

## Характеристика изменений в крови рыб под действием химического загрязнения среды по данным низкотемпературной $^1\text{H}$ -ЯМР спектроскопии

А. С. Горюнов\*, Г. А. Суханова, А. Г. Борисова, В. С. Сидоров

Институт биологии Карельского научного центра РАН  
185610, Петрозаводск, Пушкинская, 11

*Предложен подход к сравнительному исследованию изменений в сыворотках крови под влиянием неблагоприятных факторов внешней и внутренней среды, основанный на применении низкотемпературного  $^1\text{H}$ -ЯМР. Исследовали две группы лещей из зон, отличающихся по степени загрязненности полихлорированными бифенилами. Обнаружено, что гидратация белка в сыворотках крови рыб из очень загрязненных зон значительно выше, чем у рыб из слабозагрязненных зон. Показана связь этого явления со снижением содержания общего белка, приводящим к изменению соотношения ионной и белковой компонент сывороток. Предполагается, что следствием этого являются различия в типе взаимодействия ионов с белком в двух группах сывороток лещей, а также во влиянии этого взаимодействия на гидратацию и агрегацию макромолекул.*

**Введение.** Для эффективного мониторинга состояния среды под действием факторов различной природы необходимо использование информативных методов, позволяющих выявлять как специфические, так и неспецифические изменения в органах и системах организма. Измерение параметров ядерной магнитной релаксации ( $^1\text{H}$ -ЯМР) компонентов крови широко применяется при разработке новых методов диагностики в медицине [1—3]. К настоящему времени предложены рекомендации по использованию этого метода в клинике, изучены возможности практического применения параметров  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $T_{1,2}$ ) сыворотки крови как лабораторных показателей [4], проведены исследования по построению релаксационной модели цельной крови [5]. Это дает основания для разработки на базе ЯМР методического подхода для выявления и характеристики изменений в крови животных и человека под влиянием факторов внешней и внутренней среды.

В то же время значения времен ЯМР-релаксации  $T_{1,2}$  сыворотки крови не могут быть использованы для дифференциальной диагностики различных патологий [2, 4, 6]. Одна из причин состоит в том, что значения  $T_{1,2}$  определяются одновременно многими величинами, в первую очередь, такими, как количество ядер  $^1\text{H}$  ( $n$ ) и время корреляции ( $\tau_0$ ). Для экологических целей в предпатологических состояниях, когда деструктивные изменения в организме зачастую еще не наступили, может потребоваться и более высокая чувствительность. Вероятно, в этом случае эффективным был бы

\*Correspondence address.

метод, позволяющий оценивать по отдельности параметры, обуславливающие  $T_{1, 2}$ . Для этого мы предложили подход, основанный на независимом определении количества протонов  $n$  незамерзающей воды в сыворотках крови методом низкотемпературного  $^1\text{H}$ -ЯМР.

В качестве объекта изучения использовали сыворотку крови лещей, отловленных в зонах с различной степенью загрязнения полициклическими углеводородами. Данный объект дает хорошую возможность для выявления и характеристики изменений физико-химических свойств сыворотки, сопутствующих известным изменениям в химическом составе тканей.

**Материалы и методы.** Исследовали сыворотки крови лещей, любезно предоставленные сотрудниками лаборатории экологической биохимии Института биологии внутренних вод РАН (Борок). 25 образцов были разделены на две группы в зависимости от содержания в зоне отлова и в самой рыбе полихлорированных бифенилов (ПХБ), определенных методом хромато-масс-спектрометрического анализа. В группу 1 («чистые») включены рыбы, в тканях которых, а также в донных отложениях соответствующих зон водоема были обнаружены следовые количества либо полное отсутствие углеводородов. В группу 2 («грязные») — рыбы, в печени которых обнаружены ПХБ в количестве 1,5 мг/кг сухого остатка, а в донных отложениях соответствующих зон — в количестве 0,3 мг/кг сухого остатка. Сыворотку крови леща получали стандартным способом.

