for 24, 48 and 72 h on the proteolytic activity in the liver of the mollusks. The data received indicate the high toxicity of the compounds studied. Chlorobenzene is found to have the highest toxicity of all tested substances.

Key words: proteolytic enzymes, mollusks, chlorobenzene, bromobenzene, iodobenzene.

В настоящее время уделяется значительное внимание биохимическому тестированию воздействия различных экотоксикантов на живые организмы. Одним из наиболее перспективных приемов индикации загрязнения является изучение реакции на него протеолитических ферментов, как инструментов протеолиза [2, 3, 4]. В последние годы был проведен ряд экспериментальных работ, в которых установлено, что моллюски представляют собой весьма перспективный тест-объект изучения воздействия различных групп токсикантов (галогенорганических соединений, фенольных соединений, ионов тяжелых металлов и пр.) на ферментные системы гидробионтов, что может быть использовано для оценки уровня загрязнений водной среды [1, 5]. В тоже время ферменты белкового обмена у гидробионтов недостаточно изучены. Мы продолжили исследование в этом направлении, и основной целью данной работы стала характеристика изменения суммарной протеолитической активности ферментов живородки речной *Viviparus viviparus* под воздействием хлорбензола, бромбензола и йодбензола при различном значении ПДК и времени экспозиции.

© Демина А.А., Конин Д.Н., 2011.

Работа выполнена в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы,

Государственный контракт № 14.740.11.0959.

Материалы и методы исследования

Моллюсков собирали в экологически чистой зоне – Учинское водохранилище (Московская область, дер. Тишково) и проводили акклимацию их в аквариуме с постоянной аэрацией в течение 14 суток. Моллюсков помещали в сосуды с различными значениями ПДК (1 ПДК и 10 ПДК) исследуемых токсикантов на 24, 48 и 72 часа. Затем у моллюсков (группами по 5 особей) извлекали гепатопанкреас (печень) методом вивисекции, брали навески массой 1 г и экстрагировали белки 0,15 М раствором NaCl. Экстракты центрифугировали при 8000g при 4°C в течение 40 мин. и полученные супернатанты использовали для дальнейших исследований. Протеолитическую активность определяли по методу Куница, модифицированному для ферментов моллюсков [6]. Субстратом служил 1%-ный раствор гемоглобина

в дистиллированной воде. Для определения активности 0,3 мл белкового экстракта инкубировали с 0,05 мл раствора субстрата, 0,1 мл дистиллированной воды и 0,55 мл 0,05 М фосфатно-цитратного буфера (pH=3,2) в течение 1 ч. при 37°C. Реакцию останавливали 0,5 мл холодного 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Пробы помещали на 20 мин в холодильник для формирования осадка, который отделяли центрифугированием при 8000g в течение 15 мин. Измерение оптической плотности полученных супернатантов проводили на спектрофотометре при 750 нм против контроля, в который белковый экстракт вносили после раствора трихлоруксусной кислоты. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое вызывает увеличение оптической плотности на 1 единицу при 750 нм в 1 час. Удельную активность рассчитывается в единицах активности на 1 мг белка, определяемого по методу Лоури.

Таблица 1

Влияние хлорбензола, бромбензола и йодбензола на активность протеаз в печени моллюсков (экспозиция 24, 48 и 72 ч.).

