

Н. Ж. КАДЫРОВА¹, Г. А. ИСМАГУЛОВА², Ш. К. МУРУМБАЕВА², О. М. БЛОХИНА²

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА БЕЛКОВ ПОПУЛЯЦИЙ РАСТЕНИЙ СЕМИПАЛАТИНСКОГО ИСПЫТАТЕЛЬНОГО ПОЛИГОНА

«¹Институт радиационной безопасности и экологии РГП НЯЦ РК, г. Курчатов, РК,

²РГП Институт молекулярной биологии и биохимии им. М. А. Айтхожина КН МОН РК, г. Алматы, РК

Исследован изоферментный состав пероксидазы и эстеразы листьев растений, произрастающих на технических площадках «Балапан» и «Дегелен» СИП с разной степенью радионуклидного загрязнения. Установлено, что активность ферментов ниже у древесных видов растений по сравнению с травянистыми. Для многолетних злаков показано наличие кислых и щелочных изоформ пероксидазы и эстеразы. Отсутствие кислых изоформ эстеразы можно использовать в качестве маркерного показателя при исследовании действия радионуклидного загрязнения на растения житняка. Наличие нейтральных и кислых форм эстеразы является показателем радионуклидного загрязнения для растений тонконога.

Проблема защиты наследственных свойств человека, животных и растений от повреждающего действия излучений является важнейшей и все еще неразрешенной задачей. Проведенные многолетние исследования позволили реально оценить опасность для человечества и биоты увеличения фона излучения, связанного с испытанием ядерного оружия [1-6].

В настоящее время доказано, что в природных популяциях животных и растений, испытывающих воздействие хронической радиации, наблюдается генетическая нестабильность, которая проявляется в виде изменений многих показателей [7-9].

Изучение последствий аварии Чернобыльской АЭС выявили нарушения процессов морфогенеза и роста вегетативных органов в различных фазах онтогенеза у сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris L.*) и ели обыкновенной (*Picea abies L.*), радиочувствительность которой была выше, чем у сосны [10, 11].

Исследования растений, произрастающих в условиях радионуклидного загрязнения суходольных и пойменных экосистем Уральского региона, показали, что биологическая доступность радионуклидов в почве этого региона зависела как от вида растений, так и от свойств радионуклидов. Кроме того, установлено, что корневые системы разных растений обладают неодинаковой способностью поглощать один и тот же радионуклид из одной и той же почвы [12, 13].

Как известно, более опасным по удельному вкладу является взаимодействие ионизирующей радиации с живыми системами, при котором повреждение биологических структур происходит за счет очень реакционно-способных химических агентов. Одним из основных активных химических групп, количество которых значительно увеличивается при действии радиации, являются свободные радикалы кислорода и H_2O_2 . Благодаря высокой химической активности, эти соединения легко вступают в реакции с основными биологическими макромолекулами, нарушая их структуру и функции. Нормально функционирующие живые системы обладают эффективными средствами защиты от свободных радикалов, в качестве таковых могут выступать окислительные ферменты – пероксидаза, эстераза и фосфатазы. Они присутствуют во многих живых тканях, но действуют эти ферменты по-разному [9, 14-16].

Исследования влияния различных физических и биологических стрессовых факторов, сопровождающиеся активацией адаптационных свойств у популяций растений и животных, обитающих в зоне повышенного радиоактивного фона, в том числе на территории Семипалатинского испытательного полигона (СИП), важны для определения точных механизмов действия радиации на клеточном и молекулярном уровнях.

Объекты исследований. Объектами исследований служили растения типчак, житняк, тонконог, шиповник, береза, сосна, ковыль, тростник и полынь, собранные на тестовых участках технических площадок «Балапан» (Б) и «Дегелен» (Д) с разной степенью радионуклидного загрязнения: высокий (I), средний (II), низкий (III). Контролем (IV) служили растения, произрастающие на территории за пределами полигона – в районе пос. Чайковка ВКО.

