

РАЗРАБОТКА СЕНСОРНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭКОТОКСИКАНТОВ ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИХ АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ В ВОДНЫХ И БЕЛКОВЫХ СРЕДАХ

© 2019 г. О. А. Плотникова, А. Г. Мельников, Г. В. Мельников,
Е. И. Тихомирова, *Н. А. Ильина

ФГБОУ ВО «Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю. А.», г. Саратов;

*ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск

Цель исследования – изучить возможности определения экотоксикантов полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) в водных и белковых средах с использованием люминесцентной сенсорной системы на основе сывороточных альбуминов. **Методы.** Исследования проводились флуоресцентными методами, в частности методом тушения собственной флуоресценции белков, регистрации флуоресценции ПАУ и методом люминесцентного зонда пирена. **Результаты.** Экспериментально обнаружено, что при введении в растворы сывороточных альбуминов ПАУ наблюдалось общее снижение интенсивности флуоресценции белков, свидетельствующее о связывании ПАУ с белковыми макромолекулами и, вероятно, образовании нефлуоресцирующего комплекса сывороточный белок – ПАУ. Проведен анализ спектров флуоресценции ПАУ в сывороточных альбуминах. Зависимости изменения интенсивности максимумов спектров флуоресценции ПАУ в альбуминах при возрастании концентрации ПАУ имеют линейный характер, что дает возможность использовать данные системы в аналитических целях для определения экотоксикантов ПАУ в белковых и водных средах. **Выводы.** Результаты люминесцентного исследования взаимодействия ПАУ с белковыми молекулами могут найти применение в эколого-аналитическом мониторинге экотоксикантов в различных средах, а также при разработке способов ранней диагностики ряда заболеваний, связанных с воздействием на белки различных агентов.

Ключевые слова: сенсорная система, экотоксиканты, сывороточные альбумины, люминесцентный анализ

DEVELOPING A SENSOR SYSTEM FOR IDENTIFICATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS AS ENVIRONMENTAL TOXICANTS IN AQUEOUS AND PROTEIN MEDIA

O. A. Plotnikova, A. G. Mel'nikov, G. V. Mel'nikov, E. I. Tikhomirova, *N. A. Ilina

Yuri Gagarin Saratov State Technical University, Saratov, Russia; *Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russia

Aim: to investigate the possibility of identifying toxic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in aqueous and protein media using a fluorescent sensor system based on serum albumins. **Methods:** The studies were conducted using fluorescent methods, in particular, by quenching the intrinsic fluorescence of proteins, recording the fluorescence of PAHs and using the pyrene luminescent probe. **Results:** It was experimentally found that when PAHs were introduced into serum albumin solutions, a general decrease in the fluorescence intensity of proteins was observed, indicating PAHs' binding to protein macromolecules and, probably, the formation of a non-fluorescent serum protein-PAH complex. The analysis of the fluorescence spectra of PAHs in serum albumins was carried out. The dependences of changes in the intensity of the fluorescence spectra maxima of PAHs in albumins with an increase in the concentration of PAHs were linear, which makes it possible to use these systems for analytical purposes to determine toxic PAHs in protein and aqueous media. **Conclusions:** The results of the luminescent study on the interaction of PAHs with protein molecules can be used for monitoring of environmental toxicants in various media, as well as for the development of the methods for early diagnosis of diseases associated with the effect of various agents on the proteins.

Key words: sensor system, serum albumins, environmental toxicants, luminescent analysis

Библиографическая ссылка:

Плотникова О. А., Мельников А. Г., Мельников Г. В., Тихомирова Е. И., Ильина Н. А. Разработка сенсорной системы для определения экотоксикантов полициклических ароматических углеводородов в водных и белковых средах // Экология человека. 2019. № 5. С. 21–25.

Plotnikova O. A., Mel'nikov A. G., Mel'nikov G. V., Tikhomirova E. I., Ilina N. A. Developing a Sensor System for Identification of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons as Environmental Toxicants in Aqueous and Protein Media. *Ekologiya cheloveka* [Human Ecology]. 2019, 5, pp. 21-25.

