

УДК 581.6:614.777:574.635

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФОРМЫ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ НАЯДЫ МЕЛКОЗУБЧАТОЙ В МОДЕЛЬНЫХ ГИДРОЭКОСИСТЕМАХ

© 2014 Г.С. Быкова, И.Ф. Шаталаев, А.В. Воронин

Самарский государственный медицинский университет

Поступила в редакцию 29.04.2014

В работе представлены данные о структурной организации и активности молекулярных форм малатдегидрогеназы (МДГ) наяды мелкозубчатой (*Najas microdon*) в модельных образцах сточных вод, загрязненных фенолом и пирокатехином. Рассмотрена возможность использования динамики активности МДГ наяды мелкозубчатой в мониторинге гидроэкосистем.

Ключевые слова: водный макрофит, очистка воды, фенол, пирокатехин, малатдегидрогеназа

В настоящее время распространенными загрязнителями водных объектов окружающей среды становятся лекарственные вещества. Основные источники – загрязненные воды химико-фармацевтических предприятий, бытовые стоки, а также стоки животноводческих комплексов. В числе лекарственных препаратов, наиболее часто упоминающихся в научных публикациях, антибиотики, анальгетики, регуляторы липидного обмена, антибактериальные и стероидные препараты. Их избыточные количества в воде отрицательно сказываются на деятельности различных систем организма [1, 2]. Лекарственные вещества в составе загрязненных вод поступают на очистные сооружения, как в неизменной, так и в метаболизированной формах. Технологическая вода фармацевтических производств может содержать не только сами лекарственные вещества, но и исходные вещества, и полупродукты органического синтеза. Фенолы и их производные являются одними из ключевых компонентов сточных вод фармацевтических предприятий и относятся к высокоопасным веществам. В технологии синтеза лекарственных препаратов широко представлены одноатомные и многоатомные фенолы, нафтолы и их производные (салициловая кислота, *n*- и *m*-аминофенолы и др.). Так, из салициловой кислоты получают ацетилсалициловую кислоту, которая сегодня используется в количествах больших, чем любое другое лекарственное средство. В медицинской практике в качестве лекарственных субстанций применяются фенол, тимол, резорцин [3].

В настоящее время наряду с традиционными методами биологической очистки для доочистки загрязненных вод используются высшие водные

растения. В литературных источниках отмечают перспективы использования для этой цели фитомассы наяды мелкозубчатой (*Najas microdon*), которая относится к числу полностью погруженных водных макрофитов [4]. Для оценки функционального и физиологического состояния биологического объекта в ряде случаев используют показатели активности и структурной организации тех или иных ферментов метаболизма. Одним из ключевых ферментов цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) является малатдегидрогеназа (МДГ, L-малат: НАД-оксидо-редуктаза; К.Ф.1.1.1.37). МДГ катализирует окисление (дегидрирование) яблочной кислоты (L-малата) до щавелевоуксусной (оксалоацетата) в присутствии кофактора НАД⁺ [5]. Данные об изменении состава и активности фермента позволяют судить о скорости функционирования цикла Кребса и могут служить характеристикой функционального состояния водного макрофита, применяемого для очистки загрязненных вод.

Цель работы: исследовать структурные особенности и динамику относительной активности молекулярных форм МДГ наяды мелкозубчатой в процессе очистки модельных образцов загрязненных вод с различным содержанием фенола и пирокатехина.

Материал и методы. В модельных исследованиях использовали фитомассу наяды мелкозубчатой (*Najas microdon*), культивируемой в лабораторных условиях. После удаления фоновых загрязнений наяду мелкозубчатую помещали в водные растворы фенола или пирокатехина с концентрациями 10, 30 и 50 мг/л из расчета 5,0 г фитомассы на 1 л раствора. Отбор проб растительной массы проводили в течение нескольких суток с интервалом 24 часа. В качестве контроля использовали фитомассу наяды без инкубации в растворах фенола и пирокатехина.

Ферментные образцы получали следующим образом: фитомассу наяды промывали дистиллированной водой для удаления фоновых загрязнений, удаляли избытки влаги с помощью бумажного фильтра, взвешивали 0,3 г фитомассы, дезинтегрировали в фарфоровой ступке с 0,5 мл охлажденного до 4 С 1/15 М фосфатного буфера рН 7,2 в

Быкова Галина Сергеевна, старший преподаватель кафедры химии фармацевтического факультета. E-mail: galina_bp@bk.ru

Шаталаев Иван Федорович, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой химии фармацевтического факультета. E-mail: shatalaev@list.ru

Воронин Александр Васильевич, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры химии фармацевтического факультета. E-mail: dimmu2000@mail.ru

течение 5 мин. Дезинтеграт количественно перенесли в колбу, добавляли 2,5 мл 1/15 М фосфатного буфера pH 7,2 и тритон X100 в конечной концентрации 20 мг/мл. Колбу помещали на магнитную мешалку для солюбилизации фермента на 1 час. Гомогенат центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 мин. Полученные образцы хранили в замороженном виде не более 6 суток. В супернатанте определяли молекулярные формы МДГ методом электрофореза в плоских блоках 7,5% полиакриламидного геля. Анализируемые образцы смешивали с 40% раствором сахарозы в соотношении 2:1; 0,5 мл полученной смеси наносили на линию старта. В качестве электродного буфера использовали 1 М трис-ЭДТА-боратный буфер с pH 9,2. Электрофорез проводили в течение первого получаса при величине тока 5,0 мА/см, а затем 10 мА/см на одну кювету с гелем до момента окончания электрофореза.

