

**А. Н. Мисюра, А. А. Марченковская**  
**ХАРАКТЕРИСТИКА СОДЕРЖАНИЯ ФЕРМЕНТОВ МИКРОСОМАЛЬНОЙ**  
**ФРАКЦИИ БЕЛКОВ ПЕЧЕНИ ЦИТОХРОМОВ P450 И B5 АМФИБИЙ**  
**ИЗ БИОТОПОВ С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ АНТРОПОГЕННОГО ВЛИЯНИЯ**

*НИИ биологии Днепропетровского национального университета;  
49050, г. Днепропетровск, пр. Гагарина, 72; e-mail: murchik1966@mail.ru*

**Мисюра А. Н., Марченковская А. А. Характеристика содержания ферментов микросомальной фракции белков печени цитохромов P450 и B5 амфибий из биотопов с различным уровнем антропогенного влияния.** – Было проведено исследование содержания ферментов микросомальной фракции белков печени амфибий из биотопов с различной антропогенной нагрузкой. Наиболее высокий уровень содержания цитохромов P450 и B5 определен у животных из биотопов зоны поступления сточных вод, что показывает существование у них определенного уровня адаптации к влиянию ксенобиотиков.

*Ключевые слова:* цитохромы P450 и B5, микросомальная фракция белков печени, амфибии, биотопы, антропогенное влияние.

### **Введение**

Живые организмы находятся в постоянном контакте с химическими факторами окружающей среды, подавляющее большинство которых может быть объединено тем, что они не являются участниками нормально протекающих биохимических реакций в клетках. Список этих химических веществ, называемых ксенобиотиками или поллютантами, огромен. Развитие цивилизации вообще и химических наук в частности предполагает, что число их будет увеличиваться [1].

Проблема "химической деятельности человечества и охрана природы" огромна и многогранна. Среди множества аспектов и вопросов есть и очевидные (такие как отравление рек промышленными отходами) и сложные по своей сущности (широкое и почти бесконтрольное применение в сельском хозяйстве минеральных удобрений и пестицидов). Существуют сугубо научные проблемы, намного превосходящие современные знания человека (например, повсеместное применение антибиотиков), имеют место проблемы, очевидные по цели и решенные наукой, но не нашедшие еще должного применения в практике (такие как фармакологические средства адаптации человека в трудных и экстремальных условиях). Проникая в организм через пищеварительный тракт, легкие, кожу, слизистые оболочки, чужеродные вещества и продукты их превращений преодолевают ряд клеточных (мембранных) барьеров, прежде чем оказываются в том или ином органе и ткани.

Чужеродные вещества биотрансформируются в печени, желудочно-кишечном тракте, легких, почках, жировой ткани, но, в основном, все реакции протекают в печени, точнее в микросомальной фракции её белков. Именно в клетках печени, в их эндоплазматическом ретикулуме локализуется большинство ферментов, катализирующих превращение чужеродных веществ. Трудно переоценить исследования биохимической системы, взаимодействие которой с ксенобиотиками имеет решающее значение для жизнедеятельности клеток. Она представляет собой комплекс ферментов, локализованных в эндоплазматическом ретикулуме и названа микросомной монооксигеназой. Основной ее компонент Т-гемопротейд цитохром P450, а также участвующий в процессе детоксикации цитохром B5. Цитохром P450 – фермент, связывающий и метаболизирующий десятки (если не сотни) неполярных химических соединений, которые применяются в фармакологии, сельском хозяйстве, в различных отраслях химической промышленности, составляющие главную токсикологическую опасность для воздушного бассейна промышленных центров и водных экосистем. Такой перечень свидетельствует о том, что цитохром P450 зачастую является первым барьером, определяющим характер и степень воздействия химических веществ на клетку. Поэтому природа функционирования этого фермента в микросомальной монооксигеназной системе представляет основу для понимания многих аспектов токсикологии и в том числе и экологической токсикологии. Многие химические вещества, будучи инертными в виде исходной молекулы, метаболизируются цитохромом P450 с

образованием реакционно способных производных, вступающих в ковалентные связи с белками и нуклеиновыми кислотами.

Феномен токсификации ряда ксенобиотиков с участием цитохрома P450 стал одним из основных моментов в современных теориях химического канцеро- и мутагенеза.

