

## АКТИВНОСТЬ ЭТОКСИРЕЗОРУФИН-О-ДИЭТИЛАЗЫ (ЭРОД) РЫБ КАК БИОМАРКЕР ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОДНОЙ СРЕДЫ СТОЙКИМИ ОРГАНИЧЕСКИМИ ЗАГРЯЗНЯЮЩИМИ ВЕЩЕСТВАМИ

**В. В. Юрченко, Г. М. Чуйко**

*Учреждение Российской академии наук Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанова РАН,  
п. Борок, Ярославская обл., Россия  
e-mail: viksapiksa@mail.ru*

Органические загрязнители водных объектов в большинстве своём представлены липофильными ксенобиотиками. В связи с этим они способны легко проникать через клеточные мембраны жабр, кожи, органов пищеварительной системы, что обуславливает их высокую биодоступность для рыб. Последующая судьба и биологические эффекты чужеродных соединений в значительной степени зависят от возможности их включения в процесс биотрансформации. Биотрансформация липофильных соединений состоит из двух фаз. В первой фазе (phase I), оксидативной, главная роль принадлежит оксигеназным системам, которые, окисляя гидрофобные молекулы ксенобиотика, увеличивают его водорастворимость. Во второй фазе (phase II) продукты оксигеназных реакций конъюгируют с различными водорастворимыми эндогенными соединениями посредством трансфераз (и некоторых других групп ферментов) и удаляются экскреторными органами (Di Giulio et al., 1995).

Биотрансформация ксенобиотиков является функциональным звеном более общего процесса в живой системе – увеличения полярности окисляемых молекул, по этому пути происходит превращение гидрофобных эндогенных соединений (стероидов, длинноцепочечных жирных кислот и др.). Поэтому оксигеназы также получили название «оксидазы смешанных функций». Универсальной оксидазой, обнаруженной у представителей животного, растительного и бактериального миров, является цитохром P450 (Арчаков, 1983). К настоящему времени выделено множество его форм (Kadlubar, Kadlubar, 2010). Известно, что P450-содержащие ферментные системы обладают выраженной субстратной специфичностью, хотя некоторые из них трансформируют относительно широкий спектр субстратов (Katagi, 2010).

Возможно, никаким другим монооксигеназам не было уделено такого большого внимания как подсемейству CYP1A-содержащих оксигеназ (cytochrome P450 family 1 subfamily A), так как оно играет ключевую роль в биотрансформации планарных галогенированных и полициклических ароматических углеводородов, а также структурно сходных соединений. Попадая в организм рыб, эти ксенобиотики вызывают индукцию CYP1A, которая проявляется в повышении активности этоксирезорурфин-О-диэтилазы (ЭРОД) (Sarasquete, Segner, 2000).

ЭРОД, как и остальные P450-содержащие ферменты, является мембраноассоциированным белком эндоплазматического ретикулума. Монооксигеназная система ЭПР, вероятно, состоит из трёх компонентов: НАДФН-специфичный протеид, цитохром b5 и цитохром P450 (Арчаков, 1983).

На субклеточном уровне наибольшая ЭРОД-активность отмечается в микросомальной фракции. На клеточно-тканевом – максимальную индукцию CYP1A демонстрирует эндотелий (Smolowitz et al., 1991; Stegeman et al., 1991). На уровне органов и их систем в организме рыб CYP1A-содержащие ферменты концентрируются главным образом в печени, но они обнаружены также в почках, селезёнке, жабрах, коже, пищеварительном тракте, коре надпочечников, сердце, гонадах, обонятельной системе, мозге, красной мускулатуре (Di Giulio et al., 1995; Sarasquete, Segner, 2000).

Ксенобиотики вызывают индукцию ферментов-трансформаторов, активируя транскрипцию генов. Обычно ксенобиотик считают индуктором, если он активирует ядерный рецептор, тем самым вызывая увеличение экспрессии генов-мишеней этого рецептора. В неактивированном

состоянии арил-углеводородный рецептор (AhR) находится в цитоплазме, в комплексе с димером БТШ 90, кошапероном p23, иммунофилин-подобным белком, называемым белком, взаимодействующим с AhR (AIP, известный также как ARA9 или XAP2). Во время активации этого комплекса лигандом Ah-рецептор отделяется и перемещается к ядру, где образует гетеромер с AhR-ядерным переносчиком (ARNT). AhR-ARNT гетеродимеры связываются с ДНК-последовательностями в 5'-регуляторных областях генов-мишеней и взаимодействуют с различными коактиваторами, корепрессорами, и (или) основными факторами транскрипции, определяя таким образом скорость транскрипции генов. Последовательности ДНК, которые связываются с AhR-ARNT, называют элементами, способными реагировать с ксенобиотиками (xenobiotic-responsive elements, XRE) (Ripp, 2008).