Методы исследований. Суммарный белок выделяли из замороженных растительных тканей. Навеску каждого образца в 300 мг гомогенизировали в 900 мкл буфера для экстракции следующего состава: NaAc 50 mM pH 5,5; KCl 10 mM; MgCl₂ 10 mM; CaCl₂ 2 mM и β-МЭТ 2μM. Белок экстрагировали в течение 4 час при 4°C при постоянном перемешивании. По окончании времени экстракции пробирки центрифугировали при 15 000 об/мин 30 мин и образовавшуюся надосадочную жидкость переносили в чистую пробирку и использовали для анализа изоферментного состава пероксидазы и эстеразы [17].

Изоэлектрическое фокусирование проводили в полиакриламидном геле в стеклянных пластинах размерами 9x12 см. Гель готовили на основе 30%-ного акриламида, добавляя 1% амфолинов pH 4–9 (Fluka, Германия), 4 мг персульфата аммония и 25 μл ТЕМЕД. В анодную часть геля накладывали бумажную пластину из фильтровальной бумаги Whatman, пропитанную 1M H₃PO₄. В катодную часть геля накладывали Whatman, смоченный 1M NaOH. Изоэлектрофокусирование осуществляли поэтапно: 60 мин 100В, 60 мин 200В, 60 мин 300В, 60 мин 400В на приборе Multiphor (Pharmacia, Швеция). Образцы наносили по 12 μл. После электрофокусирования пластины геля помещали в 0,05 M натрий-ацетатный буфер pH 4,5 на 30 мин. Затем переносили в 0,05 M натрий-ацетатный буфер pH 5,5 и добавляли на 100 мл натрий-ацетатного буфера 120 мг бензилина и выдерживали 20 мин.

Для проявления изоферментов пероксидазы по каплям добавляли 30% раствор перекиси водорода до появления интенсивно-окрашенных полос. Разделение изоформ эстеразы проводили в 0,1M фосфатном буфере, содержащем 100 mg Fast blue RR, 1% α-нафтил ацетат и β-нафтил ацетат. Окрашивание проводили до проявления синих полос [17, 18].

Гели визуализировали на приборе GelDoc (Bio-Rad, США).

Результаты и обсуждение. Исследование активности и изоферментного состава ферментов, участвующих в ответной реакции растения на воздействие стрессовых агентов, имеет значение для определения адаптивных свойств живых систем.

Пероксидаза обладает широким спектром действия и участвует в регулировании защитных реакций растительной клетки при действии различных стрессовых агентов. Поскольку образование активных форм кислорода, в том числе перекиси водорода считается одним из основных механизмов устойчивости растений, изменение активности пероксидаз может служить в качестве биоиндикатора развития устойчивости растения. Многочисленные исследования показали, что эстеразы придают растению устойчивость к поглощенному загрязняющему веществу или толерантность к стрессу.

На рис. 1 и 2 представлены примеры разделения изоформ пероксидазы и эстеразы, выделенных из листьев ковыля (дорожки 1–2, образцы Б, I, 15, 0, 16; Б, II, 15, 0, 29; Б, III, 15, 0, 30; К, IV, 15, 0, 24) и типчака (дорожки 5–8, образцы Д, I, 17, 0, 4; Д, II, 17, 0, 3; Д, III, 17, 0, 5; К, IV, 17, 0, 53), отобранных из тестовых участков «Балапан» и шиповника (дорожки 9–12, образцы Б, I, 10, 0, 19; Б, II, 10, 0, 20; Б, III, 10, 0, 15; К, IV, 10, 0, 28) с участка «Дегелен» в полиакриламидном геле.

В таблице приведены данные распределения изоформ исследованных ферментов, выделенных из листьев типчака, житняка, тонконога, шиповника, березы, сосны, ковыля, тростника и полыни, собранные на тестовых участках площадок «Балапан» (Б), «Дегелен» (Д) и Чайковка (К), по результатам их электрофоретического разделения.

Все исследованные образцы отличались изоферментным спектром пероксидазы и эстеразы по количественному и качественному составу, встречались как кислые, так щелочные формы.