Специфичность действия ферментов – важнейшее биологическое явление, без которого невозможен упорядоченный обмен в живой природе, а, следовательно, и сама жизнь [2].

### **Материал и методы исследований**

Материал для данной работы собирался в течение 1998-2007 гг. в различных по степени антропо-техногенного влияния биогеоценозах Приднепровского региона. Для исследований отбирались амфибии разных видов из биотопов Днепровско-Орельского заповедника (ДОПЗ): озерная лягушка (*Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771); краснобрюхая жерлянка (*Bombina bombina* Linnaeus, 1761); остромордая лягушка (*Rana arvalis* Nilsson, 1842); обыкновенная чесночница (*Pelobates fuscus* Laurenti, 1768); обыкновенная квакша (*Hyla arborea* Linnaeus, 1758), а также особи озерной лягушки из различных биотопов по степени антропо-техногенного влияния – Днепровско-Орельский природный заповедник, биотопы р. Орель, канал "Днепр-Донбасс", биотопы Диевских плавней, биотопы зоны загрязнения.

В биотопах ДОПЗ и зоны поступления сточных вод предприятий химической и металлургической промышленности анализировалось содержание ферментов микросомальной фракции белка P450 и B5 у особей разного пола.

У отловленных особей производился общебиологический анализ. Определялись размерные показатели амфибий с точностью до 0,01 см, масса тела с точностью до 0,001 г и возраст амфибий по стандартной методике [3].

Для определения содержания ферментов P450 и B5 микросомальной фракции белка печени отбиралась печень амфибий. Из тканей печени путем предварительной перфузии устранялась кровь охлаждением 0,25 М сахарозой с последующей гомогенизацией в гомогенизаторе Поттера-Эльвейма с помощью тефлонового пестика со скоростью вращения 1000-2000 об/мин.

Выделение общей микросомальной фракции производилось методом низкоскоростного центрифугирования. Полученный гомогенат центрифугировался при 10000 д. К надосадочной жидкости добавлялись 8 мМ CaCl<sub>2</sub> и 5 мМ MgCl. Агрегированные микросомы собрали центрифугированием при 1500 д в течение 10 мин. Полученные препараты обладают нормальным уровнем активности детоксицирующих ферментов цитохромов P450 и B5 [4].

Надосадочную жидкость сливали и готовили раствор микросомального белка в фосфатном буфере (10 мМ, рН 7,4).

Для определения цитохромов P450 и B5 в полученном растворе микросомального белка использовался метод Омуро и Сато [5]. Дальнейшее спектрофотометрическое определение цитохромов производилось на двухлучевом спектрофотометре "Спекорд М-40" фирмы Карл Цейс Йена (Германия) [6].

Раствор микросомального белка тщательно перемешивался и равномерно разливался в две кюветы спектрофотометра и прописывалась нулевая линия. Затем в одну из кювет добавлялось 0,5-1,0 мг дитионита натрия, регистрировался спектр цитохрома B5 при оптической плотности 426-409 нм. После этого такое же количество дитионита натрия добавлялось во вторую кювету. В течение 1-2 мин. через первую кювету продувался СО, полученный реакцией муравьиной кислоты с пирогаллолом, очищенный раствором пирогаллола. Затем регистрировался спектр цитохрома P450 при различной оптической плотности 450-500 нм.

### **Результаты и обсуждение**

Анализ содержания указанных выше цитохромов в печени различных видов амфибий из биотопов Днепровско-Орельского заповедника показал (табл. 1), что их уровень наиболее

высок в микросомальной фракции белка печени у обыкновенной чесночницы, где его содержание составляет 2,6 для цитохрома P450 и 0,69 для цитохрома B5.

По степени снижения цитохромов P450 и B5 исследуемые виды амфибий можно расположить в следующем порядке: обыкновенная чесночница, озерная лягушка, краснобрюхая жерлянка, остромордая лягушка обыкновенная квакша. Низкое содержание цитохромов P450 и B5 можно отметить у амфибий, ведущих наземный образ жизни – остромордой лягушки и обыкновенной квакши, связанные с водной средой только в период размножения, а в остальное время находящиеся на поверхности почвы и травянистой растительности, а также связанных с внешней средой в процессе дыхания и через объекты питания. Высокий уровень показателей уровня микросомальных ферментов P450 и B5 в печени обыкновенной чесночницы объясняется тесной связью особей этого вида амфибий со средой обитания – почвой, где животные проводят примерно половину времени своего существования, а также в период размножения с водной средой, в процессе питания через объекты питания, в процессе дыхания с атмосферным воздухом и его составляющими, в число которых могут входить и ксенобиотики, поступающие из отходов промышленных предприятий.