В качестве модельной системы использовали растворы сывороточного альбумина человека (САЧ) фирмы «Reanal» (Венгрия) в концентрации от 20 до 100 мг/мл в 0,01 М фосфатном буфере (рН 7,35), содержащем 0,15 М NaCl. Измерения проводили с помощью ЯМР-спектрометра Tesla BS-467 (60 МГц), снабженного стандартным термозондом с точностью поддержания температуры  $\pm 1,5$  °С.

Количество связанной воды в сыворотке определяли методом Кунтца [7, 8]: по количеству незамерзающей воды с помощью низкотемпературного  $^1\text{H}$ -ЯМР.

Метод состоит в выделении сигнала протонов незамерзающей воды посредством замораживания раствора (сыворотки). Медленный обмен между свободной водой и водой, связанной компонентами сыворотки, обуславливает появление двух линий поглощения: узкая линия связанной воды накладывается на широкую линию свободной воды. По интегральной интенсивности сигнала поглощения протонов незамерзающей воды определяется количество связанной воды с помощью сравнения с интегральной интенсивностью сигнала эталонного раствора (24 %-й LiCl, 0,1 М MnCl<sub>2</sub> в воде), не замерзающего до -50 °С и имеющего концентрацию воды 48,8 моль/л при -35 °С. Температурные зависимости количества незамерзающей воды снимали в диапазоне от -50 до -10 °С, повышая температуру от -50 °С, при которой образцы замораживали.

Общий белок в сыворотке определяли спектрофотометрически с помощью спектрофотометра Specord M-40 по разности поглощений на двух длинах волн (235 и 280 нм, [9]), поскольку неизвестен средний коэффициент экстинкции белка сыворотки при длине волны 280 нм:

$$\text{Концентрация белка (г/л)} = [(A_{235} - A_{280}) / 2,51] \cdot \text{разведение.}$$

Концентрацию белка контролировали методом Лоури. Во всех случаях данные двух методов совпадали в пределах ошибки измерений.

Результаты обрабатывали методами вариационной статистики с расчетом критерия достоверности Фишера—Стьюдента и регрессионного анализа.

**Результаты и обсуждение** Содержание белка ( $C_6$ ) в сыворотке крови лещей из загрязненных зон составило  $27 \pm 3$  г/л, из чистых —  $38 \pm 3$  г/л при  $R_{0,0,5}$ . Среднее значение  $C_6$  в сыворотке карповых составляет 43,8 г/л [10], т. е. диапазон  $C_6$  «грязных» рыб практически полностью лежит ниже этой

величины, тогда как в случае «чистых» она находится близко к середине диапазона содержания белка.

Различия между группами сывороток обнаруживаются с помощью зависимостей количеств связанной воды — концентрации связанной воды (в граммах связанной воды на 1 л сыворотки) и гидратации (в граммах связанной воды на 1 г белка) — от концентрации общего белка ( $C_6$ ) при разных температурах (рис. 1, 2). По характеру зависимости количества

