# НЕЛИНЕЙНАЯ И КВАНТОВАЯ ОПТИКА

УДК 535.37

# СПЕКТРАЛЬНО-ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ТОКСИЧЕСКОГО ВЛИЯНИЯ ХЛОРОРГАНИЧЕСКИХ ПЕСТИЦИДОВ НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ СИНАПТОСОМ

© 2017 г. К. М. Гираев<sup>\*,\*\*</sup>, К. С. Бекшоков<sup>\*</sup>, Н. А. Ашурбеков<sup>\*</sup>, Н. М. Абдуллаева<sup>\*</sup>, Э. Х. Исрапов<sup>\*,\*\*</sup>, И. Ш. Гашимов<sup>\*</sup>

\* Дагестанский государственный университет, 367000 Махачкала, Дагестан, Россия \*\* Институт физики им. Х.И. Амирханова Дагестанского научного центра РАН, 367003 Махачкала, Дагестан, Россия E-mail: nashurb@mail.ru Поступила в редакцию 18.07.2016 г.

Впервые приводятся результаты исследования спектров флуоресценции суспензий синаптосом при различных сроках воздействия хлорорганического пестицида тиаметоксам в концентрации 50 ПДК, полученных на длинах волн возбуждения/эмиссии  $290 \pm 5/310-600$ ,  $340 \pm 5/360-700$  и  $420 \pm 5/450-800$  нм. Показано, что развитие процессов интоксикации приводит к ослаблению интенсивности флуоресценции триптофана, NAD(P)<sup>•</sup>H, производных витамина B<sub>6</sub> и витамина A, а также к росту свечения пиридоксиновой кислоты, липофусцина, флавиновых и порфириновых комплексов. Результаты спектральных исследований свидетельствуют в пользу свободнорадикальной модели токсического действия хлорорганического пестицида на функционирование живых систем.

DOI: 10.7868/S0030403417030096

### введение

На сегодняшний день различные методы флуоресцентной спектроскопии нашли широкое применение в медико-биологических исследованиях в качестве аналитических и диагностических методов вследствие их высокой чувствительности, универсальности, относительной простоты технической реализации, а так же возможности проведения in situ исследований [1-4]. В частности, использование спектрально-флуоресцентных методов для решения задач диагностики и мониторинга патологических состояний (отклонений от нормы) биотканей основано на анализе зависимости параметров свечения эндогенных флуорофоров от их микроокружения, концентрации, пространственной и электронной структуры, степени их агрегации, сдвига рН-баланса и др. [4-6]. Соответствующие био- и физико-химические реакции, вызванные развитием патологии, приводят к существенным изменениям в характеристиках флуоресценции (интенсивности, спектральном распределении, кинетики затухания, поляризации и др.), что открывает широкие возможности для обнаружения самых ранних изменений функциональной активности биотканей исследуемых структур. Систематизированные данные о высокой эффективности методов флуоресцентной спектроскопии в клинических исследованиях различных заболеваний, включая процессы малигнизации органов брюшной полости, грудной клетки и полости рта, сосудов, суставов и кожных покровов, приведены в многочисленных оригинальных работах и аналитических обзорах [2–10].

Согласно данным Ассоциации всемирной охраны здоровья (ВОЗ), в жизнедеятельности человека используются свыше 100 различных токсичных препаратов, в числе которых наряду с тяжелыми металлами присутствуют фосфорорганические и хлорорганические пестициды. Характерная особенность циркуляции этих элементов в окружающей среде объясняется их устойчивостью, биологической доступностью, а так же способностью к аккумуляции и высокой токсичностью, приводящей к острым токсиколого-экологическим ситуациям и ухудшению основных медикодемографических показателей состояния здоровья населения [11, 12]. Эта ситуация характерна, в частности, и для прибрежных зон Каспийского моря и Прикаспийской низменности. являющихся конечным бассейном воздействия множества антропогенных факторов, включая интенсивное развитие сельского хозяйства, сбросы неочищенных промышленных, сельскохозяйственных и коммунально-бытовых отходов и вынос их с речными стоками. Накапливаясь в среде, хлорорганические пестициды проникают и аккумулируются в различных тканях внутренних органов и могут стать причиной развития тяжелых форм патологии. Известно, что хронические воздействия малых концентраций пестицидов приводят к глубоким патоморфологическим и патофизиологическим нарушениям крови, нервной ткани, печени и почек, к нарушению репродуктивной функции и развитию процессов малигнизации [11–13].

