

УДК 577.1: 597

## ПРИМЕНЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОСТОЯНИЯ БЕЛКОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ СЕГОЛЕТОК КАРПОВЫХ РЫБ В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ИОНОВ КАДМИЯ

Мурадова Г.Р., Абдуллаев В.Р., Рабаданова А.И.

ГОУ ВПО «Дагестанский государственный университет», Махачкала,  
e-mail: gulka-2005@yandex.ru

Изучено изолированное воздействие ионов кадмия на интенсивность флуоресценции белков плазмы крови сеголеток карповых рыб. Опыты проводились на 5, 15, 30 и 40 дни хронического эксперимента. Полученные результаты выявили существенные различия в интенсивности флуоресценции в плазме крови сеголеток карпа. При изолированном отравлении сеголеток карпа ионами кадмия интенсивность общей ( $\lambda_{\text{возб}}=280$  нм) флуоресценции белков плазмы крови на 5 сутки достоверно снижается и имеет дальнейшую тенденцию к снижению на 15 и 30 сутки относительно контроля. На 40 сутки происходит существенное падение флуоресценции относительно контроля. Триптофановая флуоресценция ( $\lambda_{\text{возб}}=295$  нм) белков плазмы крови на всем протяжении эксперимента достоверно снижается с максимумом падения на 40 сутки экспозиции. Результаты исследований указывают на то, что флуоресценция белков плазмы крови является весьма чувствительным показателем в оценке физиологического и биохимического статуса организма гидробионтов и мониторинга рыбохозяйственных водоемов.

**Ключевые слова:** карповые рыбы, кадмий, кровь, белки, флуоресценция

## THE USE OF FLUORESCENCE ANALYSIS TO DETERMINE THE STATUS OF BLOOD PLASMA PROTEINS OF CARP FINGERLINGS IN CHRONIC EFFECTS OF CADMIUM IONS

Muradova G.R., Abdullaev V.R., Rabadanova A.I.

HPE «Dagestan State University», Makhachkala, e-mail: gulka-2005@yandex.ru

The isolated effect of cadmium ions on the fluorescence intensity of plasma proteins of carp fingerlings are studied. The experiments were conducted at 5, 15, 30 and 40 days of chronic experiment. The obtained results are revealed significant differences in the fluorescence intensity in plasma of carp fingerlings. The separate poisoning carp fingerlings by cadmium ions the intensity overall ( $\lambda_{\text{excitation}} = 280$  nm) fluorescence spectra of blood plasma proteins on day 5 was significantly reduced and a further downward trend in the 15 and 30 day relative to controls. At 40 days there is a significant drop in fluorescence relative to the control. Tryptophan fluorescence ( $\lambda_{\text{excitation}} = 295$  nm) of plasma proteins throughout the experiment was significantly reduced, with a maximum incidence of 40 day exposure. Research results indicate that the fluorescence of blood plasma proteins is a very sensitive indicator to assess the physiological and biochemical status of aquatic organism and monitoring of fishery ponds.

**Keywords:** carp fish, cadmium, blood, proteins, fluorescence

Одной из острейших проблем современности является антропогенное воздействие на гидросферу. Тяжелые металлы рассматриваются, как приоритетные химические поллютанты, представляющие особую опасность для организмов и биоценозов, вследствие того, что многие из них обладают биологической активностью, способны аккумулироваться в тканях различных организмов, не подвергаются биодеградации и крайне медленно покидают биологический цикл [2, 5]. В качестве ведущих механизмов нарушения клеточного метаболизма при экспонировании биообъектов тяжелыми металлами выделяют ферментотоксическое, мембранотропное действие и оксидативный стресс [11].