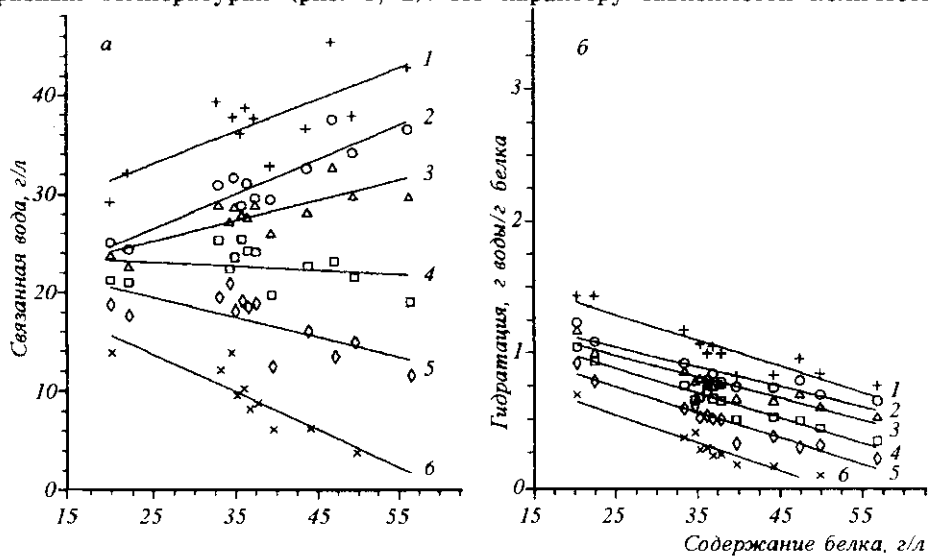


Рис. 1. Концентрация связанной воды (г связанной воды/л сыворотки) (а) и гидратация (г воды/г белка) (б) в зависимости от содержания общего белка в сыворотке крови лещей из незагрязненных зон: 1 — -10; 2 — -15; 3 — -20; 4 — -25; 5 — -30; 6 — -35 °С

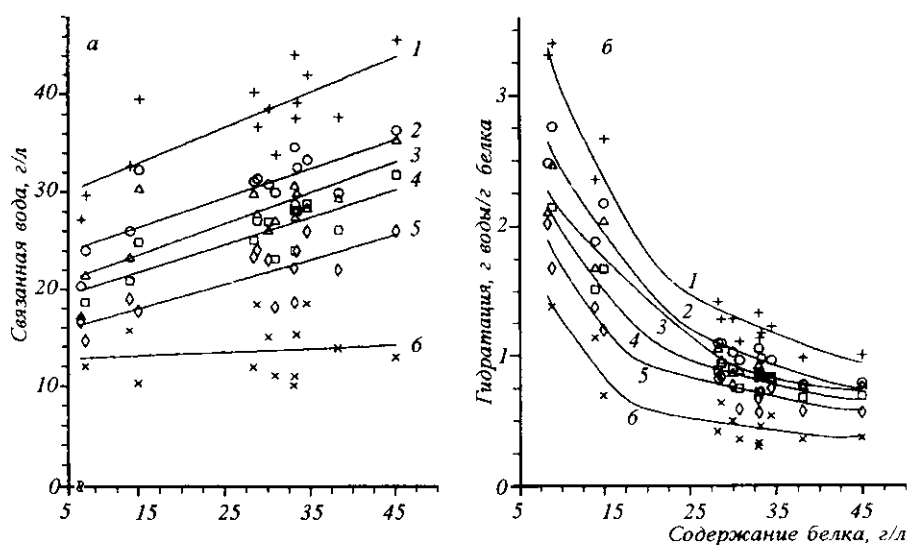


Рис. 2. Концентрация связанной воды (г связанной воды/л сыворотки) (а) и гидратация (г воды/г белка) (б) в зависимости от содержания общего белка в сыворотке крови лещей из зон, загрязненных полихлорированными бифенилами (обозначения кривых см. рис. 1)

связанной воды группы отличаются в диапазоне от  $-35$  до  $-25$  °С: у «чистых» рыб при понижении температуры концентрация связанной воды начинает уменьшаться с ростом  $C_6$ , чего не наблюдается в другой группе.

Зависимости гидратации в обоих случаях убывающие, однако отличаются по форме при всех температурах. В варианте «чистых» лещей изотермы хорошо соответствуют линейной модели и их характер не меняется с увеличением  $C_6$ . У «грязных» — с ростом содержания белка зависимость становится менее выраженной, причем имеются два разных участка с существенно различными наклонами кривой. Из данных, представленных на рис. 1, а, и 2, а, можно видеть, что по абсолютным значениям концентрации связанной воды группы отличаются незначительно, так как диапазоны изменения концентраций связанной воды (10—40 г/л) как при отдельных температурах (кроме  $-35$  °С), так и в целом совпадают. Это, на первый взгляд, не согласуется с тем, что интервалы  $C_6$  значительно смещены относительно друг друга.

Напротив, диапазоны изменения гидратации существенно различны как при отдельных температурах, так и в целом (рис. 1, б, и 2, б). Гидратация чистого белка, по данным ЯМР, как правило, не превышает 0,4—0,5 г воды на 1 г белка при  $-35$  °С [11, 12]. Это совпадает со значениями, полученными в группе «чистых» сывороток. Гидратация в нижней части интервала  $C_6$  у «грязных» рыб превышает приведенную величину в 2—2,5 раза.