Выявление молекулярных форм МДГ проводили с помощью феназинметасульфат-тетразолиевой реакции. Инкубационная среда: НАД водный раствор (1 мг/мл) – 30,0 мл; нитросиний тетразолиевый водный раствор (1 мг/мл) – 22,2 мл; натрия малат водный раствор (1М) pH 7,0 – 21,0 мл;

феназинметасульфат водный раствор (1 мг/мл) – 5,1 мл; 0,2 М трис-HCl буфер pH 7,1 – 21,0 мл; вода дистиллированная – 70,2 мл. Гелевые блоки заливали инкубационным раствором в чашках Петри, инкубировали при 37°C в течение 12 часов. Молекулярные формы МДГ выявлялись в виде темносиних зон. Относительную активность каждой зоны в образцах определяли методом прямой денситометрии на анализаторе фореграмм АФ-1 (ПО «Львовприбор»).

Результаты и обсуждение. В сериях экспериментов при инкубации наяды мелкозубчатой в модельных образцах загрязненных вод, содержащих фенол и пирокатехин с концентрациями 10, 30 и 50 мг/мл установлено, что МДГ выявляется в виде двух активных зон с относительной электрофоретической подвижностью 0,83 (МДГ-1) и 0,67 (МДГ-2). Основная активность фермента локализована в области МДГ-2, активность МДГ-1 менее выражена. Результаты исследования относительной активности молекулярных форм МДГ наяды мелкозубчатой в процессе изъятия фитомассой фенола и пирокатехина на различных этапах инкубации при различных концентрациях загрязнителя представлены в табл. 1 и 2.

Таблица 1. Состав и относительная активность молекулярных форм МДГ наяды мелкозубчатой, инкубированной в загрязненной фенолом воде

| Время инкубации, сутки | Относительная активность, % | | | | | |
|------------------------|-----------------------------|-------|---------|-------|---------|-------|
| | 10 мг/л | | 30 мг/л | | 50 мг/л | |
| | МДГ-1 | МДГ-2 | МДГ-1 | МДГ-2 | МДГ-1 | МДГ-2 |
| Контроль | 2,3 | 97,7 | 2,3 | 97,7 | 2,3 | 97,7 |
| 1 | 1,2 | 98,8 | 8,1 | 91,9 | 1,1 | 98,9 |
| 2 | 1,3 | 98,7 | 4,2 | 95,8 | 5,5 | 94,5 |
| 3 | 2,3 | 97,8 | 2,3 | 97,7 | 7,5 | 92,5 |
| 6 | 1,3 | 98,7 | 6,5 | 93,5 | 17,0 | 83,0 |

Таблица 2. Состав и относительная активность молекулярных форм МДГ наяды мелкозубчатой, инкубированной в загрязненной пирокатехином воде

| Время инкубации, сутки | Относительная активность, % | | | | | |
|------------------------|-----------------------------|-------|---------|-------|---------|-------|
| | 10 мг/л | | 30 мг/л | | 50 мг/л | |
| | МДГ-1 | МДГ-2 | МДГ-1 | МДГ-2 | МДГ-1 | МДГ-2 |
| Контроль | 3,8 | 96,2 | 3,8 | 96,2 | 3,8 | 96,2 |
| 1 | 1,3 | 98,7 | 4,5 | 95,5 | 4,5 | 95,5 |
| 2 | 11,3 | 88,7 | 4,0 | 96,0 | 2,6 | 97,4 |
| 3 | 9,5 | 90,5 | 1,3 | 98,7 | 12,3 | 87,7 |
| 6 | 17,3 | 82,7 | 12,8 | 87,2 | 9,5 | 90,5 |

МДГ относится к числу довольно хорошо изученных ферментов. Она представлена в клетках различных организмов в виде множественных молекулярных форм. По литературным данным у большинства исследованных объектов обнаружены две формы МДГ: митохондриальная и цитоплазматическая. Первая функционирует в рамках цикла Кребса, а вторая может играть роль челночного механизма среди субклеточных компонентов, участвовать в автотрофной фиксации CO₂ у высших растений, в кислотном метаболизме в тканях растений и других метаболических путях.