Нами установлено, что не у всех растений действие радиационного загрязнения приводит к активному синтезу ферментов. Пероксидазная и эстеразная активность ниже у древесных растений по сравнению с травянистыми растениями.

У березы обнаружены 8 изоформ эстеразы, расположенных как в кислой (pH = 8–9), так и щелочной (pH = 4–6) зоне. В контрольном варианте выявлен только 1 бэнд изомера эстеразы с р_i = 8,0. Следует отметить, что у березы не обнаружена пероксидазная активность.

Образцы сосны не отличались разнообразием изоформ пероксидазы и эстеразы. Как в контроле, так и в образцах с участка «Дегелен» были выявлены по одной полосе в диапазоне pH = 6–7.

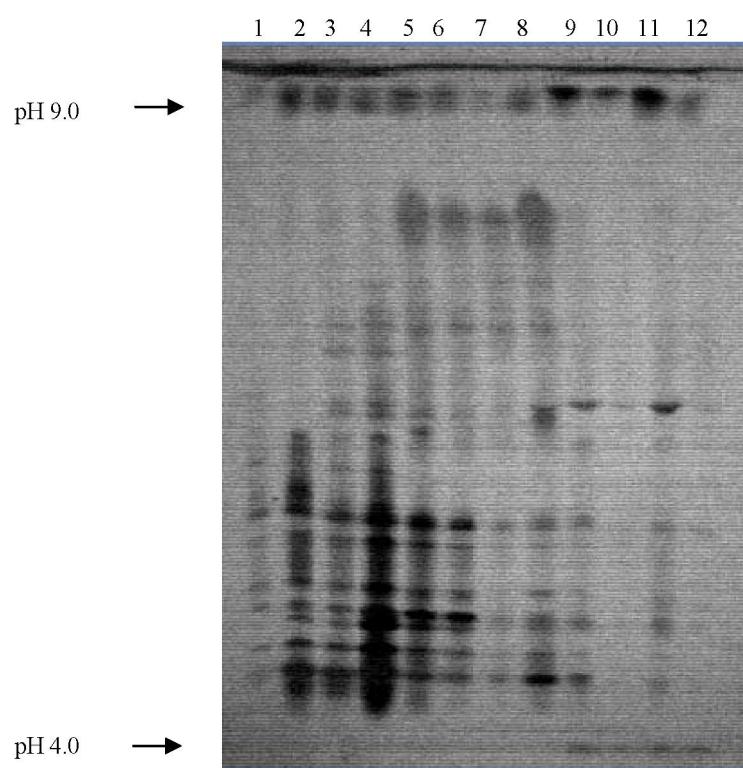


Рис. 1. Результаты изофокусирования пероксидазы из образцов растений ковыля, шиповника и типчака

