УДК:577.1: 597

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ И ЭРИТРОЦИТОВ МОЛОДИ ПЕСТРОГО ТОЛСТОЛОБИКА (ARISTICHTUS NOBILIS RICHARDSON) В УСЛОВИЯХ СОЧЕТАННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ИОНОВ НЕКОТОРЫХ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

© 2014 Г.Р. Мурадова, В.Р. Абдуллаев, Д.У. Черкесова, А.И. Рабаданова

Дагестанский государственный университет, г. Махачкала

Поступила в редакцию 19.05.2014

Изучено хронозависимое комплексное воздействие ионов кадмия, свинца и марганца на флуоресценцию белков плазмы крови и эритроцитов годовиков пестрого толстолобика. Обнаружены фазные адаптивные изменения общей ($\lambda_{возб}$ =280 нм) и триптофановой ($\lambda_{возб}$ =295 нм) флуоресценции белков плазмы крови и снижение интенсивности флуоресценции ($\lambda_{возб}$ =280 нм) мембранных белков эритроцитов в результате их окислительной модификации при продолжительном воздействии (до 30 суток). Результаты флуоресцентного анализа белков крови дают основание для индикации стадий развития токсического стресса.

Ключевые слова: рыба, тяжелые металлы, кровь, белки, флуоресценция

Среди многочисленных токсикантов, загрязняющих биосферу, наиболее опасными являются тяжелые металлы (ТМ), что в значительной мере связано с их биологической активностью. Для нормальной жизнедеятельности организма необходимо наличие ТМ в оптимальном соотношении. При нарушении этих соотношений в сторону увеличения ТМ в среде или в организме они начинают действовать как токсиканты [1-3, 5]. Реакция гидробионтов на превышение в окружающей среде ионов ТМ свидетельствует об их кумулятивных свойствах и отсутствии естественных факторов нейтрализации их действия. Свинец и кадмий находится в ряду наиболее токсичных металлов. Из данных литературы следует, что воздействие ионов кадмия, свинца сопровождается деструкцией клеточных мембран, некрозом тканей различных органов, угнетением иммунной системы, развитием окислительного стресса [8-10]. Образующиеся продукты свободнорадикального окисления липидов вызывают накопление окислительных повреждений биомолекул (ДНК, белков и т.д.). Информативным показателем модификации белковых молекул является собственная флуоресценция белков плазмы крови и эритроцитов.

Мурадова Гульзия Руслановна, кандидат биологических наук, доцент кафедры анатомии, физиологии, гистологии. E-mail: gulka-2005@yandex.ru

Абдуллаев Вагаб Рафикович, кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии и биофизики

Черкесова Дилара Улубиевна, доктор биологических наук, профессор кафедры анатомии, физиологии, гистологии. E-mail: boodur09@mail.ru

Рабаданова Амина Ибрагимовна, кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры анатомии, физиологии, гистологии. E-mail: ashty06@mail.ru

Цель исследований: изучение хронозависимого комплексного воздействия ионов кадмия, свинца и марганца на спектральные характеристики собственной флуоресценции белков плазмы крови и эритроцитов молоди пестрого толстолобика.

Материалы и методы исследования. Работа выполнена на кафедре анатомии, физиологии, гистологии и лаборатории молекулярной биологии кафедры биохимии и биофизики Дагестанского государственного университета. Экспериментальные исследования проводились в весеннее время (апрель-май) 2013 г. Объектом исследования служили годовики пестрого толстолобика (Aristichtus nobilis Richardson), выращенные в прудах Широкольского рыбокомбината Тарумовского района Республики Дагестан. Рыбы отлавливались и переносились в аквариумы с содержанием ацетата свинца (1,0 мг/л) (ПДК – 0,1 мг/л), хлорида кадмия $(0,05 \ \text{мг/л}) \ (\Pi \ \text{ДK} - 0,005 \ \text{мл/л})$ и сульфата марганца (0,1 мг/л) (ПДК – 0,01 мг/л)) [4]. Длительность экспозиции составляла, 5, 15 и 30 суток. Контролем служили рыбы, которые выдерживались в чистой воде Плазму и эритроциты получали по методу Доджа и сотр. [11]. Спектральные измерения белков плазмы крови и эритроцитов проводили на спектрофлуориметре Флюорат-02 Панорама. Обработку спектров производили в программе Origin 9.

Результаты исследований и их обсуждение. Результаты исследований представлены на графиках 1-4, отражающих интенсивность общей (при λ_{8036} =280 нм) и триптофановой (λ_{8036} =295 нм) флуоресценции в диапазоне эмиссии от 290 до 450 нм. Спектральная характеристика флуоресценции плазмы крови зависит от белковых компонентов, входящих в ее состав. Флуоресценция белков обусловлена ароматическими аминокислотами (триптофан, фенилаланин, тирозин), обладающими

системой сопряженных двойных связей. Основным флуоресцирующим компонентом является триптофан, который определяет около 90% всей белковой флуоресценции [12]. Спектры флуоресценции белков плазмы и эритроцитов крови пестрого толстолобика в норме представлены на рис. 1.