В растительных тканях МДГ найдена также в глиоксисомах, пероксисомах и микросомах [5, 6]. Поскольку изоферменты являются носителями определенных функций в метаболизме, то они могут быть факторами идентификации этих функций. В проведенных экспериментах установлена высокая чувствительность фермента к изменению концентрации и продолжительности воздействия токсиканта. При инкубации фитомассы наяды мелкозубчатой в модельных образцах загрязненных вод с концентрацией фенола 10 мг/мл наблюдали минимальную активность МДГ-1 по сравнению с МДГ-

2 в течение всех шести суток, за исключением третьих суток, когда был отмечен небольшой подъем активности МДГ-1 до уровня таковой в контрольном образце. При концентрации фенола 30 мг/мл наблюдали более, чем трехкратное увеличение активности МДГ-1 в первые сутки по сравнению с контрольным опытом, затем плавное снижение до контрольной к третьим суткам и рост таковой к шестому дню эксперимента до уровня, превышающего контрольный в 3 раза. При экспонировании фитомассы наяды в модельных образцах загрязненных вод с концентрацией фенола 50 мг/мл отмечен стабильный рост относительной активности МДГ-1 до максимального значения, превышающего на шестые сутки более чем в семь раз относительную активность МДГ-1 контрольного образца.

Инкубация в модельных образцах загрязненных вод с содержанием пирокатехина 10 мг/мл, более токсичного для фитомассы наяды, чем одноатомный фенол, привело к увеличению относительной активности МДГ-1 с минимального значения в первые сутки до пятикратного увеличения по сравнению с контролем на шестой день эксперимента. При повышении содержания пирокатехина до 30 и 50 мг/мл наблюдали увеличение активности МДГ-1 уже в первые сутки, при этом максимум активности установлен на шестой день при 30 мг/мл и на третий день – при 50 мг/мл.

Выводы:

1. Получены данные о структурной организации, степени гетерогенности и активности МДГ наяды мелкозубчатой (*Najas microdon*) в модельных образцах сточных вод. МДГ наяды мелкозубчатой представлена в виде двух молекулярных форм – МДГ-1 и МДГ-2. Увеличение активности

молекулярных форм МДГ в процессе очистки вод, содержащих фенол и пирокатехин, указывает на мобилизацию цикла Кребса в ключевом фрагменте.

2. Установлена высокая чувствительность фермента к действию токсикантов. Результаты исследования могут быть положены в основу методов оценки физиологического, функционального состояния водного макрофита и биомониторинга гидроэкосистем.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. *Watkinson, A.J.* The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water / *A.J. Watkinson, E.J. Murby, D.W. Kolpin, S.D. Costanzo* // *Sci. Total Environ.: An International Journal for Scientific Research into the Environment and its Relationship with Man.* 2009. 407, №8. С. 2711-2723.
2. *Gobel, A.* Occurrence and sorption behavior of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in activated sludge treatment / *A. Gobel, A. Thomsen, C.S. Mcardell et al.* // *Environ. Sci. and Technol.* 2005. V. 39, №11. P. 3981-3989.
3. *Вартанян, Р.С.* Синтез основных лекарственных средств. – М.: Медицинское информационное агентство, 2004. 845 с.
4. *Быкова, Г.С.* Водный макрофит наяда мелкозубчатая в доочистке сточных вод / *Г.С. Быкова, И.Ф. Шаталаев, А.В. Воронин* // *Известия СНЦ РАН.* Т. 13. №1(8). С. 2048-2052.
5. *Диксон, М.* Ферменты / *М. Диксон, Э. Уэбб.* – М.: Мир, 1982. 1120 с.
6. *Юдина, Р.С.* Генетика и фенотипика малатдегидрогеназы растений // *Вестник ВОГиС.* 2010. Т. 14, № 2. С. 243-254.

MOLECULAR FORMS OF THE *NAJAS MICRODON* MALATE DEHYDROGENASE IN THE MODEL HYDROECOSYSTEMS

© 2014 G.S. Bykova, I.F. Shatalayev, A.V. Voronin

Samara State Medical University

In work data on structural organization and activity of *Najas microdon* malate dehydrogenase (MDG) molecular forms in model exemplars of sewage polluted by phenol and pyrocatechol are submitted. Possibility of use the dynamics of *Najas microdon* MDG activity in monitoring of hydroecosystems is considered.

Key words: *water macrophyte, water purification, phenol, pyrocatechol, malate dehydrogenase*

Galina Bykova, Senior Teacher at the Chemistry Department at Pharmaceutical Faculty. E-mail: galina_bp@bk.ru

Ivan Shatalayev, Doctor of Biology, Professor, Head of the Chemistry Department at Pharmaceutical Faculty. E-mail: shatalayev@list.ru

Alexander Voronin, Candidate of Pharmacy, Associate Professor at the Chemistry Department at Pharmaceutical Faculty. E-mail: dimmu2000@mail.ru