К числу наиболее опасных тяжелых металлов относится кадмий. Точный механизм токсического действия кадмия неизвестен, хотя он, безусловно, многоступенчатый [8]. Катионы кадмия могут нарушать структурную целостность мембран, приводящую

к их деформациям, лизису клетки и её гибели. Под их воздействием разрушаются мембраны эритроцитов, и развивается гемолиз [9], связываясь с аминокислотными группами белков, вызывают угнетение активности ферментов [7, 13]. Кадмий обладает местно-раздражающим и резорбтивным действием. При остром отравлении хлористым кадмием обнаруживаются гиперплазия и распад респираторного эпителия жабр [11, 14], эпидермиса кожи, некробиоз кишечника и проксимальных канальцев почек, гемопозитической ткани. Хроническая интоксикация выражается замедлением роста, некробиотическими изменениями в жабрах, почках [12], печени, гемопозитической ткани, угнетением клеточных факторов иммунитета крови в виде лейкопении [6]. Воздействие соединений кадмия вызывает весь спектр генетических изменений в организме: геномные, генные мутации и хромосомные аберрации. Так, например, хлорид кадмия способен индуцировать такие повреждения хромосом, как

нарушение конденсации, фрагментация, слипание и отставание хромосом, хромосомные мосты, мультиполярные анафазы и др. [1].

Важную роль в метаболизме, росте и развитии, а также адаптации гидробионтов к различным видам токсикологической нагрузки играют белки, липиды и углеводы. В связи с этим очевидна значимость определения качественных изменений белкового состава плазмы крови рыб в норме и в условиях антропогенной нагрузки.

Целью работы явилось изучение влияния хронической интоксикации водной среды ионами кадмия на флуоресценцию аминокислотных остатков белков плазмы крови сеголеток карповых рыб.

### Материалы и методы исследования

Работа выполнена на базе лаборатории молекулярной биологии кафедры биохимии и биофизики и лаборатории анатомии, физиологии, гистологии Дагестанского государственного университета. Экспериментальные исследования проводились в зимнее время (октябрь-ноябрь) 2012 г.

Материалом исследования послужили сеголетки карпа (*Cyprinus carpio L.*), выращенные в прудах Широкольского рыбокомбината Тарумовского района республики Дагестан, которые отлавливались и переносились по 20-30 штук в аквариумы объемом 250-300 литров с содержанием хлорида кадмия 0,25 мг/дм<sup>3</sup> (ПДК – 0,005 мг/дм<sup>3</sup>) [4]. Контролем во всех опытах служили рыбы, выдерживаемые в чистой воде. В аквариумах создавались условия постоянного температурного (19-23 °С) и газового режима. Кормили рыб живым трубочником *Tubifex tubifex*.

На 5, 15, 30 и 40 сутки эксперимента регистрировали спектры собственной флуоресценции белков плазмы крови при возбуждении на длинах волн, которые соответствуют максимумам поглощения тирозина и триптофана (общая флуоресценция) ( $\lambda_{\text{возб}} = 280 \text{ нм}$ ), и триптофана ( $\lambda_{\text{возб}} = 295 \text{ нм}$ ).

Математический анализ полученных результатов исследования проводили в соответствии с общепринятыми правилами вариационной статистики. Среднестатистические спектры флуоресценции получали путем усреднения спектральных линий, полученных в повторных экспериментах (n=5). Для оценки достоверности различий использовали t-критерий Стьюдента. Обработку спектров производили в программах Origin 8.6.

### Результаты исследования и их обсуждение

Результаты исследований представлены на графиках 1-4. Нами выявлены существенные различия в интенсивности флуоресценции в плазме крови сеголеток карпа при отравлении хлоридом кадмия. Установлено, что экспозиция сеголеток карпа в среде с 5 кратным превышением ПДК по кадмию, интенсивность общей ( $\lambda_{\text{возб}} = 280 \text{ нм}$ ) и триптофановой ( $\lambda_{\text{возб}} = 295 \text{ нм}$ ) флуоресценции белков плазмы крови на 5 сутки, существенно снижается относительно контроля (рис. 1). Дальнейшая экспозиция (15-30 дней) существенно не изменяет интенсивность общей флуоресценции. На 40 день интоксикации наблюдается значительное падение флуоресценции белков плазмы крови относительно контроля как при  $\lambda_{\text{возб}} = 280 \text{ нм}$ , так и  $\lambda_{\text{возб}} = 295 \text{ нм}$  (рис. 1, 2).

Анализ спектральных характеристик плазмы сеголеток карпа показал, что флуоресценция при возбуждении светом длинной волны 280 и 295 нм характеризуется значениями максимума интенсивности  $\lambda_{\text{макс}} = 330-336 \text{ нм}$ . Для белков, содержащих триптофан и тирозин, положение максимума спектра флуоресценции не зависит от длины волны возбуждения, что свидетельствует о существенном вкладе в спектры триптофановых остатков [3].

