

УДК 577.16:543:5.546:5992

ВИКОРИСТАННЯ ІНФРАЧЕРВОНОЇ СПЕКТРОСКОПІЇ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ ТКАНИН ЩУРІВ, ІНТОКСИКОВАНИХ КАДМІЄМ

Б.О. Цудзевич,¹ д. біол. н., І.В. Калінін,¹ к. біол. н., В.В. Лівенцов,² А.Ю. Коцюк¹

¹ Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна

² Лабораторія фізико-хімічних методів аналізу ПАТ НВЦ "Борщагівський ХФЗ", Україна

РЕЗЮМЕ. У роботі наведено результати дослідження інфрачервоних спектрів поглинання компонентів тканин печінки і нирок щурів, інтоксикованих кадмієм.

Ключові слова: кадмій, печінка, нирки, щури, інфрачервона спектроскопія.

РЕЗЮМЕ. В работе приведены результаты исследования инфракрасных спектров поглощения компонентов в тканях печени и почек крыс при интоксикации кадмием.

Ключевые слова: кадмий, печень, почки, крысы, инфракрасная спектроскопия.

SUMMARY. The data of researches of the infrared absorption spectra of the components in the liver and kidneys of rats poisoned with cadmium are shown in this article.

Key words: cadmium, liver, kidneys, rats, infrared spectroscopy.

Проблема визначення змін окремих біохімічних показників та процесів під впливом негативних факторів довкілля для збереження параметрів цілісного стану і забезпечення функціонування біологічних систем є досить актуальною.

Інфрачервоні характеристики тканин показують сумарний спектр, в якому відбувається накладання смуг поглинання різноманітних функціональних груп органічних речовин, а також води. Позитивною особливістю методу інфрачервоної спектроскопії є те, що смуги поглинання одного і того ж виду коливань атомної групи речовин розміщуються у певному діапазоні інфрачервоного (ІЧ) спектра. Число характеристичних смуг поглинання атомних груп, їх інтенсивність, положення максимумів на ІЧ-спектрах, дають уяву про будову сполуки або про компонентний склад речовин, взаємодію макромолекул біологічних систем в умовах різноманітних патологій [1, 2].

Одним з важливих параметрів є структура білків, яка обумовлює ферментативні, антигенні та транспортні функції білків. Порушення конформації білків веде до втрати їх функціональної активності. Повна інформація про структуру індивідуального білка закладена в амінокислотній послідовності. В залежності від типу амінокислотних залишків формується

вторинна структура або просторова орієнтація основного поліпептидного ланцюга, що залежить від бокових радикалів. Всі типи вторинної структури білків стабілізовані водневими зв'язками між амідними та карбонільними групами.

Найчастіше в структурі білків зустрічається конформація типу α -спіралі — стійкої структури, що утворюється завдяки повороту площини пептидної одиниці навколо С — атомів. Водневі зв'язки формуються вздовж осі α -спіралі і є внутрішньомолекулярними. Оскільки не всі амінокислоти здатні утворювати α -спіраль, то очевидно, що вона не може існувати по всій довжині поліпептидного ланцюга.

Приблизно 15-20% відсотків просторової укладки поліпептидного ланцюга складають β -складчасті структури паралельного і антипаралельного типу. Конформація β -складок утворена витягнутими поліпептидними ланцюгами, з'єднаними між собою поперечними міжланцюговими водневими зв'язками, які розміщені майже перпендикулярно до осі поліпептидного ланцюга. В залежності від напрямку від N- до С- кінців двох зв'язаних між собою ланцюгів, β -структури є паралельними або антипаралельними. Паралельні β -складки є більш регулярними, витягнутими і плоскими. Антипаралельні β -складки, як правило, утворюють скручені видовжені структури [3-5].

До уваги читачів:

На сторінці 37 (№ 2, 2012 "Современные проблемы токсикологии") таблиця 2, 2-й стовпчик, перший рядок надруковано: "Вміст ТБК-активних продуктів", правильно: "Вміст дієнових кон'югатів (E233/E218)".

На сторінці 97 (№ 3-4, 2012 "Современные проблемы токсикологии") під малюнком 3 слід читати: "Спектри озолоного залишку тканин печінки".