Немало усилий было затрачено для определения потенциальных индукторов CYP1A. В частности QSAR-модели (quantitative structure-activity relationship models), или модели количественного отношения «структуры – активности», основанные на понимании того, что химическая структура соединения коррелирует с определённым процессом, таким как биологическая активность (или химическая активность), а также анализы конкурентного связывания (competitive binding assays) с использованием меченых лигандов. В результате этих исследований, например, были установлены молекулярные размеры потенциальных лигандов:  $12\text{Å} \times 14\text{Å} \times 5\text{Å}$  (Whyte et al., 2000).

Индукторами CYP1A являются несколько классов химических соединений. Полихлорированные дибензо-п-диоксины (ПХДД) и полихлорированные дибензофураны (ПХДФ) – планарные хлорированные углеводороды, которые широко распространены в окружающей среде. Эти два класса представлены 75 и 135 конгенерами, соответственно. Наиболее хорошо изученный в этой группе 2,3,7,8-ТХДД – одно из наиболее токсичных соединений, когда-либо произведённых человеком, и наиболее сильный индуктор. Ещё одна группа хлорированных углеводородов, вызывающая индукцию CYP1A – это полихлорированные бифенилы (ПХБ), представленные 209 конгенерами. Снятые с производства во многих странах, они и по сей день циркулируют в природной среде благодаря своей устойчивости и способности к биоаккумуляции. Сильными индукторами среди конгенеров являются ПХБ 77 (3,3',4,4'-тетрахлоробифенил), ПХБ 126

(3,3',4,4',5-пентахлоробифенил), ПХБ 169 (3,3',4,4',5,5'-гексахлоробифенил). Полибромированные бифенилы (ПББ) являются структурными гомологами ПХБ и представлены тем же числом конгенеров. Этот класс соединений исследован значительно меньше в контексте индукции CYP1A. То же самое можно сказать и о полихлорированных терфенилах. Хорошо изученными индукторами ЭРОД-активности являются полиароматические углеводороды. Несмотря на то, что существуют естественные источники поступления ПАУ в среду, загрязнение водных экосистем происходит в основном по вине человека. Индукция ЭРОД химическими соединениями этого класса характеризуется очень сильными межвидовыми различиями. AhR-лигандами являются и хлорорганические пестициды. Рыбы, отловленные в водоёмах, имеющих связь с сельскохозяйственными землями, демонстрируют повышенные уровни ЭРОД. Такой класс загрязнителей как тяжёлые металлы не обладает характеристиками потенциальных индукторов CYP1A, однако установлено, что некоторые металлы могут изменять степень активности ЭРОД, индуцированной AhR-лигандами. Кадмий может повышать активность, индуцированную ПАУ, а медь – понижать. Биотоксины, такие как бревитоксин, имеют некоторую способность вызывать индукцию CYP1A-ферментных систем у рыб. *Pytochodiscus brevis*, относящийся к динофлагеллятам, продуцирует этот липофильный нейротоксин в больших количествах во время «цветения» (Whyte et al., 2000).

Одним из основных достоинств ЭРОД-анализа в целях биомониторинга является его способность указывать на воздействие многокомпонентных химических смесей, как, например, стоки целлюлозно-бумажного производства. Индуцированная ЭРОД-активность отловленной «в природе» рыбы может быть использована для индикации присутствия AhR-лигандов, что позволит исключить дорогостоящие анализы тканей, воды и донных отложений. Понимание существующих ограничений используемого в мониторинге инструмента даст возможность надлежащим образом трактовать результаты (Whyte et al., 2000).

Многие индукторы могут быть и ингибиторами CYP1A-индукции (при очень высоких концентрациях). В случаях, когда есть подозрение на ингибирование ЭРОД-активности уместно использовать в качестве метода оценки воздействия контаминантов измерение CYP1A-белка или м-РНК (Sarasquete, Segner, 2000)

В целом, к преимуществам ЭРОД-анализа относят то, что он служит своеобразным «детектором» присутствия AhR-активирующих соединений. В результате «быстрого» метаболизма многих полиароматических и некоторых полигалогенированных углеводородов методы аналитической химии не в состоянии выявить эти соединения в тканях рыб, тогда как ЭРОД-активность обеспечивает чёткое свидетельство присутствия планарных контаминантов в организме. Уровень индукции ЭРОД может служить основанием для определения биологического потенциала ксенобиотика, быть индикатором биохимических и физиологических изменений. ЭРОД-активность отражает и кумулятивное воздействие AhR-агонистов, безотносительно к тому приводят они к токсическому процессу, или нет (Whyte et al., 2000).