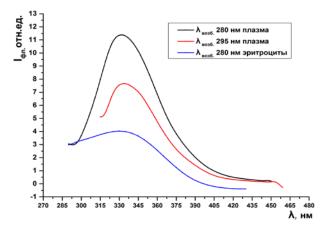


Рис. 1. Интенсивность флуоресценции белков плазмы крови ($\lambda_{возб.}$ -280 и 295 нм) и мембранных белков эритроцитов ($\lambda_{возб.}$ -280) годовиков пестрого толстолобика в контроле

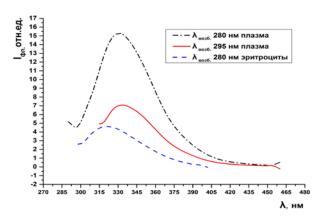


Рис. 2. Интенсивность флуоресценции белков плазмы крови ($\lambda_{\text{возб.}}$ -280 и 295 нм) и мембранных белков эритроцитов ($\lambda_{\text{возб.}}$ -280) годовиков пестрого толстолобика при сочетанном влиянии ионов Cd^{2+} , Pb^{2+} и Mn^{2+} в течение 5 суток

Расположение максимумов собственной флуоресценции белков плазмы ($\lambda_{возб}$ =280 нм) и $(\lambda_{возб} = 295 \text{ нм})$ характеризуется близкими значениями спектральных характеристик и имеет достаточно длинноволновое положение. Аналогичная независимость положения максимума спектра флуоресценции отмечается и для нативных мембран эритроцитов. Это указывает на то, что собственная флуоресценция белков плазмы обусловлена преимущественно триптофановыми остатками, частично доступными водному окружению. В отличие от белков плазмы крови, максимум интенсивности суммарной флуоресценции мембранных белков эритроцитов имеют коротковолновое положение (315-320 нм), что указывает на гидрофобное окружение триптофанилов [6, 7]. Через 5 суток экспозиции рыб в среде ТМ (рис. 2) интенсивность общей флуоресценции возрастает и достигает 15,5 единиц (против 11,5 в контроле). Возрастание интенсивности очевидно связано с адаптивными перестройками белковых компонентов плазмы и увеличением глобулиновой фракции белков, богатой ароматическими аминокислотами. На фоне увеличения общей флуоресценции белков плазмы крови выявлена тенденция к снижению интенсивности триптофановой флуоресценции. Тот факт, что интенсивность флуоресценции мембранных белков эритроцитов и их спектральная характеристика не изменяются, свидетельствует об относительной целостности эритроцитарных мембран.

На 15 сутки экспозиции (рис. 3) интенсивность общей и триптофановой флуоресценции белков снижается относительно показателей предыдущего срока экспозиции. При этом наблюдается незначительный сдвиг максимума общей флуоресценции в длинноволновую область, что характерно для полярного окружения белковых молекул в результате их модификации.

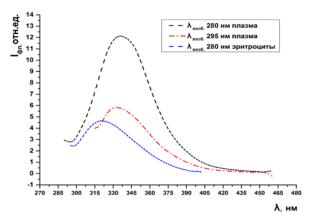


Рис. 3. Интенсивность флуоресценции белков плазмы крови ($\lambda_{\text{возб.}}$ -280 и 295 нм) и мембранных белков эритроцитов ($\lambda_{\text{возб.}}$ -280) годовиков пестрого толстолобика при сочетанном влиянии ионов Cd^{2+} , Pb^{2+} и Mn^{2+} в течение 15 суток

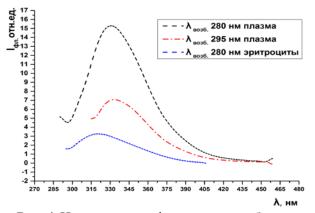


Рис. 4. Интенсивность флуоресценции белков плазмы крови ($\lambda_{\text{возб.}}$ -280 и 295 нм) и мембранных белков эритроцитов ($\lambda_{\text{возб.}}$ -280) годовиков пестрого толстолобика при сочетанном влиянии ионов Cd^{2+} , Pb^{2+} и Mn^{2+} в течение 30 суток

После длительной 30 дневной экспозиции в среде тяжелых металлов (рис. 4) вновь возрастает интенсивность общей и триптофановой флуоресценции белков плазмы крови. Между тем флуоресценция мембранных белков эритроцитов ниже по сравнению с контролем, что указывает на значительную модификацию белковых компонентов эритроцитарных мембран.