С учетом вышеизложенного особую актуальность приобретает выполнение экспериментальных и теоретических исследований, направленных на развитие качественного и количественного анализа биологических систем в условиях воздействия веществ повышенной токсичности. Использование в этих целях различных методов флуоресцентной спектроскопии, в силу указанных выше преимуществ, позволило бы улучшить чувствительность и временное разрешение диагностического процесса и, в конечном итоге, развить систему мониторинга окружающей среды.

Целью данной работы является проведение спектроскопических исследований токсического влияния пестицидов группы неоникотиноидов на биохимические свойства клеток нервной ткани. При этом были решены следующие задачи:

 измерены спектры стационарной флуоресценции синаптосом в норме и на разных сроках хронической интоксикации хлорорганическим пестицидом,

 проведен спектральный анализ полученных данных и определены потенциальные группы эндогенных флуорофоров.

По результатам спектральных исследований выявлена динамика важнейших биохимических параметров и обсуждается возможный механизм воздействия токсиканта на спектрально-флуоресцентные свойства синаптосом.

# МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Моделирование эффекта хронической интоксикации проводилось на 15 особях обоего пола карпа обыкновенного (*Cyprinuscaprio L.*) примерно равного возраста и веса, выращенных в прудах ОАО "Широкольский рыбокомбинат" Республики Дагестан. Затравка биообъектов осуществлялась следующим образом: отобранные по 5 особей рыбы помещались в 3 аквариума, каждый объемом 200 литров с постоянной аэрацией и температурой примерно 21°С. При этом в 2 аквариума предварительно добавлялся раствор хлорорганического пестицида "Актара" (тиаметоксам, ПДК = 0.01 мг/л) в концентрации 50 ПДК, что составило примерно 0.5 мг/л.

На 15 и 30 сутки затравки особи рыб извлекались из аквариумов и далее проводилось выделение синаптосом мозга рыб на ультрацентрифуге модели OPTIMAL-90KCE (Beckman Coulter, США) по методу дифференциального центрифугирования в условиях градиента плотности сахарозы [14]. Таким образом были получены три группы объектов исследования:

 5 образцов суспензий синаптосом, полученных от 5 рыб, содержащихся в воде без добавления пестицида (контрольные образцы),

 5 образцов суспензий синаптосом, полученных от 5 рыб, содержащихся в течение 15 суток в аквариумах с добавлением тиаметоксама в концентрации 0.5 мг/л (средняя степень интоксикации),

– 5 образцов суспензий синаптосом, полученных от 5 рыб, содержащихся в течение 30 суток в аквариумах с добавлением тиаметоксама в концентрации 0.5 мг/л (высокая степень интоксикации).

Полученные образцы биосред помещались в отдельные кварцевые кюветы, которые хранились при температуре  $+4^{\circ}$ С до начала проведения экспериментальных измерений. В последующем все спектрально-флуоресцентные исследования проводились в равновесных условиях при комнатной температуре в пределах  $21 \pm 2^{\circ}$ С.

Измерение спектров стационарной флуоресценции  $F(\lambda)$  проводилось на спектрометрическом комплексе в интервале ллин волн 200-1100 нм с использованием волоконно-оптической системы доставки и сбора оптического излучения. Возбуждение спектров флуоресценции осуществлялось на длинах волн  $290 \pm 5, 340 \pm 5$  и  $420 \pm 5$  нм посредством излучения 150 Вт ксеноновой лампы, совмещенной с монохроматором МДР-206 (ООО "ЛОМО-ФОТОНИКА", г. Санкт-Петербург). В качестве волоконно-оптической системы использовался Ү-образный измерительный зонд, состоящий из двух "рукавов" (передающего и принимающего) и контактного катетера, в котором коаксиально размещались световодные каналы. Волоконные световоды, формирующие центральный канал зонда (19 волокон диаметром 200 мкм и числовой апертурой 0.22) предназначались для подведения возбуждающего излучения к образцу, а световоды, расположенные по периферии (108 волокон диаметром 200 мкм и числовой апертурой 0.22), служили для сбора сигналов флуоресценции и передачи их к спектрографу. Оптическая схема катетера построена таким образом, что на поверхности образца участок возбуждения фотосигналов имел размер около 2–3 мм. а участок регистрации равномерно перекрывал его и был примерно в 1.5-2 раза больше, что позволило регистрировать фотоны флуоресценции, испущенные как из области непосредственного освещения, так и вышедшие за ее пределы. При этом нормировка интенсивности возбуждающего излучения проводилась с использованием нейтральных светофильтров по величине ее отражения от референсной пластинки WS-2 (Avantes, Нидерланды, отражение >96% в интервале длин волн 250–2500 нм).