Однако при повышении содержания белка до значений, соответствующих интервалу  $C_6$  «чистых» рыб, гидратация в двух группах выравнивается за счет резкого снижения гидратации в «грязных» сыворотках. При этом изотермы рис. 1, б, являются как бы продолжением изотерм рис. 2, б, составляя, таким образом, единое семейство изотерм. В отсутствие взаимодействия белков и других компонентов сыворотки гидратация не должна зависеть от  $C_6$ , поэтому уменьшение гидратации с ростом концентрации белка (рис. 1, б; 2, б) свидетельствует о существенном положительном взаимодействии, причем характер этого взаимодействия меняется, поскольку имеются два различных участка изотерм (рис. 2, б).

Чтобы проанализировать причины различий в группах и факторы, определяющие характер взаимодействия компонентов сывороток, мы исследовали модельную систему: растворы САЧ разных концентраций (рН 7,4), содержащие 0,15 М NaCl.

Результаты измерения количества связанной воды при разных содержаниях САЧ представлены на рис. 3 (а, б). Видно, что как по абсолютным величинам, так и по форме зависимостей данные для САЧ соответствуют таковым для «грязных» сывороток. Следовательно, общее в характере зависимостей для всех трех групп образцов определяется типом взаимодействий в системе {вода — ионы соли — белок}.

Эффект снижения гидратации белка с увеличением его содержания в растворе известен [13]. Он интерпретируется либо как результат гидратационных изменений в оболочке белка [14], либо как следствие конкуренции гидратных оболочек при агрегации биомакромолекул. По этим данным в концентрационном интервале, соответствующем рассматриваемому здесь, и в отсутствие соли уменьшение гидратации происходит монотонно и не имеет участков, разительно отличающихся по виду зависимости. Появление таких участков как в случае САЧ, так и в случае сывороток, очевидно, связано с присутствием соли в образцах.

Действительно, с одной стороны, соли, в частности NaCl, могут повышать растворимость белков за счет увеличения гидратации последних (всаливание). С другой стороны, показано, что тип взаимодействия [соль — белок] зависит от соотношения их концентраций и при возрастании ионной силы может переходить от дальних электростатических взаимодействий

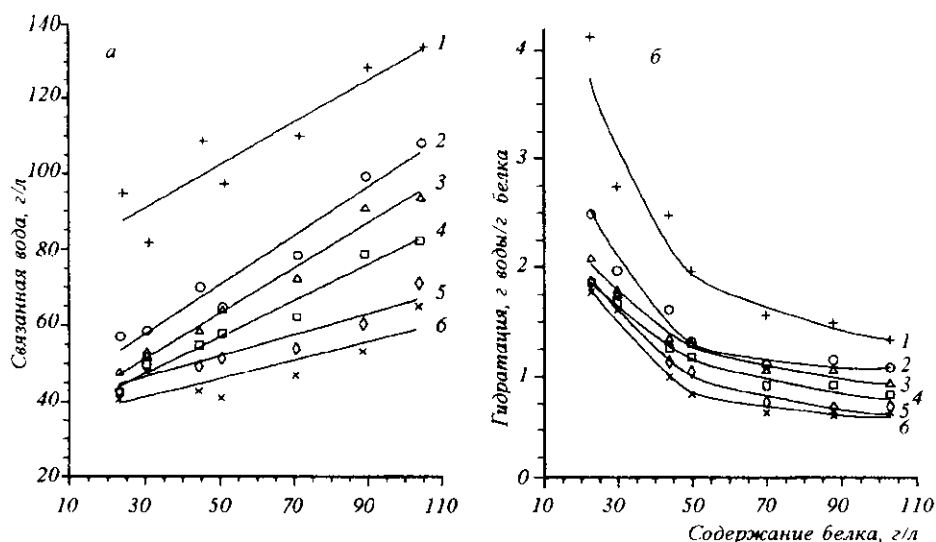


Рис. 3. Концентрация связанной воды (г связанной воды/л сыворотки) (а) и гидратация белка (г воды/г белка) (б) в растворе сывороточного альбумина человека (САЧ) (0,01 М фосфатный буфер, 0,15 М NaCl, pH 7,3) в зависимости от содержания САЧ (обозначения кривых см. рис. 1)

(< 0,1 М) к прямому взаимодействию (0,1—1,0 М) и далее к опосредованному взаимодействию (> 1,0 М) ионов соли с молекулой белка [15].