Индукцированная ЭРОД-активность может многократно возрастать по сравнению с базовым уровнем. В целях сравнения результатов исследований сложилась условная градация ЭРОД-индукции на «слабую» (ЭРОД-активность возрастает до 10 раз по сравнению с контролем), «умеренную» (от десяти- до стократно-го повышения уровней ЭРОД) и «сильную» (активность фермента увеличивается более чем в 100 раз) (Whyte et al., 2000).

Говоря об определении ЭРОД-активности у рыб, важно подчеркнуть, что этот показатель является очень нестабильным и чувствительным к манипуляционным процедурам. Существует ряд приёмов для минимизации потерь активности фермента. Важно быстро обрабатывать пойманную рыбу, так как стресс запускает выброс глюкокортикоидов (например, кортизола), что повышает уровни ЭРОД (Devaux et al., 1992). Печень от живой рыбы следует помещать в жидкий азот (-196 °C) для хранения проб до момента анализа. Приготовление гомогената ткани необходимо осуществлять в ледяном буфере и на льду. Далее процедура представляет из себя получение постмитохондриального супернатанта (гомогенат центрифугируют при 9000–13500 g от 20 до 25 минут), а затем – выделение микросомального осадка (супернатант центрифугируют при 100000–200000 g от 50 до 60 минут). Полученный микросомальный осадок ресуспендируют в буфере. Таким образом, проведения ЭРОД-анализа подразумевает наличие следующего лабораторного оборудования: гомогенизатор, центрифуга и ультрацентрифуга – для получения микросомальной фракции, спектрофлуориметр – для измерения конечного продукта ре-

акции. В основе анализа ферментативной активности лежит реакция диэтилирования 7-этокси-резорурфина. В качестве кофактора используется НАДФ восстановленный. Продукт реакции, резорурфин, является флуоресцентным и имеет максимумы возбуждения и испускания при длинах волн 530 и 580 нм, соответственно (Burke, Mayer, 1974; Whyte et al., 2000). ЭРОД-активность измеряется как количество резорурфина, приходящегося на мг белка в образце микросомальной фракции печени рыбы в минуту времени реакции (моль/мг/мин) (Pohl, Fouts, 1980).

Прежде чем делать выводы о качестве среды на основании данных ЭРОД-анализа и использовать активность фермента в целях биомониторинга, необходимо установить, в каких пределах она изменяется у массовых видов рыб и от каких факторов зависит в нормальных условиях.

Для решения этой проблемы необходимы лабораторные исследования, направленные на оценку конститутивной (базовой) активности фермента, а также уровней его индукции ксенобиотиками. Например, было показано (Förlin, Celander, 1993), что у окуня при базовой ЭРОД-активности 440 пмоль/мг/мин внутривентральные инъекции в дозе 500 мг/кг Clophen 50 (ПХБ) и 50 мг/кг β-нафтофлавона (ПАУ) вызвали индукцию до уровня 1100 пмоль/мг/мин и 2560 пмоль/мг/мин, соответственно. У щуки после инъекции β-нафтофлавона в такой же дозе уровень ЭРОД возрос с 480 пмоль/мг/мин до 4660 пмоль/мг/мин. Абсолютные показатели ЭРОД-активности, без сомнения, в некоторой степени будут отличаться от исследования к исследованию. Основными факторами, определяющими флуктуацию ЭРОД-активности, являются репродуктивная стадия особи (Stegeman, Hahn, 1994), а также сезонные изменения температуры воды и доступность пищи. Замечено, что поступление индукторов в организм рыб зависит от температуры и характеризуется следующими особенностями: в большей степени ксенобиотиками аккумулируются при высокой температуре воды и в меньшей степени выводятся из организма при низкой температуре (Collier et al., 1978).

Ключевым аспектом в выборе вида для мониторинговых исследований является не сама по себе индуцированная ЭРОД-активность, а в большей степени – устойчивая конститутивная ЭРОД-активность и значительная амплитуда между конститутивной и индуцированной ЭРОД-активностью, что позволяет однозначно интерпретировать результаты (Flamarion, Garric, 1997).