Спектральный анализ фотосигналов осуществлялся при помощи автоматизированного монохроматора/спектрометра MS3504i (дифракционная решетка 200 штр/мм, обратная линейная дисперсия 14.5 нм/мм; SOL-Instruments, Белоруссия) и ПЗС-камеры HS-101(HR)-2048 × 122 (16-бит, 2048 × 64 пикс., спектральная чувствительность 200–1100 нм; Нататаtsu, Япония), совмещенной с персональный компьютером. Таким образом, измерения спектров флуоресценции суспензий синаптосом осуществлялись в трех спектральных диапазонах возбуждения/эмиссии –  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} \sim 290 \pm 5/310-600$  нм,  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} \sim 340 \pm 5/360-700$  нм и  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} \sim 420 \pm \pm 5/450-800$  нм.

Для каждого образца суспензии синаптосом было проведено по 3 серии измерений. Окончательный результат по исследуемым образцам определялся путем усреднения серийных измерений по среднеквадратичному отклонению  $\delta = \sqrt{\sum_{i=1}^{n} (\xi - \xi_i)^2 / n(n-1)}$ , где n – число серий измерений,  $\xi_i$  – спектры флуоресценции для *i*-той серии,  $\xi$  – среднее значение интенсивности флуоресценции в каждой спектральной точке, найденное как  $\sum_{i=1}^{n} \xi_i / n$ . В результате представленные в работе спектральные данные  $F(\lambda)$  есть усредненные значения статистического материала, отобранного и систематизированного по степени интоксикации.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Типичные спектры стационарной флуоресценции  $F(\lambda)$  образцов суспензий синаптосом, усредненные по сериям измерений и степени интоксикации хлорорганическим пестицилом (кривая 1 – норма, кривая 2 – средняя степень и кривая 3 – высокая степень интоксикации), показаны на рис. 1. При этом систематизация результатов спектроскопических исследований позволила представить их виде трех спектральных групп: первая группа  $F_1(\lambda)$  соответствует спектрам свечения, полученным при длинах волн возбуждения/эмиссии  $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$  ~ 290 ± 5/310–600 нм (рис. 1а), вторая группа  $F_2(\lambda)$  – спектрам свечения при  $\lambda_{ex} \big/ \lambda_{em} \sim 340 \pm 5/360{-}700$  нм (рис. 1б) и третья группа  $F_3(\lambda) -$ при  $\lambda_{\rm ex}/\lambda_{\rm em} \sim 420 \pm 5/450 -$ 800 нм (рис. 1в).

Как видно из рисунка, для контрольных образцов синаптосом спектры флуоресценции первой группы  $F_1(\lambda)$  (рис. 1а, кривая *I*) характеризуются наличием главного максимума на длине волны  $355 \pm 5$  нм и широкой длинноволновой полосы, где могут быть различимы спектральные компоненты вблизи  $425 \pm 5$ ,  $455 \pm 10$ ,  $485 \pm 5$  и  $525 \pm \pm 5$  нм. В сравнении с этим спектры флуоресценции второй  $F_2(\lambda)$  и третьей  $F_3(\lambda)$  групп образуют четко выраженные максимумы соответственно на длинах волн  $425 \pm 5$ ,  $455 \pm 5$  и  $485 \pm 5$  нм (рис. 16, кривая *I*) и на длинах волн  $505 \pm 5$  и  $520 \pm 5$  нм (рис. 18, кривая *I*), а также низкоинтенсивную полосу в красноволновой области спектра.

По мере развития процессов интоксикации происходит изменение как интенсивности, так и формы спектральных контуров флуоресценции. В частности, для первой спектральной группы (рис. 1а, кривые 2 и 3) хроническое влияние тиаметоксама приводит к уменьшению интенсивности флуоресценции главного максимума до 5 раз, вследствие чего вклад длинноволновых спектральных полос проявляется более отчетливо. Для второй и третьей спектральных групп (рис. 16, 1в, кривые 2 и 3) воздействие токсиканта (на фоне обшего снижения интенсивности флуоресценции до 30%) сопровождается увеличением интенсивности спектральных полос на длинах волн 565  $\pm$  10 и 675  $\pm$  5 нм до 40%, а также ослаблением свечения в спектральных областях вблизи длин волн  $455 \pm 5$  и  $505 \pm 5$  нм в среднем на 30%.