Токсикант 24 ч.	1 ПДК		10 ПДК	
	Удельная активность, единиц/мг белка 10 ¹	% к контр.	Удельная активность, единиц/мг белка 10 ¹	% к контролю
Контроль	6,8±0,21	-	3,18±0,11	-
C ₆ H ₅ Cl	8,24±0,09	+21,17	2,73±0,23	-14,15
C ₆ H ₅ Br	8,78±0,04	+29,11	2,63±0,08	-17,29
C ₆ H ₅ I	8,84±0,31	+30,00	2,54±0,19	-20,12
Токсикант 48 ч.	1 ПДК		10 ПДК	
	Удельная активность, единиц/мг белка 10 ¹	% к контролю	Удельная активность, единиц/мг белка 10 ¹	% к контролю
Контроль	5,33±0,11	-	5,14±0,06	-
C ₆ H ₅ Cl	6,77±0,13	+27,01	2,92±0,09	-43,19
C ₆ H ₅ Br	7,36±0,17	+38,08	2,57±0,19	-50,00
C ₆ H ₅ I	7,46±0,2	+39,96	1,59±0,11	-69,06
Токсикант 72 ч.	1 ПДК		10 ПДК	
	Удельная активность, единиц/мг белка 10 ¹	% к контролю	Удельная активность, единиц/мг белка 10 ¹	% к контролю
контроль	5,57±0,20	-	2,81±0,31	-
C ₆ H ₅ Cl	1,94±0,07	-65,17	0,30±0,07	-89,32
C ₆ H ₅ Br	2,73±0,25	-50,98	0,11±0,18	-96,08
C ₆ H ₅ I	3,17±0,29	-43,08	0,05±0,24	-98,22

Результаты и их обсуждение

Проведенные эксперименты показали, что при низких концентрациях токсинов (1 ПДК) активность ферментов возрастала на 21-30% к 24 ч. и 27-40% к 48 ч., что, вероятно, связано с процессом адаптации организмов к изменяющимся условиям окружающей среды. Более продолжительное воздействие повлекло резкое снижение активности протеолитических ферментов на 43-65%, подтверждая неспособность ферментной системы моллюсков приспособиться к данным токсикантам. При более высоких концентрациях (10 ПДК) мы наблюдали снижение активности протеаз на этапе 24 ч. экспозиции на 14-17%, на более поздних этапах экспозиции активность продолжала снижаться на 94-98% по отношению к контролю.

Полученные данные представлены в табл. 1.

Полученные данные свидетельствуют о высокой чувствительности протеаз к токсичному воздействию галогенорганических соединений. При низких концентрациях токсикантов (1 ПДК) происходит увеличение активности ферментов, что вероятно связано с попыткой адаптироваться к изменениям в окружающей среде, поскольку количество белка в пробах контроль-опыт существенно не изменяются. Подобная картина наблюдается у всех токсикантов на отрезке от 1 ч. к 24 ч. экспозиции. Резкое падение протеолитичес-

кой активности в интервале от 48 ч до 72 ч. в последующем приводит к гибели моллюсков, особенно в случае воздействия хлорбензола, как наиболее токсичного в исследуемой группе, поскольку хлорированные ароматические системы являются наиболее активными токсикантами в исследуемой группе.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Коничев А.С., Попов А.П., Цветков И.Л., Филков П.В. Ферменты как биохимические маркеры загрязнения воды // Приложение к вестнику МГОУ. Серия «Естественные науки: география, экология, экономика: актуальные проблемы науки и образования. 2005. С. 151-153.
2. Конин Д.Н. Влияние фенола на протеолитическую активность в печени моллюсков *Viviparus viviparus* L. // Актуальные проблемы биоэкологии. Сборник материалов Международной научно-практической конференции. 2008. М.: МГОУ. С. 61.
3. Конин Д.Н. Влияние ингибиторов на протеолитические ферменты печени моллюсков *Viviparus viviparus* L. // Вестник МГОУ. Серия «Естественные науки». 2010. № 1. С. 33-35.
4. Конин Д.Н., Коничев А.С. Влияние ионов тяжелых металлов на протеолитическую активность в печени моллюсков *Viviparus viviparus* L. // Вестник МГОУ. Серия «Естественные науки». 2007. № 1. С. 3-6.
5. Цветков И.Л., Коничев А.С. Экологическая биохимия гидробионтов. М.: МГОУ, 2006. 105 с.
6. Ярыгин Д.В. Изучение комплекса протеолитических ферментов и их белковых ингибиторов в грене тутового шелкопряда: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. М., 2000.