К началу XXI века мировая экологическая обстановка не имеет тенденции к стабилизации, что связано с развитием транспорта, усиленной химизацией производства, накоплением токсических продуктов антропогенного происхождения. В настоящее время в результате хозяйственной деятельности в биосфере циркулирует большое число различных соединений, многие из которых имеют высокую токсичность и приводят к серьезным, часто необратимым нарушениям в организме [9, 14]. К таким веществам относятся

полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) [4]. С учетом канцерогенных и мутагенных свойств данных веществ, их способности накапливаться в организме, связываться с белками и влиять на их структуру, вызывая различные заболевания, оказывать вредное влияние даже в сравнительно низких концентрациях [11] эти химические загрязнители должны быть отнесены к числу приоритетных, мониторинг содержания которых в различных средах обязателен.

Нужно отметить, что в живом организме большинство метаболических реакций осуществляются при непосредственном участии белковых макромолекул. При этом белковые макромолекулы способны претерпевать структурные перестройки под действием различных факторов и агентов [2]. Изучение белков как основного составного элемента живой природы, а также влияния внешних факторов на белковые системы представляет собой одну из наиболее актуальных проблем науки. В условиях современной жизни особенно интересным представляется изучение неизбежного влияния на эти системы различных отрицательных факторов и токсических воздействий, среди которых особое внимание следует уделить ПАУ.

Установление биомолекулярных механизмов, подверженных влиянию экотоксикантов, позволяет определять показатели, изменение которых в биологических средах организма даёт возможность более точно и в более ранние сроки обнаружить предпатологические состояния, возникшие в результате неблагоприятного воздействия факторов среды обитания, в том числе воздействия ПАУ.

В связи с этим актуальной для современной науки является разработка эффективных методов определения данных экотоксикантов для своевременного и достоверного проведения контроля качества среды и выявления структурных изменений биомолекул для целей ранней диагностики заболеваний. Перспективными для этих целей являются люминесцентные методы [4]. В последние годы данные методы широко используются в аналитической химии и биохимических исследованиях, в клинической диагностике и для осуществления контроля за загрязнением объектов окружающей среды [1]. Это связано с рядом их достоинств: высокой чувствительностью определения, возможностью автоматизации процедур пробоподготовки и детекции, простотой и экспрессностью анализа.

Одним из вариантов люминесцентного метода является метод тушения флуоресценции [3, 10, 12, 13]. В литературных источниках показаны возможности использования тушения флуоресценции не только в различных биохимических исследованиях, но и в аналитической химии. Выход флуоресценции очень чувствителен к различным внутри- и межмолекулярным взаимодействиям, которые вызывают уменьшение эмиссии флуорофоров.

Исследование собственной флуоресценции биологических материалов не всегда позволяет получить желаемую информацию об объекте. В таком случае используют люминесцентные зонды [8]. С помощью люминесцентных зондов можно исследовать молекулярные механизмы возникновения и развития патологических процессов, действие на организм биологически активных веществ и лекарственных препаратов. Люминесцентные зонды применяются также для диагностики и прогноза развития заболеваний, выявления факторов риска и контроля эффективности лечения. Зондовая люминесценция чувствительна к структурно-функциональным изменениям в био-

логических мембранах, микровязкости ее липидного бислоя, связыванию с белками и другими веществами, структурным перестройкам в белках, изменению мембранного потенциала и др. [1]. Исследование флуоресценции зонда позволяет установить его доступность, локализацию в белках и мембранах клеток, их проницаемость для тушителей, скорость диффузии. В качестве таких люминесцентных зондов могут с успехом применяться ПАУ, поскольку они обладают собственной флуоресценцией и способны связываться с белками.

Таким образом, целью нашей работы являлось исследование возможности определения ПАУ в водных и белковых средах с использованием люминесцентной сенсорной системы на основе сывороточных альбуминов.

Методы

Работа относится к экспериментальным исследованиям. В ней использовались растворы бычьего сывороточного альбумина — БСА и сывороточного альбумина человека — САЧ (фирма «Sigma», США, с содержанием 99 % основного вещества) с концентрацией 1 мг/мл в фосфатном буфере (рН 7,4). Эти белки являются наиболее распространенными в организмах, выполняют важные физиологические функции, играют важную роль в связывании и транспорте различных веществ [7], что и определяет актуальность проведения исследований с их использованием. Готовые растворы белков хранились не более суток при температуре 4 °С.