Кроме того, развитие интоксикации приводит к изменению в соотношении уровней интенсивности флуоресценции спектральных групп, которое (при их нормировке к максимуму первой группы контрольных биосред) составляет примерно $F_1(\lambda_{\max})/F_2(\lambda_{\max})/F_3(\lambda_{\max}) = 1.0/13.2/23.5$ (кривые 1, рис. 1). По мере этого воздействия различие в соотношении уровней интенсивности флуоресценции сокрашается и для средней степени интоксикации уже составляет  $F_1(\lambda_{\max})/F_2(\lambda_{\max})/F_3(\lambda_{\max}) = 1.0/10.9/18.7$  (кри-вые 2, рис. 1), а для высокой степени —  $F_1(\lambda_{\max})/F_2(\lambda_{\max})/F_3(\lambda_{\max}) = 1.0/4.2/7.2$  (кривые 3, рис. 1). Это, в свою очередь, свидетельствует в пользу возрастания роли спектров флуоресценции второй и третьей групп соответственно до 1.5 и 3 раз при спектральном анализе эффектов интоксикации клеток нервной ткани. При этом использование метода среднеквадратичного отклонения для статистического анализа спектров флуоресценции позволило установить, что максимальный разброс значений  $F(\lambda)$  между серийными измерениями не превышал 15-20% по всему спектральному интервалу.

Для проведения более детального анализа и получения количественной информации о динамике вкладов потенциальных флуорофоров в спектры свечения исследуемых биосред в данной работе выполнялось контурное разложение спек-



**Рис. 1.** Спектры стационарной флуоресценции образцов синаптосом при токсическом воздействии хлорорганического пестицида. Кривые *1* – контрольные образцы, кривые *2* – образцы синаптосом при средней степени интоксикации, кривые *3* – образцы синаптосом при высокой степени интоксикации. а, б, в – спектральные группы флуоресценции, полученные при возбуждении соответственно на длинах волн 290 ± 5, 340 ± 5 и 420 ± 5 нм.

тров флуоресценции. На сегодняшний день в этих целях наиболее широкое распространение получил алгоритм разложения мультивариационных кривых, являющийся стандартным хемометрическим методом [15–17]. Однако существенная зависимость спектральных характеристик свечения эндогенных флуорофоров от физико- и биохимического состояния их микроокружения (пространственной и электронной структуры и др.) несколько ограничивают гибкость и снижают точность применения данной методики. В тоже время в случае, когда спектры свечения эндогенных флуорофоров имеют форму, близкую к "колоколообразной", контурное разложение спектральных данных с допустимой погрешностью можно провести с использованием комбинации гауссовых и лоренцевых кривых [8].

Процедура спектрального разложения вкратце заключалась в реализации двух этапов. На первом этапе, основываясь на литературных данных о

спектральных свойствах потенциальных флуорофоров биосред (см. [2–6, 18] и таблицу), проводилось моделирование теоретической кривой  $f_{gl}(\lambda)$ по среднеквадратичному ее отклонению от спектров свечения эндогенных флуорофоров  $f_{\text{fluor}}(\lambda)$ при помощи следующего выражения:

$$f_{gl}(\lambda) = v f_g(\lambda) + (1 - v) f_l(\lambda), \qquad (1)$$

где  $f_{gl}(\lambda)$  — параметр, характеризующий относительный вклад в форму моделируемой кривой функций Гаусса и Лоренца; v — параметр, распределенный на отрезке от 0 до 1, при v = 0 модельный контур приобретает лоренцеву форму  $(f_l)$ , а при v = 1 — форму гауссовой составляющей  $(f_g)$ . Результат аппроксимации модельных кривых к спектрам флуоресценции триптофана, NAD(P) · H (кривые 1 и 2) и флавиновых производных (кривые 3 и 4) в качестве примера показан на рис. 2. Как видно из рисунка, использование

№, п/п	Комплексы флуорофоров	Длины волн максимумов возбуждения/эмиссии флуоресценции – λ <sub>ex</sub> /λ <sub>em</sub> , нм
1	Тирозин	$275 \pm 5/300 \pm 5$
2	Триптофан	$285 \pm 5/350 \pm 5$
3	Производные витамина В6 (пиридоксин)	$325 \pm 10/385 \pm 5$
4	Пиридоксиновая кислота	$315 \pm 5/430 \pm 10$
5	NAD(P)H (восстановленная форма никотинамидаденинди- нуклеотида (фосфата))	$(336, 351)/455 \pm 10$
6	Витамин D	$330 \pm 10/485 \pm 10$
7	Витамин А	$(315, 380)/510 \pm 5$
8	Производные флавиновых групп (FAD — окисленная форма флавиноадениндинуклеотида и FMN — флавиномононуклеотида)	$(370, 450)/525 \pm 10$
9	Липиды (липофусцин, сероид)	$340 - 395 / 550 \pm 10$
10	Производные группы эндогенных порфиринов	380-450/600-690

Комплексы эндогенных флуорофоров и их спектральные характеристики возбуждения и эмиссии флуоресценции, согласно данным работ [2-6, 18]