Редакційна колегія приносить вибачення за допущені неточності.

Уздовж поліпептидного ланцюга можуть формуватись так звані реверсивні повороти, коли водневий зв'язок утворюється між атомами O і N. Реверсивні повороти часто зустрічаються у конформації глобулярних білків, де вони становлять приблизно 25% відсотків. Крім вищезгаданих, в укладці поліпептидних ланцюгів реєструються нерегулярні ділянки — гнучкі, динамічні неупорядковані структури.

Для вивчення вторинної структури макромолекул широко застосовується метод інфрачервоної спектроскопії, який базується на коливаннях атомів у молекулі та дає важливу інформацію як про конформацію молекул, так і про міжмолекулярні зв'язки [6, 7]. При поглинанні світла збуджуються коливання атомних ядер, які відбивають зв'язки і структурне розміщення атомів у молекулі. Отже, існує взаємозв'язок між типом вторинної структури і коливаннями певних груп.

Значний інтерес представляє вивчення вторинної структури в області пептидної смуги, яка зумовлена коливаннями карбонільних груп пептидного зв'язку. Довжина зв'язку CO в пептидній групі дорівнює $1,24\text{\AA}$, що більше довжини подвійного, але менше одинарного зв'язку. В область амідних коливань потрапляє смуга поглинання іонізованого карбоксилу COO^- , який істотно впливає на укладку поліпептидних ланцюгів і має максимум поглинання при довжині хвиль $1610 - 1615\text{ см}^{-1}$. Ця смуга відповідає симетричним і асиметричним коливанням трьохатомної групи. Смуга іонізованої COO^- групи може реєструватись при частоті 1645 см^{-1} . В інтервалі довжини хвиль $1700 - 1680\text{ см}^{-1}$ виявляються смуги поглинання, обумовлені коливаннями, при яких сильно змінюється довжина зв'язку CO.

Метою даної роботи були дослідження інфрачервоних спектрів поглинання компонентів тканин шурів, інтоксикованих кадмієм.

Матеріали та методи. Дослідження проводили на білих нелінійних щурах-самцях одного віку, масою 180–200 г, яких утримували у звичайних умовах віварію. Було утворено дві групи тварин: перша — інтактні (контроль), друга — тваринам перорально вводили розчин кадмію сульфату в дозі 1,5 мг/кг, що становить $1/30$ від LD_{50} . Інтоксикацію проводили впродовж 14 діб, потім шурів декапітували під ефірним наркозом і відбирали тканини печінки і нирок для подальших досліджень. Робота проводилась відповідно до конвенції Ради Європи щодо захисту тварин, яких використовують у наукових цілях.

Спектроскопічні дослідження виконано на ІЧ-Фур'є-спектрофотометрі "Nicolet 380" фірми Thermo electron corporation. Всі спектри отримано за допомогою приставки на відбиття

світла від зразка, робочий діапазон довжини хвиль $650 - 4000\text{ см}^{-1}$, спектри записували з кроком 4 см^{-1} .

Отримані спектри поглинання обробляли за допомогою спеціально розроблених програм [8, 9]. Кожна смуга поглинання охарактеризована положенням у спектрі, тобто точно визначеним максимумом частоти поглинання та інтенсивністю — шириною і висотою. Для кількісної характеристики спектрів розраховували похідну другого порядку і обчислювали інтегральну інтенсивність, що являє собою площу під кривою поглинання.

Кількісний вміст різних типів вторинної структури обчислювали шляхом розкладу сумарних спектрів поглинання на окремі компоненти і визначення процентного (%) відношення площі кожного компонента відносно площі під сумарною кривою.

Для статистичної обробки даних застосовували метод ідентифікації компонент складової спектрів у класі гаусівських і лоренцевих кривих з використанням алгоритму диференціювання, закон нормального або гаусівського розподілу, тобто оригінальний складний спектр розкладали на суму кривих Гауса. Фізичному розподілу відповідає розподіл Лоренца. Визначали також коефіцієнт асиметрії, що показує відхилення від симетрії, тобто зміщення відносно середніх значень та характеристику скупченості або розсіювання даних.