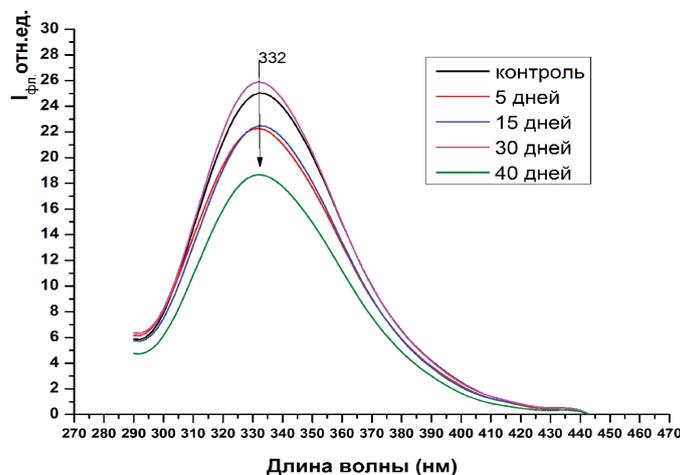


Рис. 1. Интенсивность собственной флуоресценции плазмы крови сеголеток карпа при возбуждении  $\lambda_{\text{возб}} = 280 \text{ нм}$

Содержание белков в плазме крови рыб подвержено существенным изменениям. Для рыб допустимо пятикратное изменение концентрации плазменных белков (альбуминов и глобулинов), что абсолютно несовместимо с жизнью у птиц и млекопитающих. Спектр белков плазмы представлен типичными группами, т.е. альбуминами и глобулинами, однако, как физиологическая норма, у рыб в плазме обнаруживаются и другие белки – гемоглобин, гептоглобин.

При анализе спектров флуоресценции предпочтительно применять вторые производные спектров флуоресценции (2ПСФ) как наиболее информативные [15]. Использование 2ПСФ оправдано тем, что они, по сравнению с исходными спектрами, дают возможность получить более детальную информацию о состоянии микроокружения ароматических остатков белков, а в ряде случаев также и раз-

делить вклад тирозиновой и триптофановой составляющих в суммарный спектр. Последнее обстоятельство обусловлено тем, что СФ триптофана имеют значительно большую полусирипу в сравнении со спектрами флуоресценции тирозина и положение их максимумов по исходным спектрам может быть определено менее точно, чем в случае спектров поглощения [5]. Поэтому анализ 2ПСФ особенно актуален для анализа СФ белков, флуоресценция которых обусловлена преимущественно триптофановыми остатками.

Вторые производные спектров суммарной флуоресценции белков плазмы крови сеголеток карпа указывают о преобладающем вкладе триптофановых остатков в суммарной флуоресценции. Об этом свидетельствует положение отрицательно пика при 329 нм, наряду с которым обнаруживается плечо на 350 нм (рис. 2).

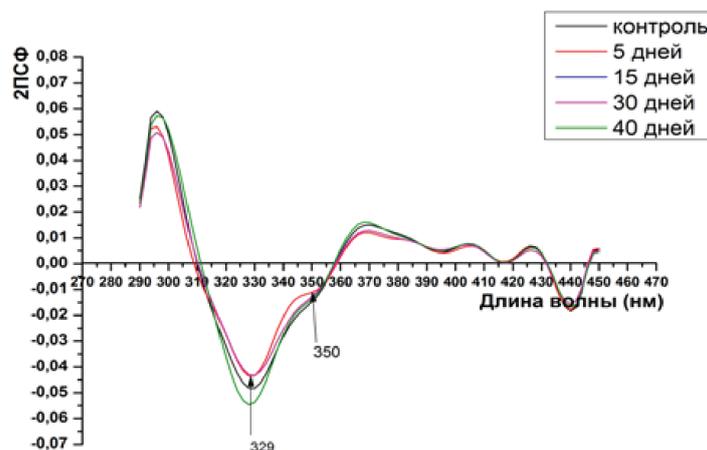


Рис. 2. Вторые производные собственной флуоресценции плазмы крови сеголеток карпа при возбуждении  $\lambda_{\text{возб}} = 280$  нм