В сыворотке карповых содержание  $\text{Na}^+$  составляет 0,13 моль/л, а  $\text{Cl}^-$  — 0,08 моль/л. При средней величине  $C_6 = 44,3$  г/л и доле сывороточного альбумина (СА) 66 % [10] это соответствует 290 ионам  $\text{Na}^+$  и 180 ионам  $\text{Cl}^-$  на молекулу СА. В случае модельного раствора САЧ переход происходит при концентрации белка около 50 г/л, т. е. приходится до 200 ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$  на молекулу САЧ (в соответствии с соотношениями для сывороток).

Таким образом, можно предположить, что изменение наклона зависимости с ростом  $C_6$  в случае САЧ и «грязных» сывороток (рис. 2, б; 3, б) обусловлено изменением типа взаимодействия [белок — соль]: переходом от дальнего электростатического взаимодействия при более высоких значениях  $C_6$  к прямому — при более низких. Соответственно отсутствие особенностей на зависимости для «чистых» рыб связано с тем, что тип взаимодействия [белок — ионы соли] в этом интервале  $C_6$  не меняется.

Определяющий вклад в незамерзающую воду при  $-35$  °С вносит вода, связанная заряженными [16] и сильнополярными [12] атомными группами белковых молекул.

В то же время такие центры являются предпочтительными участками контактов белок — белок при агрегации. Вода в окрестности свободных неорганических ионов полностью вымораживается при  $-20$  °С, поэтому уменьшение концентрации связанной воды в «чистых» сыворотках при  $-35$  и  $-30$  °С (рис. 1, а) следует считать отражением преимущественной дегидратации именно заряженных и сильнополярных групп при агрегации белков сыворотки. Соответственно в «грязных» сыворотках и растворе САЧ агрегация затрагивает эти группы в меньшей степени, вероятно, из-за прямого взаимодействия многих заряженных групп с растворенными неорганическими ионами. Это проявляется в том, что зависимости (рис. 2, а) возрастают при всех температурах.

Таким образом, предложенный подход к сравнительному исследованию сывороток крови рыб, основанный на применении низкотемпературного  $^1\text{H}$ -ЯМР, позволяет выявлять изменения в крови под влиянием химического загрязнения и анализировать природу этих изменений. Вероятной причиной значительно более высокой гидратации белка в «грязных» сыворотках и растворе САЧ по сравнению с «чистыми» являются различия в характере взаимодействия [ионы соли — белок]. Тем самым, несмотря на существенные различия в содержании общего белка в сыворотках, обеспечивается поддержание в узких пределах концентрации связанной белком воды, определяющей коллоидно-осмотическое давление крови.

*О. С. Горюнов, Г. О. Суханова, А. Г. Борисова, В. С. Сидоров*

Характеристика змін у крові рыб під дією хімічного забруднення середовища за даними низькотемпературної  $^1\text{H}$ -ЯМР спектроскопії

Резюме

*Запропоновано підхід до порівняльного вивчення змін у сироватках крові під дією негативних факторів зовнішнього та внутрішнього середовища, який базується на застосуванні низькотемпературного  $^1\text{H}$ -ЯМР. Досліджували дві групи лящів із зон, які відрізняються за ступенем забруднення поліхлорованими біфенілами. Виявлено, що гідратація білка у сироватках крові рыб із забруднених зон значно вища порівняно з рибами з слабкозабруднених зон. Показано зв'язок цього явища із зниженням вмісту загального білка, що призводить до змін у співвідношенні іонної та білкової компоненти сироватки. Припускається, що наслідком цього є розбіжності у типі взаємодії іонів з білком у двох групах сироваток крові лящів, а також у впливові цієї взаємодії на гідратацію і агрегацію макромолекул.*