Результати та обговорення. На рис. 1 і 2 представлено оригінальний інфрачервоний спектр поглинання компонентів тканин печінки і нирок інтактних тварин, видно, що спектрограма має форму кривої зі смугами поглинання різного ступеня інтенсивності. В досліджуваному діапазоні частот реєструються смуги поглинання з максимумами при довжині хвиль 1616 см^{-1} , 1632 см^{-1} , 1650 см^{-1} , 1659 см^{-1} , 1667 см^{-1} , 1677 см^{-1} , 1688 см^{-1} , 1696 см^{-1} . Найбільш інтенсивними із них є смуги при частоті 1650 см^{-1} , 1659 см^{-1} .

Максимальна за інтенсивністю смуга поглинання на частоті 1650 см^{-1} є характерною для α -спіральної конфігурації поліпептидного ланцюга. Максимальна інтенсивність цієї смуги поглинання в порівнянні з іншими є свідченням того, що в просторовій структурі компонентів печінки і нирок переважає α -спіральна просторова структура. Підтвердженням цього є наявність смуги поглинання з максимумом поглинання при довжині хвилі 1659 см^{-1} .

Для конформації білків типу β -складчатих структур смуга дає поглинання в інтервалі довжини хвиль від 1640 см^{-1} до 1620 см^{-1} . Для компонентів печінки інтактних тварин реєструються смуги поглинання з максимумами при частоті 1622 см^{-1} , 1627 см^{-1} , 1633 см^{-1} . Сюди

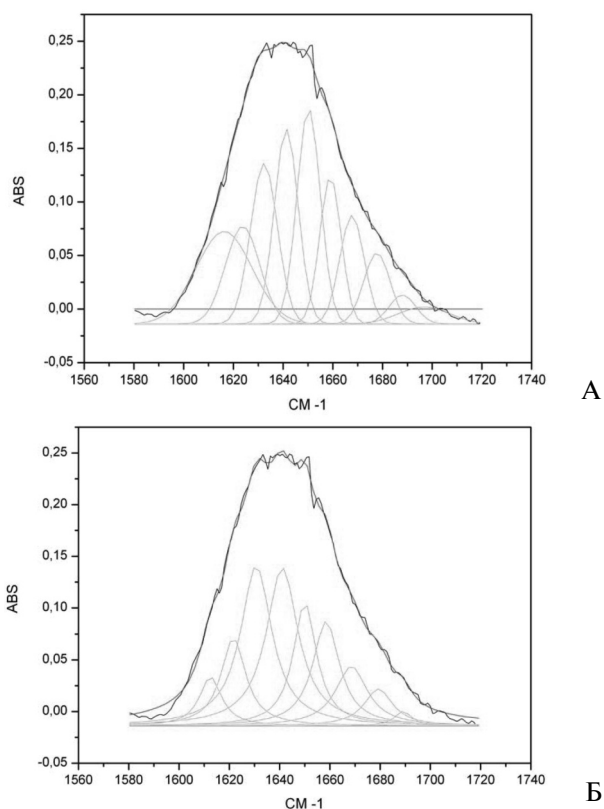


Рис. 1. Інфрачервоний спектр тканин печінки інтактних щурів з розподілом Гауса (А) і розподілом Лоренца (Б).