В качестве представителей люминесцентных зондов ПАУ применялись: флуорен, антрацен и фенантрен («Sigma», США). Исходные растворы ПАУ готовились в этаноле. Рабочие растворы ПАУ в сывороточных альбуминах содержали не более 1 % этанола и анализировались не позднее 30 минут после приготовления.

Для исследований применялись флуоресцентные методы, в частности метод тушения собственной флуоресценции белков и метод регистрации флуоресценции люминесцентных зондов ПАУ. Флуоресцентные исследования проводились на флуоресцентном спектрометре LS 55 (фирма «Perkin-Elmer»). Во всех исследованиях учитывался эффект внутреннего фильтра согласно методике, описанной ранее в нашей работе [5].

Для построения графических зависимостей и обработки данных применяется статистический модуль программы Excel. Экспериментальные данные зависимостей интенсивности флуоресценции от концентрации агентов были аппроксимированы, то есть получены уравнения, описывающие представленные исходные зависимости, и оценена степень приближения. Для этих целей строились линии тренда (линейная функциональная зависимость) и автоматически определялись величины достоверности аппроксимации R^2 , то есть числа, которые отражают близость значения линии тренда к фактическим данным. Чем ближе к единице величина этого показателя, тем достовернее линия тренда.

Результаты

Первоначально экспериментально были получены спектры флуоресценции растворов сывороточных альбуминов в фосфатном буфере при pH 7,4 (рис. 1). Использовались растворы с одинаковой концентрацией белков — 1 мг/мл. Спектры регистрировались при длине волны возбуждения флуоресценции белков — 280 нм.

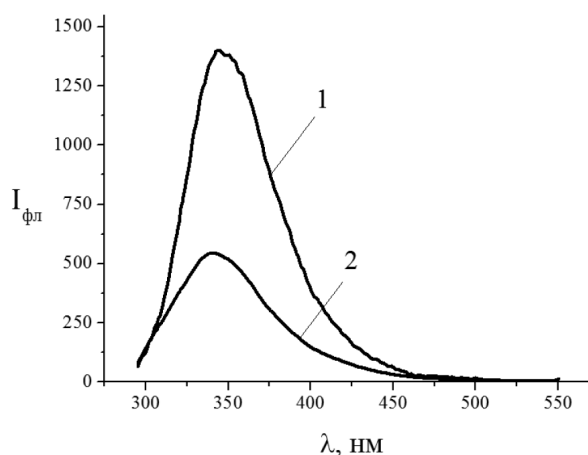


Рис. 1. Спектры флуоресценции белковых растворов БСА (1) и САЧ (2)

Выявлено, что интенсивность флуоресценции сенсорной системы на основе БСА выше, чем на основе САЧ (см. рис. 1), что обусловлено наличием двух флуоресцирующих остатков триптофановой кислоты в макромолекуле БСА, в отличие от макромолекулы САЧ, где имеется только один триптофанил.

Наличие в растворах сывороточных альбуминов различных веществ может вызвать тушение собственной флуоресценции белков, на этом основан один из методов исследования структуры белковых молекул и их взаимодействий с различными агентами [3, 10, 12, 13].

Экспериментально обнаружено, что введение в растворы сывороточных альбуминов ПАУ приводит к общему снижению интенсивности флуоресценции белков. На рис. 2 представлена графическая зависимость интенсивности флуоресценции альбуминов (на длине волны максимума спектра флуоресценции 340 нм) от концентрации ПАУ в растворах. Для всех изученных систем зависимость имеет линейный характер.

Дополнительным аналитическим сигналом в изученных биосенсорных системах могут служить флуоресцентные характеристики люминесцентных зондов ПАУ, введенных в белковые системы. Экспериментально получены характерные спектры флуоресценции ПАУ (рис. 3), которые регистрируются при длинах волн возбуждения флуоресценции данных ПАУ: для флуорена — 261 нм, антрацена — 353 нм и фенантрена — 292 нм.