## Литература

- Арчаков А. И. Оксигеназы биологических мембран. М.: Наука, 1983. 56 с.
- Bock K. W., Lipp H. P., Bock-Hennig B. S. Induction of drug-metabolising enzymes by xenobiotics // *Xenobiotica*. 1990. Vol. 20. No 11. P. 1101–1111.
- Burke M.D., Mayer R.T. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene // *Drug Metabolism and Disposition*. 1974. Vol. 2. P. 583–588.
- Collier T.K., Thomas L.C., Malins D.C. Influence of environmental temperature or disposition of dietary naphthalene in coho salmon (*Oncorhynchus kitsutch*): isolation and identification of individual metabolites // *Comp. Biochem. Physiol.* 1978. Vol. 61. P. 23–28.
- Devaux A., Pesonen M., Monod G., Andersson T. Glucocorticoid-mediated potentiation of P450 induction in primary culture of rainbow trout hepatocytes // *Biochemistry and Pharmacology*. 1992. Vol. 43. P. 898–901.
- Di Giulio R.T., Benson W.H., Sanders B.M., Van Veld P.A. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity // Rand G.M. (ed.) *Fundamentals of aquatic toxicology. Effects, environmental fate, and risk assessment*. Washington: Taylor & Francis, 1995. Ch. 17. P. 523–561.
- Flammarion P., Garric J. Cyprinids EROD activities in low contaminated rivers: a relevant statistical approach to estimate reference levels for EROD biomarker? // *Chemosphere*. 1997. Vol. 35. No. 10. P. 2375–2388.
- Förlin L., Celander M. Induction of cytochrome P4501A in teleosts: environmental monitoring in Sweden fresh, brackish and marine waters // *Aquatic Toxicology*. 1993. Vol. 26. P. 41–56.
- Kadlubar S., Kadlubar F. F. Enzymatic Basis of Phase I and Phase II Drug Metabolism // Pang K. S. et al. (eds.) *Enzyme- and Transporter-Based Drug-Drug Interactions*. 2010. P. 3–25.
- Katagi T. Bioconcentration, Bioaccumulation, and Metabolism of Pesticides of Aquatic Organisms // *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 2010. Vol. 204. P. 1–132.
- Norrgren L., Andersson T., Björk M. Liver morphology and cytochrome P450 activity in fry of rainbow trout after microinjection of lipid-soluble xenobiotics in the yolk-sac embryos // *Aquatic Toxicology*. 1993. Vol. 26. P. 307–316.
- Pohl R.J., Fouts J.R. A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by microsomal subcellular fractions // *Analytical Biochemistry*. 1980. Vol. 107. P. 150–155.
- Ripp S. L. Induction of Drug-Metabolizing Enzymes: Contrasting Roles in Detoxification and Bioactivation of Drugs and Xenobiotics // Elfarra A. A. (ed.) *Advances in Bioactivation Research*. 2008. P. 69–102.
- Sarasquete C., Segner H. Cytochrome P4501A (CYP1A) in teleostean fishes. A review of immunohistochemical studies // *The Science of the Total Environment*. 2000. Vol. 247. No 2–3. P. 313–332.
- Smolowitz R. M., Hahn M. E., Stegeman J. J. Immunohistochemical localization of cytochrome P-450IA1 induced by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl and by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzoafuran in liver and extrahepatic tissues of the teleost *Stenotomus chrysops* (scup) // *Drug Metabolism and Disposition*. 1991. Vol. 19. No 1. P. 113–123.
- Stegeman J. J., Smolowitz R. M., Hahn M. E. Immunohistochemical localization of environmentally induced cytochrome P450IA1 in multiple organs of the marine teleost *Stenotomus chrysops* (Scup) // *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1991. Vol. 110. No 3. P. 486–504.
- Stegeman J.J., Hahn M.E. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species // Malins D.C. and Ostrander G.K. (eds.) *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*. Boca Raton: Lewis Publishers, 1994. P. 87–206.
- Whyte J.J., Jung R.E., Schmitt C.J., Tillitt D.E. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) Activity in Fish as a Biomarker of Chemical Exposure // *Critical Reviews in Toxicology*. 2000. Vol. 30. Is. 4. P. 347–570.
- Williams D.E., Lech J.J., Buhler D.R. Xenobiotics and xenoestrogens in fish: modulation of cytochrome P450 and carcinogenesis // *Mutation Research*. 1998. Vol. 399. P. 179–192.

### **ETHOXYRESORUFIN-O-DEETHYLASE (EROD) ACTIVITY IN FISH AS A BIOMARKER OF WATER POLLUTION WITH PERSISTENT ORGANIC CONTAMINANTS**

**V.V. Yurchenko, G.M. Chuiko**

*Papanin Institute of Biology of Inland Waters, Russian Academy of Science, Borok, Yaroslavl region,  
Russia* IBIW RAS, Borok, Russia,  
viksapiksa@mail.ru

CYP1A-dependent monooxygenases are known to be metabolizing enzymes of many xenobiotics, such as PCDDs, PCDFs, PCBs, PAHs and structurally related compounds. EROD activity in fish being an indicator of CYP1A-induction is a well-established *in vivo* biomarker for

environmental pollution. EROD activity approach is based on the measurement of ethoxyresorufin deethylation product, resorufin, in liver microsomal fraction.