Выводы: фазные изменения интенсивности флуоресценции отражают, главным образом, количественные адаптивные перестройки белков плазмы крови. При этом не исключено, что ионы марганца, обладающие супероксидустраняющей активностью, на начальных этапах экспозиции рыб способны сдерживать развитие окислительного стресса и накопление продуктов свободнорадикального окисления. Однако более продолжительное воздействие комплекса ТМ на организм рыб вызывает изменение флуоресценции мембранных белков эритроцитов, что указывает на их деструктивную модификацию и значительную уязвимость кроветворной системы рыб, что может быть использовано в качестве индикатора повреждающего воздействия.

Работа выполнена при поддержке госзадания Минобрнауки России в сфере научной деятельности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

- Будников, Г.К. Тяжелые металлы в экологическом мониторинге водных систем // Соросовский образовательный журнал. Биология. 1998. Т.7, №4. С. 21-28.
- 2. *Бутаев, А.М.* Тяжелые металлы в речных водах Дагестана / *А.М. Бутаев* и др.// Вестник Дагестан-

- ского научного центра. 2006. № 26. С. 43-50.
- Буритейн, Э.А. Собственная люминесценция белков // Биофизика. – М.: ВИНИТИ АН СССР, 1977. Т. 7. 189 с.
- Волошина, Г.В. Экологическая оценка состояния поверхностных вод реки Понура // Экологический вестник Север. Кавказа. 2006. Т.2. №1. С.118-122.
- Давыдова, С.Л. О токсичности ионов металлов // Химия. 1991. № 3. С. 121-123.
- 6. *Демченко, А.П.* Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков. К.: Наукова думка, 1981. 208 с.
- 7. Залесская, Г.А. Спектры флуоресценции плазмы крови при ультрафиолетовом облучении in vivo / Г.А. Залесская, Т.О. Маслова // Журнал прикладной спектроскопии. 2010. Т. 77, № 4. С. 618-626.
- Мурадова, Г.Р. Применение флуоресцентного анализа для определения состояния белков плазмы крови сеголеток карповых рыб в условиях хронического воздействия ионов кадмия / Г.Р. Мурадова, В.Р. Абдуллаев, А.И. Рабаданова //Международный журнал экспериментального образования. 2013. №11 (часть 2). С. 86-91.
- Трахтенберг, И.М. Свинец и окислительный стресс / И.М. Трахтенберг и др.] // Экологическая токси-кология. 2002. Вып.1. С. 209-214.
 Черкесова, Д.У. Экологические и метаболические
- Черкесова, Д.У. Экологические и метаболические аспекты токсичности тяжелых металлов / Д.У. Черкесова, А.Р. Исуев, М.С. Гаджиев //Вестник Дагестанского государственного университета. 2005. Вып. 4. С. 58-67.
- Dodge, G.T. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin free ghosts of human eryrhrocytes / G.T. Dodge, C. Mitchell, D.J. Hanahan // Arch. Biochem. Biophys. 1963. Vol. 100. P. 119-130.
- 12. *Lakowicz*, *J.Ř*. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3rd ed. 2006, XXVI, 954 p.

FLUORESCENCE ANALYSIS OF BLOOD PLASMA PROTEINS AND ERYTHROCYTES IN YEARLING OF MOTLEY SILVER CARP (ARISTICHTUS NOBILIS RICHARDSON) IN CONDITIONS OF COMBINED INFLUENCE OF SOME HEAVY METALS IONS

© 2014 G.R. Muradova, V.R. Abdullaev, D.U. Cherkesova, A.I. Rabadanova

Dagestan State University, Makhachkala

Chrono-dependent complex impact of cadmium, lead and manganese ions on fluorescence of blood plasma proteins and erythrocytes of motley silver carp yearling is studied. Phase adaptive changes of common (λ_{BO36} =280 nanometer) and triptofan (λ_{BO36} =295 nanometer) fluorescence of blood plasma proteins and decrease in intensity of fluorescence (λ_{BO36} =280 nanometer) of erythrocytes membranous proteins as a result of their oxidizing modification at long influence (till 30 days) are found. Results of fluorescence analysis of blood proteins give the base for indication the stages of toxic stress development.

Key words: fish, heavy metals, blood, proteins, fluorescence

Gulziya Muradova, Candidate of Biology, Associate Professor at the Department of Anatomy, Physiology, Histology. E-mail: gulka-2005@yandex.ru; Vagab Abdullaev, Candidate of Biology, Associate Professor at the Department of Biochemistry and Biophysics; Dilara Cherkesova, Doctor of Biology, Professor at the Department of Anatomy, Physiology, Histology. E-mail: boodur09@mail.ru; Amina Rabadanova, Candidate of Biology, Senior Lecturer at the Department of Anatomy, Physiology, Histology. E-mail: ashty06@mail.ru