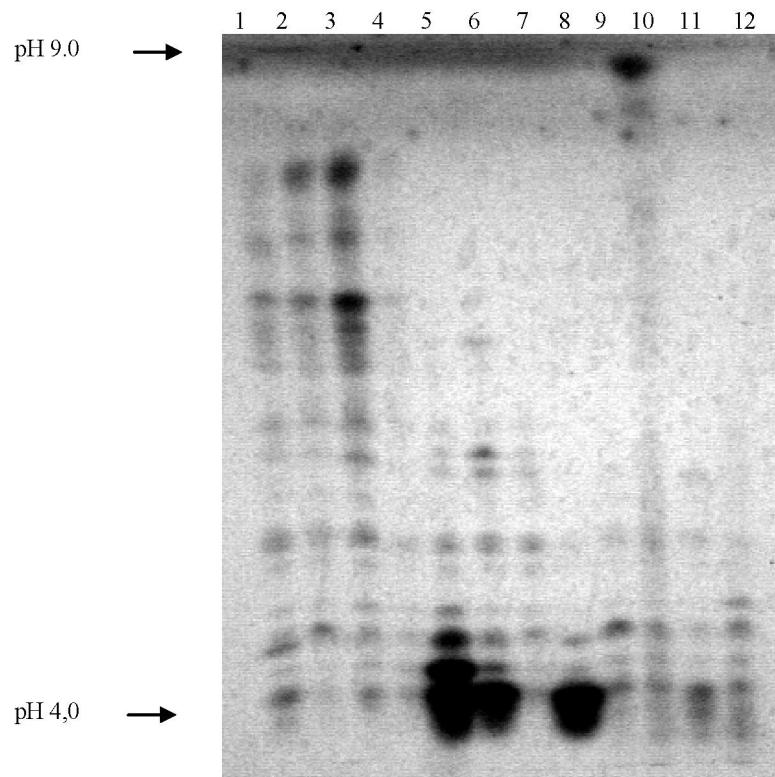


Рис. 2. Результаты изофокусирования эстеразы образцов растений

Распределение изоформ пероксидазы и эстеразы в образцах тестируемых растений

Образцы растений	Диапазон рН									
	Пероксидаза					Эстераза				
	4-5	5-6	6-7	7-8	8-9	4-5	5-6	6-7	7-8	8-9
Тростник										
Д, I, 11, 0, 17	1	2	2	—	—	4	4	—	—	—
Б, II, 11, 0, 11	—	3	3	—	—	3	2	—	—	—
Б, III, 11, 0, 21	—	1	5	—	—	2	1	—	1	—
К	—	—	3	—	—	3	—	—	1	—
Полынь										
Б I	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Б II	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Б III	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
К	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Береза										
Д, I, 14, 0, 7	—	—	—	—	—	1	—	—	—	1
Д, II, 14, 0, 6	—	—	—	—	—	1	1	—	—	1
Д, III, 14, 0, 1	—	—	—	—	—	1	1	—	—	1
К, IV, 14, 0, 52	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
Ковыль										
Б, I, 15, 0, 16	3	5	3	—	1	4	4	3	3	2
Б, II, 15, 0, 29	3	7	3	—	2	3	3	5	2	2
Б, III, 15, 0, 30	4	5	5	3	2	2	5	4	5	1
К, IV, 15, 0, 24	3	5	5	3	2	3	2	—	1	1
Шиповник										
Д, I, 17, 0, 4	3	5	5	3	2	3	4	3	1	—
Д, II, 17, 0, 3	3	5	4	4	2	3	4	3	—	—
Д, III, 17, 0, 5	2	4	3	5	2	2	5	3	—	—
К, IV, 17, 0, 53	2	4	2	4	3	4	3	1	—	—
Типчак										
Б, I, 10, 0, 19	3	2	2	1	1	4	2	—	—	—
Б, II, 10, 0, 20	1	1	1	—	1	5	2	—	—	2
Б, III, 10, 0, 15	5	4	2	1	1	4	2	2	—	1
К, IV, 10, 0, 28	1	2	1	—	2	5	3	—	—	1
Житняк										
Б, I, 16, 0, 12	3	—	3	—	—	3	5	4	—	—
Б, II, 16, 0, 24	3	3	3	—	—	4	6	3	2	1
Б, III, 16, 0, 9	1	4	3	1	—	5	6	3	2	1
К, IV, 16, 0, 25	2	1	2	1	—	4	5	1	1	1
Тонконог										
Б, I, 19, 0, 22	1	—	1	1	—	4	5	—	2	1
Б, II, 19, 0, 23	1	—	1	1	—	5	1	1	3	1
Б, III, 19, 0, 14	1	—	1	1	—	5	1	—	1	1
К, IV, 19, 0, 27	—	—	1	—	—	4	2	—	1	1
Сосна										
Д, III, 12, 0, 2	—	—	1	—	—	—	—	1	—	—
К, IV, 12, 0, 51	—	—	1	—	—	—	—	1	—	—

Разнообразие изоформ пероксидазы шиповника практически не отличалось в зависимости от уровня радионуклидного загрязнения и участка сбора образцов. Были выявлены белковые полосы по всему спектру pH. Не определены щелочные формы эстеразы в пределах pH = 8–9. Только у образца, отобранного на участке с высоким уровнем загрязнения Д, I, 17, 0, 4, отмечен изомер с $p_i = 7,45$. В контрольных вариантах шиповника количество бэндов в кислой зоне pH = 4–5 было больше, чем в других вариантах.