*A. S. Goryunov, G. A. Sukhanova, A. G. Borisova, V. S. Sidorov*

Changes in fish blood under the effect of chemical pollution studied by low-temperature  $^1\text{H}$ -NMR

Summary

*An approach to comparative studies of the changes in blood serum under the effect of internal and external environmental non-specific factors is developed on the basis of low-temperature  $^1\text{H}$ -NMR. Under investigation were two groups of breams from the zones differing in the degree of pollution with polychlorated biphenyls, or PCB. The hydration of protein in the sera of fish from heavily polluted zones was found to be significantly greater than that of weakly polluted zones. It is shown to be due to the decrease of the total protein concentration, leading to the change in the ratio between ions and protein components of serum. The assumed consequence is the difference in the type of interaction of ions with protein in two groups of bream sera as well as the influence of this interaction on the hydration and the aggregation of macromolecules.*

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Вашман А. А., Пронин Н. С. Ядерная магнитная релаксационная спектроскопия.—М.: Энергоиздат, 1986.—232 с.
2. Raeymackers H. H., Borghys D., Eisendrath H. Determination of water proton  $T_1$  in blood serum // Magn. Reson. Med.—1988.—6, N 2.—P. 212—216.
3. Зефирова Т. П., Глебов А. Н., Гурьев Э. Н., Мааляутдинов Р. С. Ядерная магнитная релаксация водных растворов белков, плазмы, эритроцитов и крови // Бюл. эксперим. биологии и медицины.—1991.— № 10.—С. 17—19.
4. Байкеев Р. Ф., Хайруллина В. Р., Зиятдинов К. М. и др. Измерение времени ЯМР- $^1\text{H}$ -релаксации сыворотки крови как метод лабораторной диагностики // Лаб. дело.—1990.— № 12.—С. 17—19.
5. Зефирова Т. П., Глебов А. Н. Ядерная магнитная релаксация в биохимическом анализе плазмы и сыворотки // Бюл. эксперим. биологии и медицины.—1992.— № 7.—С. 38—39.
6. Beall P. J., Medina D., Haselwood C. F. NMR basic principles and progress / Eds P. Diehl, E. Fluck, R. Cosfield.— New York, 1981.— Vol. 19.—P. 39—57.

7. Kuntz I. D., Brassfield T. S., Law G. D., Purcell C. V. Hydration of macromolecules // *Science*.—1969.—163.—P. 1329—1333.
8. Hays D. L., Fennema O. Methodology for determining of unfreezable water in protein suspensions by low temperature NMR // *Arch. Biochem. and Biophys.*—1982.—213.—P. 1—6.
9. Keld V. F. A new spectroscopic assay for protein in cell extracts // *Anal. Biochem.*—1977.—82, N 2.—P. 362—371.
10. Кудрявцев А. А., Кудрявцева Л. А., Привольнев Т. И. Гематология животных и рыб.—М.: Колос, 1969.—320 с.
11. Kuntz I. D., Kauzmann W. Hydration of proteins and polypeptides // *Adv. Protein Chem.*—1974.—28.—P. 239—345.
12. Rupley J. A., Carreri G. Protein hydration and function // *Ibid.*—1991.—41.—P. 37—172.
13. Cavatorta F., Fontana M. P., Velci A. Raman spectroscopy of protein-water interactions in aqueous solutions // *J. Chem. Phys.*—1976.—65, N 9.—P. 3635—3640.
14. Гасан А. И., Кашир В. А., Малеев В. Я. Термические перестройки и гидратация сывороточного альбумина // *Биофизика*.—1994.—39.—С. 588—593.
15. Максименко А. В., Морозкин А. Д., Торчилин В. П. Взаимодействие ионов соли с белковой молекулой // *Биол. науки*.—1986.— № 12.—С. 5—17.
16. Kuntz I. D., Brassfield T. S. Hydration of macromolecules. III. Effect of urea on protein hydration // *Arch. Biochem. and Biophys.*—1971.—142.—P. 660—664.