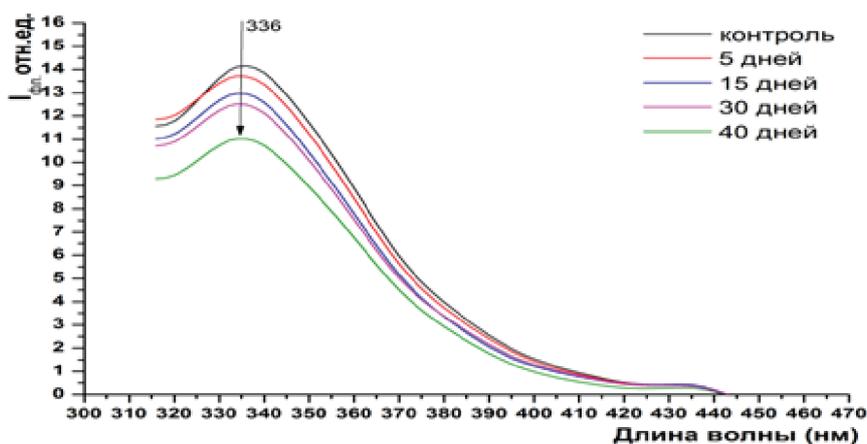


Рис. 3. Интенсивность собственной флуоресценции плазмы крови сеголеток карпа при возбуждении  $\lambda_{\text{возб}} = 295$  нм

Согласно гипотезе двух состояний, выдвинутой в работах [13], триптофановые остатки, находящиеся в контакте с водным растворителем, характеризуются положением максимума около 330 нм, а полностью доступные водному окружению – при 345–350 нм. В со-

ответствии с этой классификацией, положение основного отрицательного максимума во 2ПСФ может быть отнесено к триптофановым остаткам, контактирующим с водным окружением, а пик при 350 нм к поверхностно локализованным остаткам триптофана.

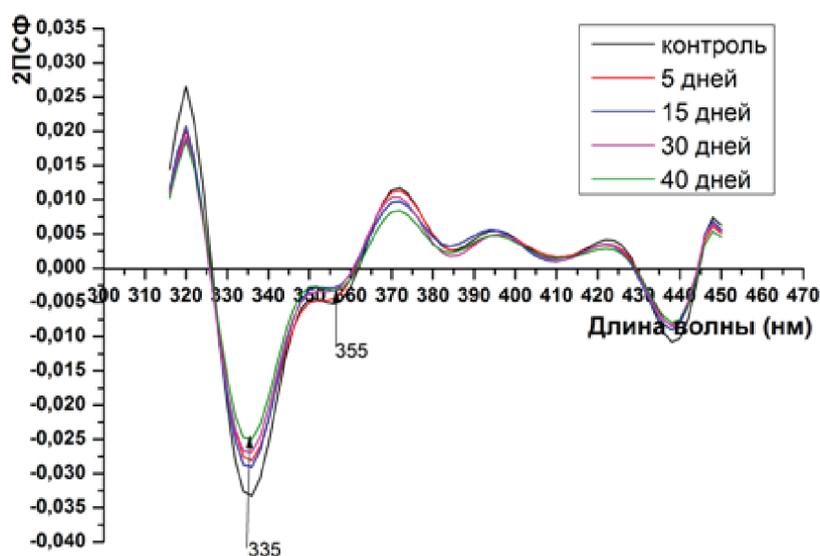


Рис. 4. Вторые производные собственной флуоресценции плазмы крови сеголеток карпа при возбуждении  $\lambda_{\text{возб}} = 295 \text{ нм}$

Таким образом, изменение интенсивности общей и триптофановой флуоресценции плазмы крови сеголеток карпа при хронической интоксикации хлоридом кадмия, свидетельствуют об структурных изменениях в молекулах белков плазмы крови, которые могут быть как обратимыми, так и деструктивными, связанными с окислением триптофановых остатков и образованием битирозиновых сшивок.

В то же время, вторые производные спектров триптофановой флуоресценции ( $\lambda_{\text{возб}} = 280$  и  $295 \text{ нм}$ ) белков плазмы крови не выявили существенных изменений при экспозиции сеголеток карпа в среде с превышением ПДК по хлориду кадмия (рис. 2, 4) относительно контроля.