У образцов тростника установлены 4 пика пероксидазы со значениями p_i , равными 4,3, 5,4, 5,9 и 6,3. Причем только у тростника, собранного на участке с фоновым уровнем радионуклидного загрязнения, выявлен пик, равный 5,8. Для контроля было характерным 3 пика в нейтральной области. Изоформы эстеразы тростника распределены в зоне pH = 4–6. Слабощелочные изомеры выявлены только в контроле и в образцах тростника с низким уровнем радионуклидного загрязнения (Б, III, 11, 0, 21). Для всех опытных вариантов характерны мажорные изоформы эстеразы с $p_i = 4,2, 4,5, 4,7$ и 4,9.

Для типчака более характерными были щелочные изоформы пероксидазы с $p_i = 8,8$ и $p_i = 6,5$ и кислая фракция с изоэлектрической точкой 4,0. Хотелось бы отметить слабую пероксидазную активность в образцах со средним уровнем радионуклидного загрязнения и контроле. У типчака проявлялись по 2 щелочные мажорные изоформы эстеразы независимо от зоны сбора образцов. Контрольный вариант К, IV, 10, 0, 28 не имел изоформ в нейтральной зоне pH=6-8, в отличие от Б, I, 10, 0, 19; Б, II, 10, 0, 20 и Б, III, 10, 0, 15.

Изоферментный состав и количественное соотношение белков возрастало у образцов житняка от сильной степени радионуклидного загрязнения к слабой. Пики активности изоферментов приходились на точки, равные pH от 4,5 до 6,6. Для образца житняка Б III также были выявлены изоферменты в диапазоне от 5,0 до 5,8 (табл. 1). У житняка выявлено больше всего изоформ – 57. В контроле этого вида растения К, IV, 16, 0, 25, а также и в Б, I, 16, 0, 12 обнаружено по 12 изоформ, но в образце, собранном на участке с максимальной степенью радионуклидного загрязнения, Б, I, 16, 0, 12 нет изоформ в пределах pH = 7–9, т.е. нет кислых изоформ. В остальных вариантах Б, II, 16, 0, 24 и Б, III, 16, 0, 9 изоформы распределялись равномерно по всей высоте геля и в каждой зоне pH выявлены мажорные бэнды. Такое распределение изоформ эстеразы в контроле и на участке с высокой степенью радионуклидного загрязнения может служить маркерным показателем у житняка, произрастающего на территории СИП.

У ковыля в отличие от контроля белковые полосы распределялись по высоте геля равномерно и в каждом диапазоне pH выделялись мажорные бэнды.

Все изоформы контрольного образца тонконога К, IV, 19, 0, 27 имели щелочные изоформы в пределах pH = 4,0–6,0 в отличие от Б, I, 19, 0, 22; Б, II, 19, 0, 23; Б, III, 19, 0, 14. В этих образцах мажорные бэнды также распределялись в этом же пределе pH. Однако для Б, I, 19, 0, 22; Б, II, 19, 0, 23 и Б, III, 19, 0, 14 обнаружены нейтральные и кислые изоформы. Этот показатель также может использоваться при выявлении растений тонконога с участков разной степенью радионуклидного загрязнения территории СИП.

У образцов, отобранных из участка «Балапан», при окраске гелей проявлялось больше изоформ, чем у образцов из площадки «Дегелен». На площадке «Балапан» собраны многолетние травы, а на площадке «Дегелен» – древесные растения – береза и сосна. Как и в случае с пероксидазой, разность в количестве изоформ эстеразы может быть связана со строением этих растений и выявленное нами отсутствие пероксидазной активности у березы и сосны может также объясняться тем, что накапливание радионуклидов происходит, в основном, в корневой системе.