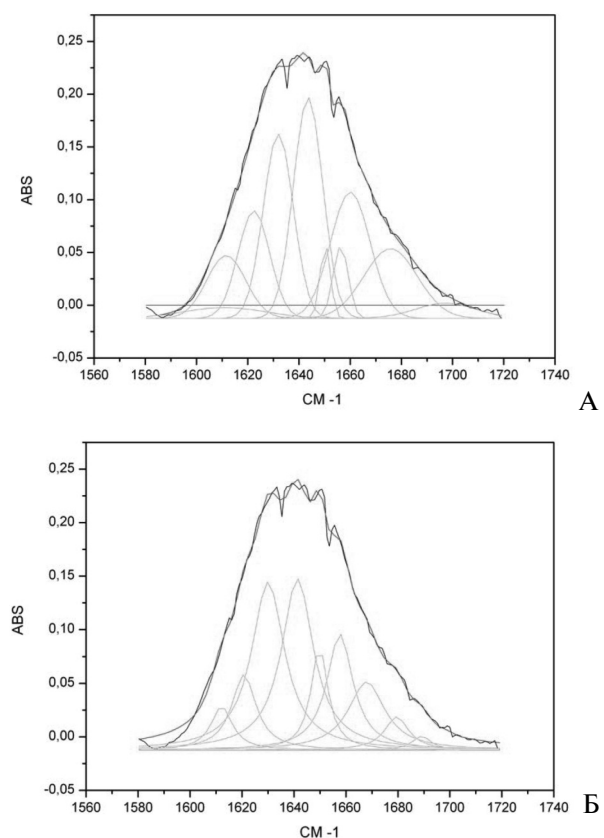


Рис. 2. Інфрачервоний спектр тканин нирок інтактних щурів з розподілом Гауса (А) і розподілом Лоренца (Б).

можна віднести смугу поглинання з максимумом при 1645 cm^{-1} . В діапазоні частот 1640 cm^{-1} — 1620 cm^{-1} поглинають β -структури антипаралельного типу. На жаль, за допомогою методу ІЧ-спектроскопії не можна чітко розмежувати область поглинання β -структур паралельного і антипаралельного типу. В діапазоні 1625 cm^{-1} — 1639 cm^{-1} можуть виявлятися смуги поглинання пов'язані з паралельними-складчастими структурами, які є дуже короткими і включають від 3 до 12 амінокислотних залишків. При частоті 1676 cm^{-1} реєструється смуга поглинання, обумовлена β -структурами паралельного типу. Наявність смуги поглинання слабкої інтенсивності з максимумом при 1680 cm^{-1} однозначно засвідчує антипаралельну β -упаковку поліпептидного ланцюга.

Таким чином, отримані результати дозволяють зробити висновок, що в білках печінки інтактних тварин поліпептидні ланцюги мають здебільшого структури β -складок антипаралельного типу.

Смуга поглинання з максимумом при довжині хвилі 1660 cm^{-1} викликана коливаннями нерегулярних аморфних структур. Однак, не виключено, що частина цієї смуги обумовлена коливаннями паралельних β -складок поліпептидних ланцюгів.

У діапазоні частот від 1680 cm^{-1} до 1670 cm^{-1} смуги поглинання є наслідком коливань, при яких змінюється довжина зв'язку карбонільної групи. З цими коливаннями пов'язані нерегулярні ділянки у структурі білків. У цьому інтервалі спектра реєструються смуги поглинання з максимумами при 1690 cm^{-1} і 1696 cm^{-1} . У діапазоні спектра 1670 cm^{-1} — 1688 cm^{-1} реєструються поглинання компонентів печінки і нирок, обумовлені наявністю реверсивних поворотів у певних сегментах поліпептидних ланцюгів.

Отже, у просторовій структурі компонентів печінки та нирок інтактних тварин наявні всі форми вторинних структур — α -спіраль, β -складки паралельного і антипаралельного типу, реверсивні повороти та нерегулярні або аморфні ділянки. Смуги поглинання окремих типів структури частково перекриваються. Слід зазначити, що білки печінки мають здебільшого просторову конфігурацію типу β -структур при певній кількості α -спіральних та неупорядкованих сегментів [10, 11].

На рис. 3 і 4 представлено спектр поглинання тканин печінки і нирок щурів, інтоксикованих кадмієм, видно, що спектрограма має форму, подібну до контрольної кривої. В основному, всі смуги поглинання, характерні для спектра печінки та нирок інтактних тварин, виявляються на спектрограмах тварин інтоксикованих кадмієм. У той же час виявляються і відмінності, які полягають у зміщенні макси-

мумів смуг поглинання, появи або зникненні окремих смуг, посиленні або зниженні інтенсивності існуючих смуг поглинання.

При порівнянні спектрограм, представлених на рис. (1,2 і 3,4), виявлено значне посилення інтенсивності смуг поглинання з максимумами на частоті 1624 см^{-1} , 1650 см^{-1} на кривих поглинання компонентів печінки тварин, інтоксикованих кадмієм. Стабільна інтенсивність смуги поглинання з максимумом при 1633 см^{-1} обумовлена коливанням як плоскими витягнутими, так і скрученими β -складчастими структурами.