Установлено, что интенсивность флуоресценции ПАУ возрастает при переходе от водных растворов к растворам сывороточных альбуминов. Это можно объяснить сорбцией молекул ПАУ белками и, как след-

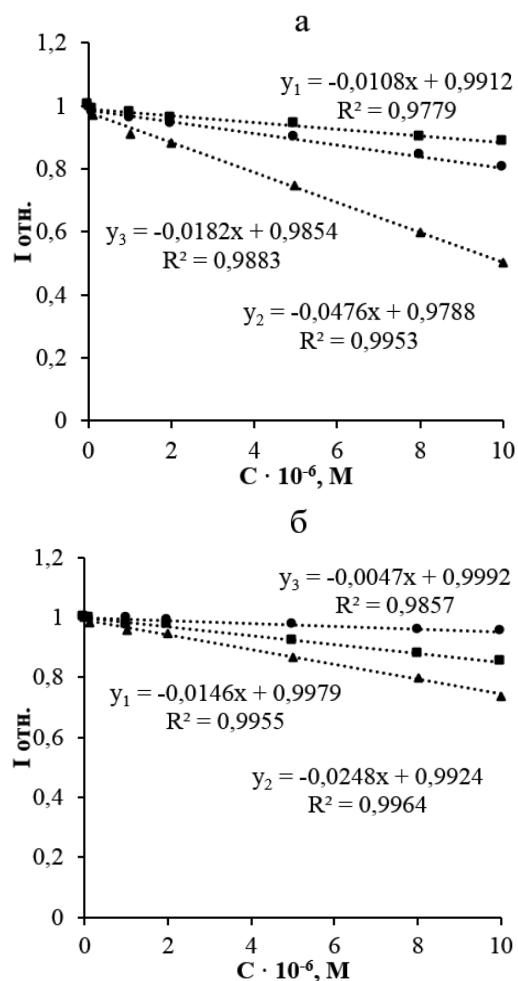


Рис. 2. Графики зависимости интенсивности флуоресценции САЧ (а) и БСА (б) от концентрации ПАУ в белковых растворах: 1 — флуорен (■), 2 — антрацен (▲), 3 — фенантрен (●)

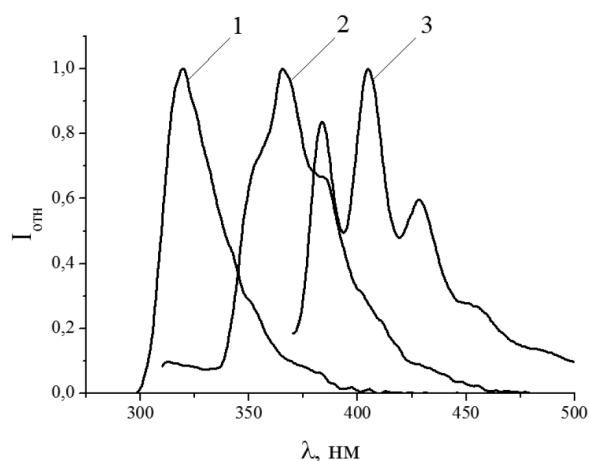


Рис. 3. Характерные спектры флуоресценции ПАУ в белковых растворах: 1 — флуорен, 2 — фенантрен, 3 — антрацен

ствие, уменьшением вероятности безызлучательной потери энергии электронного возбуждения молекул.

Выявлено, что интенсивность спектров флуоресценции данных ПАУ в белковых растворах закономерно возрастает при увеличении их содержания в растворах. На рис. 4 показаны линейные зависимости интенсивности максимумов спектров флуоресценции ПАУ (для

флуорена 312 нм, антрацена 403 нм и фенантрена 367 нм) от их концентрации в белковых системах.