Таблица 1

**Характеристика содержания ферментов микросомальной фракции печени цитохромов P450 и B5 у различных видов амфибий из биотопов Днепроовско-Орельского природного заповедника**

(нмоль/мл белка)

Озерная лягушка		Краснобрюхая жерлянка		Остромордая лягушка		Обыкновенная чесночница		Обыкновенная квакша	
P450	B5	P450	B5	P450	B5	P450	B5	P450	B5
0,50 ± 0,14	0,36 ± 0,08	0,38 ± 0,11	0,17 ± 0,04	0,22 ± 0,06	0,18 ± 0,05	2,6 ± 0,36	0,69 ± 0,19	0,22 ± 0,09	0,12 ± 0,03

Из полученных данных видно, что наиболее низкие показатели содержания ферментов микросомальной фракции белка печени P450 и B5 имеют такие виды амфибий, как обыкновенная квакша и остромордая лягушка, у которых содержание цитохрома P450 находится на одном уровне, в то время как содержание цитохрома B5 у обыкновенной квакши ниже, чем у остромордой лягушки в 1,5 раза. За этими двумя видами амфибий по степени повышения уровня содержания цитохромов стоит краснобрюхая жерлянка, озерная лягушка и обыкновенная чесночница, содержание цитохромов P450 и B5 у которой в 11,8 и 5,8 раз выше по сравнению с обыкновенной квакшей. Содержание цитохромов P450 и B5 у озерной лягушки выше, чем у обыкновенной квакши в 2,3 и 3,0 раз. Содержание цитохромов у краснобрюхой жерлянки выше по сравнению с их уровнем у обыкновенной квакши в 36 и 1,4 раз для P450 и B5 соответственно.

Поскольку озерная лягушка обитает во всех исследуемых биотопах, можно провести сравнительный анализ уровня содержания этих ферментов в органах и тканях данного вида амфибий из всех мест обитания (табл. 2).

Динамика изменения содержания ферментов микросомальной фракции печени цитохромов P450 и B5 у особей озерной лягушки из биотопов с различным уровнем антропогенного влияния показывает, что их уровень наиболее низок у животных из биотопов ДОПЗ и составляет 0,50 и 0,3 н/моль г для цитохромов P450 и B5, соответственно, в дальнейшем увеличиваясь крайне незначительно у амфибий из биотопов р. Орель, биотопов Диевских плавней и достигает максимальных величин у животных из биотопов зоны поступления сточных вод предприятий химической и металлургической промышленности г. Днепродзержинска (табл. 2).

**Характеристика содержания ферментов микросомальной фракции белков печени  
озерной лягушки из различных по степени загрязнения  
антропо-техногенного воздействия мест обитания**

(нмоль/мл белка)

ДОПЗ		Биотопы р. Орель		Биотопы канала Днепр-Донбасс		Биотопы Диевских плавней		Биотопы зоны загрязнения	
P450	B5	P450	B5	P450	B5	P450	B5	P450	B5
0,5 ± 0,13	0,36 ± 0,08	0,55 ± 0,14	0,42 ± 0,11	0,62 ± 0,17	0,54 ± 0,15	0,72 ± 0,19	0,63 ± 0,16	1,61 ± 0,42	0,83 ± 0,24

Анализ содержания цитохромов P450 и B5 у особей озерной лягушки разного пола из двух контрастных мест обитания – биотопов ДОПЗ и биотопов зоны поступления сточных вод предприятий химической и металлургической промышленности г. Днепродзержинска показывает, что у первых содержание цитохромов P450 и B5 составляет 0,42 и 0,26 нмоль/мл белка соответственно у самок, а у самцов 0,57 и 0,45 нмоль/мл белка, что, очевидно, связано с более высоким уровнем метаболизма у животных этого пола из биотопов ДОПЗ. У амфибий из биотопов зоны поступления промышленных сточных вод содержание цитохромов P450 и B5 у самок находится на уровне 1,51 и 1,31 нмоль/мл белка; у самцов составляет 1,70 и 1,61 нмоль/мл белка соответственно по сравнению с амфибиями из биотопов ДОПЗ (табл. 3).