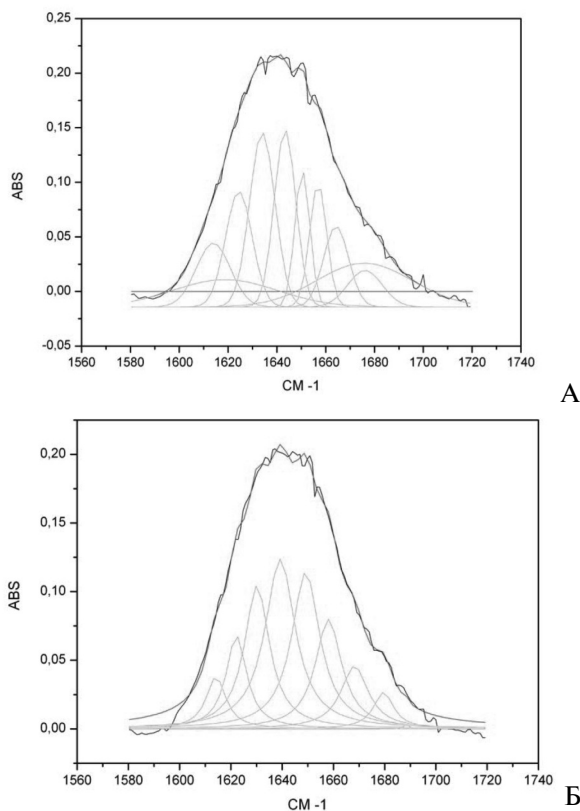
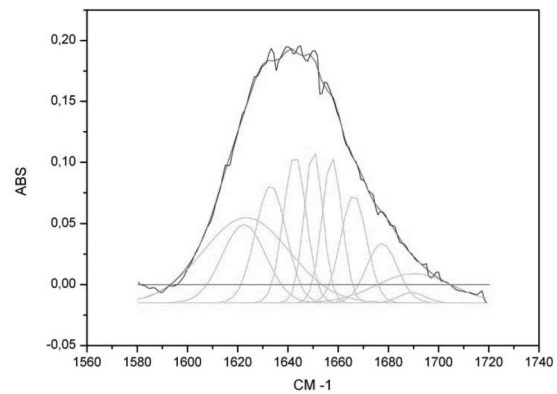
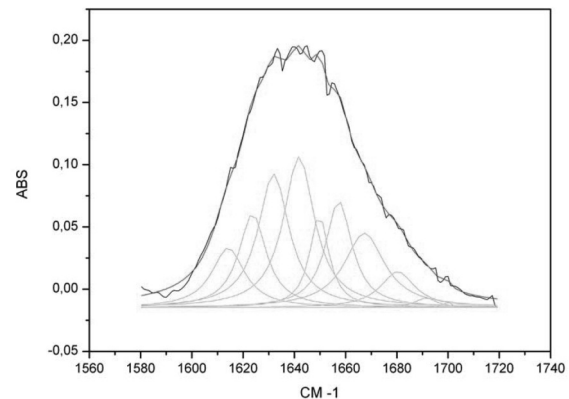


Рис. 3. Інфрачервоний спектр тканин печінки інтоксикованих кадмієм щурів з розподілом Гауса (А) і розподілом Лоренца (Б).

Для більш глибокого якісного і кількісного аналізу спектрограм використано закон нормального розподілу Гауса та розподілу Лоренца, згідно з яким кожен складну криву з багатьма перекриваючими одна одну смугами можна розкласти на суму окремих кривих. Кількість кривих довільно вибрано рівною 10. На рис. 1-4 (А), де представлено розподіл кривих Гауса для спектрів крові інтактних і дослідних тварин, чітко видно значні відмінності спектрограм. Змінюється не тільки форма кривої, але й її суть. Для спектра компонентів печінки та нирок інтоксикованих тварин характерна більш згладжена форма із смугами поглинання приблизно однакової інтенсивності. Слід зазначити, що смуга з макси-



А



Б

Рис. 4. Інфрачервоний спектр тканин нирок, інтоксикованих кадмієм щурів з розподілом Гауса (А) і розподілом Лоренца (Б).