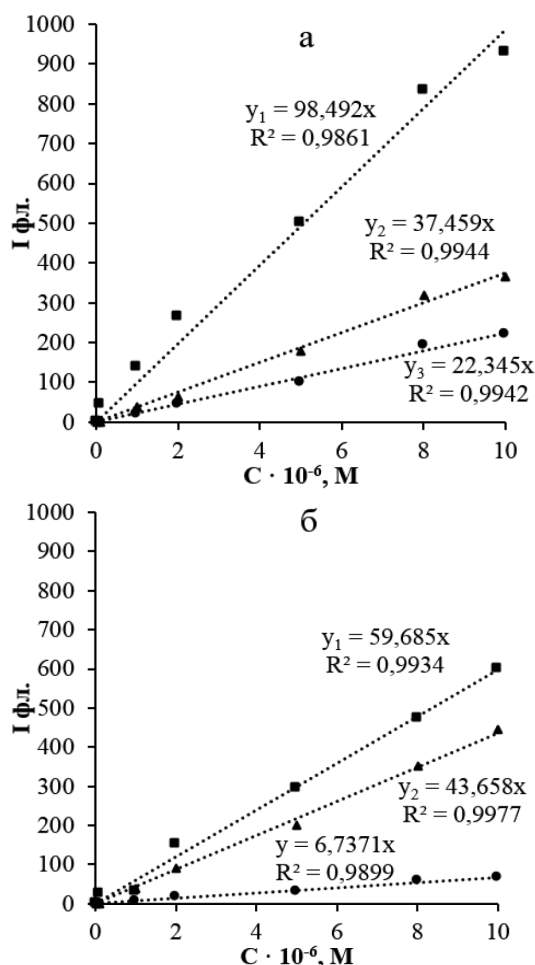


Рис. 4. Графики зависимости интенсивности флуоресценции ПАУ в растворах САЧ (а) и БСА (б) от концентрации ПАУ: 1 — флуорена (■), 2 — антрацена (▲), 3 — фенантрена (●)

Обсуждение результатов

Исходя из полученных экспериментальных результатов, можно обобщить, что интенсивность флуоресценции и положение максимумов спектров флуоресценции белков чувствительны к наличию различных агентов в биосенсорной системе и могут быть использованы в качестве аналитического сигнала данной белковой сенсорной системы.

Тушение собственной флуоресценции белков при введении в биосенсорные системы ПАУ свидетельствует о связывании ПАУ с белковыми макромолекулами и, вероятно, образовании нефлуоресцирующего комплекса белок — ПАУ [6]. При этом антрацен тушит собственную флуоресценцию белков значительнее, чем флуорен и фенантрен, что может быть объяснено тем, что сорбция молекул антрацена на белок осуществляется в непосредственной близости к триптофановым остаткам, что способствует более эффективному образованию нефлуоресцирующего комплекса и более эффективному связыванию антрацена с сывороточными альбуминами.

Значительных смещений максимумов в спектрах флуоресценции белков при введении в растворы ПАУ не наблюдалось, что свидетельствует об отсутствии структурных изменений белковых макромолекул под действием ПАУ в изученном диапазоне концентраций — от 10^{-7} до 10^{-5} М.

Таким образом, можно утверждать, что белковая система чувствительна к наличию данных агентов. Более того, можно говорить о количественном анализе, поскольку зависимость интенсивности флуоресценции белков от содержания ПАУ в данных белковых растворах имеет линейный характер. Однако следует заметить, что селективность определения ПАУ методом тушения собственной флуоресценции белков невысока, что ограничивает широкое использование данного метода в многокомпонентных системах.

Повысить селективность метода позволяет регистрация спектров флуоресценции самих ПАУ в белковых системах. Подбирая соответствующие длины волн возбуждения флуоресценции, можно получить характерные спектры флуоресценции ПАУ (см. рис. 3). Увеличение концентрации ПАУ в белковых растворах ведет к возрастанию интенсивности их флуоресценции (см. рис. 4). При этом угловые коэффициенты градуировочных графиков в растворах как САЧ, так и БСА возрастают в ряду: фенантрен, антрацен, флуорен. Данное явление свидетельствует о большей чувствительности определения флуорена предложенным флуоресцентным методом, основанным на регистрации собственной флуоресценции введенного в сенсорную систему люминесцентного зонда.

На основании проведенных исследований можно заключить, что люминесцентные методы тушения флуоресценции белков и регистрации флуоресценции люминесцентных зондов ПАУ применимы для изучения взаимодействий ПАУ с белковыми макромолекулами и являются весьма информативными.

Выявлено, что при данных концентрациях экотоксикантов (от 10^{-7} до 10^{-5} М) зависимости максимумов интенсивности флуоресценции альбуминов и ПАУ от концентрации ПАУ в белковых системах имеют линейный характер, что дает возможность использовать данные системы в аналитических целях для определения экотоксикантов ПАУ в белковых и водных средах.