Ранее было показано, что более высокой степенью накопления радионуклида ^{137}Cs характеризуется корневая система по сравнению с надземными органами у дикорастущих видов растений ковыль (*Stipa capillata*), полынь (*Artemisia gracilescens*), волоснец узкий (*Leymus angustus*), таволга зверобоепистная (*Spiraea hypericifolia*) технической площадки «Дегелен» бывшего СИП. Параметры миграции радионуклида ^{137}Cs для разных видов растений были различными, что авторы связывают с анатомо-морфологическими и физиологическими особенностями растительного организма, типом корневой системы, степенью ее развития и характером распределения вторичных корней в верхнем 20 см слое почвы [19].

Проведенные нами исследования распределения изоформ пероксидазы и эстеразы в растениях типчак, житняк, тонконог, шиповник, береза, сосна, ковыль, тростник и полынь, собранных на

тестовых участках технических площадок СИП «Балапан» и «Дегелен» с разной степенью радионуклидного загрязнения показали, что не у всех растений действие радиационного загрязнения приводит к активному синтезу пероксидазы и эстеразы. Активность ферментов ниже у древесных видов растений по сравнению с травянистыми растениями. Об этом свидетельствуют исследования изоферментного состава бересклета и сосны. Из всех древесных видов изоформы пероксидазы и эстеразы выявлены только у шиповника. Все виды многолетних злаков показали наличие изоферментов пероксидазы и эстеразы как щелочной, так и кислой.

Отсутствие кислых изоформ эстеразы можно использовать в качестве маркерного показателя при исследовании действия радионуклидного загрязнения на растения житняка. Для тонконога, наоборот, наличие нейтральных и кислых форм эстеразы является показателем радионуклидного загрязнения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Проект МНТЦ К-465 «Комплексное обследование современными методами дозиметрии жителей региона Семипалатинского полигона» // Отчет. – Курчатов, 2002. – Фонды ИРБЭ НЯЦ РК.
2. Проект НАТО SST CL6975934 «Реконструкция индивидуальных доз, полученных населением, проживающих вокруг Семипалатинского испытательного полигона, в результате ядерных испытаний» // Отчет. – Курчатов, 2002. – Фонды ИРБЭ НЯЦ РК.
3. Проект МНТЦ К-928 «Комплексные исследования радиоактивного загрязнения системы атмосфера-подстилающая поверхность и оценки радиационных рисков для населения Семипалатинского региона» // Отчет. – Курчатов, 2004. – Фонды ИРБЭ НЯЦ РК.
4. Проект МНТЦ К-054 «Экологические пути миграции радионуклидов, связанных с ядерным испытанием на Семипалатинском полигоне» // Отчет. – Курчатов, 1998. – Фонды ИРБЭ НЯЦ РК.
5. Сейсебаев А.Т., Жатбасов Р.Ж. Цитогенетический анализ млекопитающих из экологически неблагополучных регионов Казахстана // III Конгресс глобального антиядерного альянса. – Астана, 2000. – С. 51.
6. Айманова К.Г., Кикнадзе И.И., Андреева Е.Н., Сейсебаев А.Т. Цитологическая идентификация видов хирономид из водоемов Семипалатинского полигона // Сибирский экологический журнал. – 2000. – Т. 7, № 4. – С. 503-509.
7. Мозолин Е.М., Гераськин С.А., Минкенова К.С. Радиобиологические эффекты у растений и животных Семипалатинского испытательного полигона (Казахстан) // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2008. – Т. 48, № 4. – С. 422-431.
8. Королев В.Г. Молекулярные механизмы ремарации двунитевых разрывов ДНК у эукариот // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2007. – Т. 47, № 4. – С. 389-401.
9. Окуджесева Дж.Р., Джсафаров Э.С. Некоторые особенности накопления природных радионуклидов в разных органах растений, произрастающих в зоне повышенного радиационного фона // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2007. – Т. 47, № 2. – С. 241-246.
10. Пелевина И.И., Готлиб В.Я., Кудряшова О.В. и др. Нестабильность генома после воздействия радиации в малых дозах (в 10-километровой зоне аварии на ЧАЭС и в лабораторных условиях) // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1996. – Т. 36, № 4. – С. 546-560.
11. Козубов Г.М., Таскаев А.И. Особенности морфогенеза и ростовых процессов у хвойных растений в районе аварии на ЧАЭС // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2007. – Т. 47, № 4. – С. 204-223.
12. Антоноева Е.В., Позолотина В.Н. Клональная структура ценопопуляций одуванчика в условиях радионуклидного загрязнения на Урале // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2007. – Т. 47, № 4. – С. 223-234.
13. Шевченко В.А., Абрамов В.И., Печкуреков В.Л. Генетические исследования на Восточно-Уральском радиоактивном следе // Экологические последствия радиоактивного загрязнения на Южном Урале. – М.: Наука, 1993. – 258 с.
14. Ярмоненко С.П., Вайсон А.А. Радиобиология человека и животных. – М.: Высшая школа, 2004. – 543 с.
15. Осипов А.Н., Азизова О.А., Владимиров Ю.В. Активные формы кислорода и их роль в организме // Успехи биол. химии. – 1990. – Т. 31. – С. 180-208.
16. Сарапульцев Б.И., Гераськин С.А. Генетические основы радиорезистентности и эволюция. М.: Энергоатомиздат, 1993. – 208 с.
17. Остерман Л.А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами. – М.: Наука, 1983. – С. 3-7.
18. Изоэлектрическое фокусирование. Теория. Методы и применение / Под ред. П. Пуретти. – М.: Мир, 1986. – 400 с.
19. Тулеубаев Б.А., Паницкий А.В. Особенности миграции радионуклидов в почвенно-растительном покрове разных ландшафтов бывшего Семипалатинского испытательного полигона // Биологические науки Казахстана. Павлодарский государственный университет. – 2004. – № 1-2. – С. 60-65.