Полученные данные служат важным информативным показателем оценки изменений, наблюдаемых на организменном или видовом уровнях гидробионтов.

Несмотря на то, что оценка процесса антропогенной деградации водных объектов требует дальнейшей разработки и должна носить комплексный характер, предложенная нами система оценки является достаточно универсальной и позволяет использовать ее в качестве объективного, наиболее экономичного экспресс – метода для оценки состояния гидробионтов, экологического мониторинга и экологических экспертиз водных экосистем.

*Статья подготовлена при поддержке Министерства образования и науки РФ, соглашение № 14.В37.21.0192.*

**Список литературы**

1. Амосова А.А. Оценка токсического воздействия соединений кадмия на водные организмы // Тез. докл. IX съезд гидробиол. общества РАН – Т. I, Тольятти, 18-22 сентября 2006. – 16 с.

2. Будников Г.К. Тяжелые металлы в экологическом мониторинге водных систем // Соросовский образоват. журн. Биология. – 1998. – Т. 7, № 4. – С. 21-28.
3. Бурштейн Э.А., Зимица Г.М., Владимиров Ю.А. Применение люминесцентного метода для определения состояния ароматических аминокислот (тирозина и триптофана) в белках и ферментных системах. Журнал прикладной спектроскопии. – 1966. – 4 (2). – Р. 142-146.
4. Волошина Г.В. Экологическая оценка состояния поверхностных вод реки Понура // Экологический вестник Север. Кавказа. – 2006. – Т.2, № 1. – С. 118-122.
5. Демченко А.П. Дифференцирование спектров как метод исследования препаратов белков с высоким уровнем мутности // Украинский биохимический журнал. – 1979. – 51(1). – 80 с.
6. Евтушенко Н.Ю., Сытник Ю.М., Осадчая Н.Н. Формы нахождения тяжелых металлов в воде и накопление их рыбами в условиях тепловодного выращивания / 2-я Все-союз. конфер. по рыбохозяйственной токсикологии: Тез. докл. – СПб – 1991. – Т. 1. – С. 178-179.
7. Иванова В.П. К вопросу о механизмах токсического действия кадмия на живые организмы / Мат-лы II Междунар. науч. конфер. «Актуальные проблемы экологической физиологии, биохимии и генетики животных». – Саранск: ЭКСПО, 2009. – С. 58-60.
8. Коновалов Ю.Д. Связывание кадмия и ртути белками и низкомолекулярными тиоловыми соединениями рыб (Обзор) // Гидробиол. журн. Экологическая физиология и биохимия водных животных. – 1992. – Т. 39, № 1. – С. 42-51.
9. Линник П.Н., Набиванец Б.И. Формы миграции металлов в пресных поверхностных водах. – Л.: Гидрометиздат, 1986. – 270 с.
10. Перевозников М.А., Богданова Е.А. Тяжелые металлы в пресноводных экосистемах. – СПб, 1999. – 228 с.
11. Столяр О.Б., Курант В.З., Хоменчук В.А., Балан Р.Б. Влияние сублетальных концентраций свинца на содержание тиоловых соединений и белков в организме карпа // Гидробиол. журнал. – 1999. – 35, № 6. – С. 63-68.
12. Шафран Л.М., Большой Д.В., Пыхтева Е.Г., Третьякова Е.В. Роль лизосом в механизме защиты и повреждения клеток при действии тяжелых металлов // Современные проблемы токсикологии. – 2004, № 3. – С. 17-24.
13. Burstein E.A., Vedenkina N.S., Ivkova M.N. Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules // Photochem. and Photobiol. – 1973. – Vol. 18, № 1. – P. 263-279.
14. Gargiulo G., de Girolano P., Ferrara L., Soppelsa O., Andreozzi G., Antonucci R., Battaglini P. Action of cadmium on gills of *Carassius auratus* L. in presence of cathabolic NH<sub>3</sub> // Farch. Environ. Contam. and Toxicol. – 1996. – Vol. 30, № 2. – P. 235-240.
15. Mozo-Villarias A. Second derivative fluorescence spectroscopy of tryptophan in proteins // J. Biochem. Biophys. Methods. – 2002. – Vol. 50, № 2-3. – P. 163-178.