мальною інтенсивністю у контрольних тварин на частоті 1650 см^{-1} значно знижується у тварин, інтоксикованих кадмієм. Змінюється також щільність розподілу кривих у певних діапазонах спектру.

При порівнянні кривих Лоренца (рис. 1-4 (Б)) спостерігається більш згладжена форма спектрограми і зниження інтенсивності майже усіх смуг поглинання компонентів тканин печінки і нирок у щурів, інтоксикованих кадмієм. Зареєстровано також зміщення на декілька см^{-1} максимумів смуг для довжини хвилі 1650 см^{-1} .

Аналізуючи відносний вклад окремого типу вторинних структур у сумарну просторову конформацію, слід зазначити, що найбільший внесок (22,8% відсотків) становлять β -складчасті структури для білків печінки інтактних тварин. Реверсивні повороти та неупорядковані структури складають 12,4% та 19,3%, відповідно.

Різницю між спектральними характеристиками печінки і нирок, інтактних тварин і тварин, інтоксикованих кадмієм, можна продемонструвати за допомогою статистичних показників — скупесу і куртозису [12].

Висновок. Дослідження інфрачервоних спектрів поглинання печінки і нирок виявили значні відмінності в просторовій структурі

компонентів інтактних та інтоксикованих кадмієм тварин. Встановлено, що у просторовій структурі білків печінки і нирок наявні всі форми вторинних структур: α -спіраль, β -складки, реверсивні повтори і неупорядковані або аморфні ділянки. При порівняльному аналізі спектрограм інтактних і дослідних тварин показано значні відмінності, які поляга-

ють у зміщенні максимумів смуг поглинання, збільшенні або зниженні інтегральної інтенсивності, появі або зникненні смуг. При інтоксикації кадмієм відбувається деспіралізація поліпептидних ланцюгів, трансформація регулярних структур у неупорядковані сегменти. Одержані результати можуть бути використані в подальших клінічних дослідженнях.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гордецов А.С. Инфракрасная спектроскопия биологических жидкостей и тканей / А.С. Гордецов // *Соврем. техн. мед.* — 2010. — № 1. С. 84–98.
2. Зубарева Г. М. Анализ состояния биологических систем с помощью ИК-спектроскопии: Автореф. дис. ... д-ра. биол. наук — М., 2005. — 44 с.
3. Шульц Г. Принципы структурной организации белков / Г. Шульц, Р. Ширмер — М.: Мир, 1982. — 360 с.
4. Каргаполов А.В. Новые подходы к определению целостного состояния биологически активных систем / А.В. Каргаполов, Г.М. Зубарева. — Тверь, 2006. — 184 с.
5. Колебательные спектры многоатомных молекул / А.Н. Аношин, Е.А. Гасилович, Т.С. Коптева [и др.] / [под ред. Я.М. Колотыркин]. — М.: Наука, 1986. — 282 с.
6. Carpenter J.F. An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins / J.F. Carpenter, J.H. Crowe // *Biochemistry.* — 1989. — Vol. 28, № 5. — P. 3916–3922.
7. Kong J. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures / J. Kong, Y.U. Shaoning // *Acta Biochimica et Biophysica Sinica.* — 2007. — Vol. 39, № 8. — P. 549–559.
8. Ремизов А.Н. Медицинская и биологическая физика / А.Н. Ремизов, А.Г. Максина, А.Я. Потапенко. — М.: Дрофа, 2003. — 560 с.
9. Бернштейн И.Я. Спектрофотометрический анализ в органической химии / И.Я. Бернштейн, Ю.Л. Каминский. — Л.: Химия, 1986. — 200 с.
10. Surewicz W.K. New insight into protein secondary structure from resolution — enhanced infrared spectra / W.K. Surewicz, H.H. Mantch // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1988. — Vol. 952. — P. 115–130.
11. Susi H. Fourier Transform Infrared Study of Proteins with Parallel α -Chains / H. Susi, D.M. Byler // *Archives of Biochemistry and Biophysics.* — 1987. — Vol. 258. — № 2. — P. 465–469.
12. Многомерный статистический анализ / Л.А. Сошникова, В.Н. Тамашевич, Г. Уебе [и др.]. — М.: ЮНИТИ–ДАНА, 1999. — 598 с.

Надійшла до редакції 5.11.2012 р.