Н. Ж. Қадырова, Г. А. Ісмагұлова, Ш. К. Мұрұмбаева, О. М. Блохина

СЕМЕЙ СЫНАҚ ПОЛИГОНЫДАҒЫ ӨСІМДІКТЕР ПОПУЛЯЦИЯСЫ АҚУЫЗДАРЫНЫҢ ПОЛИМОРФИЗМІН ЗЕРТТЕУ

ССП түрлі дәрежедегі радионуклидтік ластанған «Балапан» және «Дегелен» техникалық аймақтарында өскен өсімдіктер жапырактарында пероксидаза мен эстеразаның изоферменттік құрамы зерттелді. Ағаштекті

өсімдіктерде шептектімен салыстырғанда ферменттердің белсенделігінің төменділігі аңықталды. Көпжылдық дақыл-дар үшін пероксидаза мен эстеразаның қышқылдық және сілтілік изоформаларының бар екендігі көрсетілді. Тарап bidayык өсімдігіне радионуклеотидті ластану әсерін зерттегендеге қышқыл изоформасын маркерлік көрсеткіш ретінде колдануға болады. Эстеразаның бейтарап және қышқылдық формаларының бар болуы *Koeleria* өсімдігі үшін радионуклидтік көрсеткіш болып табылады.

N. Zh. Kadyrova, G. A. Ismagulova, Sh. K. Murumbaeva, O. M. Blokhina

THE STUDY OF PROTEIN POLYMORPHISM OF PLANT POPULATIONS INHABITED
IN SEMIPALATINSK TEST SITE

The isozyme structure of a peroxidase and esterase of the plant leaves growing on STS's technical sites «Balapan» and «Degelen» with different degree of radioactive pollution is investigated. It is established that activity of enzymes is lower at wood kinds of plants in comparison with herbaceous. For perennial cereals presence of acidic and alkaline isoforms of peroxidase and esterase is shown. Absence of acidic isoforms of esterase can be used as quality marker in investigation of radionuclide pollution of *Agropyron* plants. Presence of neutral and acidic forms of esterase is an indicator of radionuclide pollution of *Koeleria* plants.