**Характеристика половых различий озерной лягушки в показателях содержания  
ферментов микросомальной фракции печени цитохромов P450 и B5**

(нмоль/мл белка)

Место обитания	Самки		Самцы	
	P450	B5	P450	B5
Биотопы ДОПЗ	0,42 ± 0,1	0,26 ± 0,07	0,57 ± 0,14	0,45 ± 0,12
Биотопы сточных вод	1,51 ± 0,29	1,31 ± 0,18	1,70 ± 0,33	1,61 ± 0,31

Как видно из полученных результатов, увеличение содержания ферментов микросомальной фракции печени цитохромов P450 и B5 у амфибий из биотопов зоны загрязнения увеличено в 3,6 и 5,0 раз соответственно у самок и в 3,0 и 3,6 раз соответственно у самцов.

**Выводы**

Высокий уровень содержания цитохромов P450 и B5 у животных из биотопов зоны поступления сточных вод показывает существование у них определенного уровня адаптации к влиянию ксенобиотиков, что способствует их детоксикации в организме особей озерной лягушки.

Некоторое повышение уровня микросомальных ферментов P450 и B5 у амфибий из биотопов поймы р. Орель и биотопов, прилегающих к каналу "Днепр-Донбасс", по сравнению с животными из биотопов ДОПЗ, очевидно, связано с поступлением ксенобиотиков из агроценозов в виде ядохимикатов и пестицидов, а также увеличение количества чужеродных соединений, поступающих с урбанизированных территорий в водную среду из атмосферы в виде осадков – дождя и снега, с талыми водами и пылью, а также отходами от проезжающего транспорта.

## Список литературы

1. Ермаков В. В. Биогеохимическая эволюция таксонов биосферы в условиях техногенеза // Тр. биогеохим. лаб. "Техногенез и биогеохимическая эволюция таксонов биосферы". – М.: Наука, 2003. – Т. 24. – С. 5-23.

2. Кржечковская В. В. Мембрансвязанный цитохром В5, роль цитохрома В5 в регуляции активности изоформ цитохрома Р450 // Мембраны. Сер. Критические технологии. – 2005. – № 2 (26). – С. 10-22.

3. Клейненберг Е. С., Смирин Э. М. К методике определения возраста амфибий // Зоол. журн. – 1969. – Т. 48, вып. 7. – С. 1070-1094.

4. Котелевцев С. В., Стволинский С. Л., Бейм А. М. Эколого-токсикологический анализ на основе биологических мембран. – М.: Изд-во МГУ, 1986. – 106 с.

5. Omura T., Sato R., Cooper D. Y., Rosenthal O., Estabrook R. W. Function of cytochrome P-450 of mikrosomes // Fed. Proc. – 1965. – V. 24, N 8. – P. 1181-1189.

6. *Лабораторные методы исследований в клинике* / Под ред. В. В. Миньшикова. – М.: Медицина, 1987. – С. 215-219, 234-235.

**Місюра А. М., Марченковська О. О. Характеристика вмісту ферментів мікросомальної фракції білків печінки цитохромів Р450 і В5 амфібій із біотопів з різним рівнем антропогенного навантаження.** – Було проведено дослідження вмісту ферментів мікросомальної фракції білків печінки амфібій із біотопів з різним антропогенним навантаженням. Найвищий рівень вмісту цитохромів Р450 і В5 визначено у тварин із біотопів зони надходження стічних вод, що показує існування у них певного рівня адаптації до впливу ксенобіотиків.

*Ключові слова:* цитохроми Р450 і В5, мікросомальна фракція білків печінки, амфібії, біотопи, антропогенний вплив.

**Misyura A. M., Marchenkovskaya A. A. Description of maintenance of enzymes of mikrosomes fraction of albumens of hepatica of cytochromes of P450 and B5 of amphibians from biotops with the different level of the anthropogenic influencing.** – Research of maintenance of enzymes of microsomal fraction of albumens of hepatica of amphibians from biotops with the different anthropogenic loading was conducted. The most high level of maintenance of cytochroms P450 and B5 is certain from animals from biotops of area of receipt sewages, that shows existence for them of certain level of adaptation to influencing of ksenobiotics.

*Key words:* cytochroms of P450 and B5, mikrosomes fraction of albumens of liver, amphibians, biotops, anthropogenic influencing.