Результаты работы получены в рамках выполнения государственного задания Минобрнауки России на проект № 5.3922.2017/64.

Авторство

Плотникова О. А. внесла основной вклад в концепцию исследования, получение, анализ и интерпретацию данных, подготовила первый вариант статьи; Мельников А. Г. внес существенный вклад в получение и анализ экспериментальных данных; Мельников Г. В. внес существенный вклад в концепцию исследования, обсуждение результатов, подготовку рукописи для печати; Тихомирова Е. И. внесла существенный вклад в интерпретацию данных, существенно переработала статью на предмет важного интеллектуального содержания; Ильина Н. А. внесла существенный вклад в основную концепцию исследований, окончательно утвердила присланную в редакцию рукопись.

Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

Плотникова Ольга Александровна — ORCID 0000-0003-2715-044X; SPIN 1682-8461
 Мельников Андрей Геннадиевич — ORCID 0000-0001-8662-3206; SPIN 3268-6050
 Мельников Геннадий Васильевич — ORCID 0000-0002-4708-2256; SPIN 7267-4911
 Тихомирова Елена Ивановна — ORCID 0000-0001-6030-7344; SPIN 7673-8480
 Ильина Наталья Анатольевна — ORCID 0000-0002-3724-4661; SPIN 5535-1246

Список литературы

1. Иванова С. В., Кирпиченко Л. Н. Использование флуоресцентных методов в медицине // Медицинские новости. 2008. № 12. С. 56–61.
2. Кудряшова Е. В., Гладиллин А. К., Левашов А. В. Белки в надмолекулярных ансамблях: исследование структуры методом разрешенно-временной флуоресцентной анизотропии // Успехи биологической химии. 2002. Т. 42. С. 257–294.
3. Леоненко И. И., Александрова Д. И., Егорова А. В., Антонович В. П. Аналитическое применение эффектов тушения люминесценции // Методы и объекты химического анализа, 2012. Т. 7, № 3. С. 108–125.
4. Майстренко В. Н., Ключев Н. А. Эколого-аналитический мониторинг стойких органических загрязнителей. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2004. 323 с.
5. Плотникова О. А., Мельников А. Г., Мельников Г. В., Губина Т. И. Тушение триптофановой флуоресценции бычьего сывороточного альбумина под действием ионов тяжелых металлов // Оптика и спектроскопия. 2016. Т. 120, № 1. С. 76–80.
6. Плотникова О. А., Мельников А. Г., Мельников Г. В., Коваленко А. В. Люминесцентное определение экотоксикантов в белковых средах // Химическая физика. 2017. Т. 36, № 8. С. 1–8.
7. Пшенкина Н. Н. Сывороточный альбумин: структура и транспортная функция // Биомедицинский журнал. 2011. Т. 12. С. 1067–1091.
8. Bains G., Patel A. B., Narayanaswami V. Pyrene: a probe to study protein conformation and conformational changes // *Molecules*. 2011. Vol. 16, N 9. P. 7909–7935.
9. Ellingsen D. G., Berlinger B., Thomassen Y., Chashchin M., Fedotov V., Chashchin V. Biological monitoring of welders' exposure to chromium, molybdenum, tungsten and vanadium // *Journal of Trace elements in medicine and biology*. 2017. Vol. 41. P. 99–106.
10. Keshavarz M. Interaction of pyrene with human serum albumin (HSA): A Uv-Vis spectroscopy study // *J. Phys. Theor. Chem. IAU Iran*. 2009. Vol. 6, N 2. P. 113–118.
11. Skupińska K., Misiewicz I., Kasprzycka-Guttman T. Polycyclic aromatic hydrocarbons: physicochemical properties, environmental appearance and impact on living organisms // *Acta Pol. Pharm.* 2004. Vol. 61, N 3. P. 233–240.
12. Steblecka M., Wolszczak M., Szajdzinska-Pietek E. Interaction of 1-pyrene sulfonic acid sodium salt with human serum albumin // *J. Lumin. Elsevier*. 2016. Vol. 172. P. 279–285.
13. Unguryanu T., Novikov S., Buzinov R., Gudkov A., Grjibovski A. Respiratory diseases in a town with heavy pulp and paper industry // *Epidemiologia and prevenzione*. 2010. Vol. 34, iss. 5-6. P.138.
14. Xu C. et al. Investigation on the interaction of pyrene with bovine serum albumin using spectroscopic methods // *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2014. Vol. 125. P. 391–395.

References

1. Ivanova S. V., Kirpichenok L. N. Use of fluorescent methods in medicine. *Meditsinskie novosti* [Medical News]. 2008, 12, pp. 56-61. [In Russian]
2. Kudrjashova E. V., Gladilin A. K., Levashov A. V. Proteins in supramolecular ensembles: study of the structure by the method of resolved-temporal fluorescent anisotropy. *Uspekhi biologicheskoi khimii* [Successes of biological chemistry]. 2002, 42, pp. 257-294. [In Russian]
3. Leonenko I. I., Aleksandrova D. I., Egorova A. V., Antonovich V. P. Analytical application of luminescence quenching effects. *Metody i ob'ekty khimicheskogo analiza* [Methods and objects of chemical analysis]. 2012, 7 (3), pp. 108-125. [In Russian]
4. Majstrenko V. N., Kljuev N. A. *Ekologo-analiticheskii monitoring stoikikh organicheskikh zagryaznitelei* [Ecological and analytical monitoring of persistent organic pollutants]. Moscow, BINOM, Laboratoriia znaniy Publ., 2004, 323 p.
5. Plotnikova O. A., Mel'nikov A. G., Mel'nikov G. V., Gubina T. I. Quenching of tryptophan fluorescence of bovine serum albumin under the effect of ions of heavy metals. *Ohtika i spektroskopiya* [Optics and Spectroscopy]. 2016, 120 (1), pp. 65-69. [In Russian]
6. Plotnikova O. A., Mel'nikov A. G., Mel'nikov G. V., Kovalenko A. V. Luminescence determination of ecotoxicants in protein-based media. *Russian Journal of Physical Chemistry*. 2017, 11 (4), pp. 666-672. [In Russian]
7. Pshenkina N. N. Serum albumin: structure and transport function. *Biomeditsinskii zhurnal* [Biomedical Journal]. 2011, 12, pp. 1067-1091. [In Russian]
8. Bains G., Patel A. B., Narayanaswami V. Pyrene: a probe to study protein conformation and conformational changes. *Molecules*. 2011, 16 (9), pp. 7909-7935.
9. Ellingsen D. G., Berlinger B., Thomassen Y., Chashchin M., Fedotov V., Chashchin V. Biological monitoring of welders' exposure to chromium, molybdenum, tungsten and vanadium. *Journal of Trace elements in medicine and biology*. 2017, 41, pp. 99-106.
10. Keshavarz M. Interaction of pyrene with human serum albumin (HSA): A Uv-Vis spectroscopy study. *J. Phys. Theor. Chem. IAU Iran*. 2009, 6 (2), pp. 113-118.
11. Skupińska K., Misiewicz I., Kasprzycka-Guttman T. Polycyclic aromatic hydrocarbons: physicochemical properties, environmental appearance and impact on living organisms. *Acta Pol. Pharm.* 2004, 61 (3), pp. 233-240.
12. Steblecka M., Wolszczak M., Szajdzinska-Pietek E. Interaction of 1-pyrene sulfonic acid sodium salt with human serum albumin. *J. Lumin. Elsevier*. 2016, 172, pp. 279-285.
13. Unguryanu T., Novikov S., Buzinov R., Gudkov A., Grjibovski A. Respiratory diseases in a town with heavy pulp and paper industry. *Epidemiologia and prevenzione*. 2010, 34 (5-6), p. 138.
14. Xu C. et al. Investigation on the interaction of pyrene with bovine serum albumin using spectroscopic methods. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2014, 125, pp. 391-395.

Контактная информация:

Тихомирова Елена Ивановна — доктор биологических наук, профессор, зав. кафедрой «Экология» ФГБОУ ВО «Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю. А.»

Адрес: 410009, г. Саратов, ул. Большая Садовая, д. 127
 E-mail: tichomirova_ei@mail.ru