комбинации функций Гаусса и Лоренца позволяет с удовлетворительной точностью аппроксимировать форму спектров свечения эндогенных флуорофоров. Однако в отличие от модельных кривых, спектральный контур последних несколько сдвинут в длинноволновую область, что соответствует характеру спектрального распределения флуоресценции конденсированных сред, которыми являются биоткани. На следующем этапе спектрального анализа, варьируя значением интенсивности модельных кривых  $f_{gl}(\lambda)$ , определяющим концентрацию эндогенных флуорофоров, выполнялось разложение непосредственно самих спектров флуоресценции  $F(\lambda)$  исследуемых биосред. При этом качество сходимости кривых  $f_{gl}(\lambda)$  и  $F(\lambda)$ определялось методом наименьших квадратов



**Рис. 2.** Аппроксимация модельных кривых  $f_{gl}(\lambda)$  (кривые 4, 5 и 6), полученная при помощи комбинации функций Гаусса и Лоренца, к спектрам флуоресценции триптофана (кривая 1), NAD(P) · H (кривая 2) и флавиновых производных (FAD/FMN) (кривая 3), согласно данным работ [2–6, 18].

ОПТИКА И СПЕКТРОСКОПИЯ том 122 № 4 2017



**Рис. 3.** Контурное разложение спектров флуоресценции  $F(\lambda)$  суспензий синаптосом при токсическом воздействии хлорорганического пестицида при помощи комбинации гауссовых и лоренцевых кривых. а, б, в – норма; г, д, е – средняя степень интоксикации; ж, з, и – высокая степень интоксикации. Цифрами показаны спектральные компоненты разложения, соответствующие эндогенным флуорофорам.

 $(\delta \approx \sqrt{\sum_{i=1}^{n} (F(\lambda) - f_{gl}(\lambda))^2} / F(\lambda))$  при допустимой погрешности  $\leq 10\%$ .

Результат контурного разложения спектров флуоресценции  $F(\lambda)$  суспензий синаптосом при исследуемых формах интоксикации, сформированных 10 комплексами эндогенных флуорофоров (из которых компоненты 10-13 соответствуют флуоресценции порфириновых групп), согласно данным таблицы, показан на рис. 3. Сравнительный анализ полученных данных свидетельствует о том, что по мере развития процессов интоксикации наиболее явные изменения наблюдаются в соотношениях и вкладах свечения 2-5, 7-9 и 12 компонент. При этом стандартная погрешность разложения не превышала 3-5% за исключением коротковолновой области спектра, где  $\delta \approx 12 - 15\%$ , что, скорее всего, связано с полосой пропускания запирающих светофильтров, значительно ослабляющих спектры флуоресценции граничных флуорофоров. По этой причине вклад тирозина (компонента 1) для первой спектральной группы и вклад производных витамина В<sub>6</sub> (компонента 3) для второй спектральной группы при дальнейшем анализе спектров флуоресценции также не учитывались. Кроме того, следует заметить, что, несмотря на значительную роль витамина D (компонента 6) в формировании спектров  $F(\lambda)$ , его количественный анализ вызывает также некоторые сложности, поскольку динамика вкладов данного флуорофора меняется не существенно. Это, по-видимому, обусловлено индивидуальными особенностями обмена веществ и метаболизма клеток и клеточных органелл нервной ткани при воздействии токсиканта.

В целях дальнейшего анализа результатов спектрального разложения флуоресценции по аналогии с методикой оценки степени дыхатель-

ной активности митохондрий [19-21] в работе был введен ряд спектральных индексов, характеризующих динамику относительных вкладов эндогенных флуорофоров в суммарные спектры флуоресценции синаптосом по мере развития интоксикации. Данные индексы могут быть определены путем нормировки интенсивности свечения анализируемых флуорофоров (F) к интенсивности свечения NAD(P) · H ( $F_{NAD(P)H}$ ) или FAD (F<sub>FAD</sub>) как отношение площади под кривой, соответствующей компонентам разложения  $S_{\lambda_{ex}/\lambda_{em}}$ , к площади кривой компоненты 4 –  $S_{340/455}^4$  $(S_{290/455}^4)$  – для спектров флуоресценции первой и второй групп или компоненты  $8 - S_{340/530}^{8}$  $(S^8_{420/530})$  – для спектров флуоресценции второй и третьей групп:

$$\begin{split} \varkappa_{1} &= \frac{S_{290/350}^{2}}{S_{290/350}^{2} + S_{290/450}^{5}} = \frac{F_{\text{Trip}}}{F_{\text{Trip}} + F_{\text{NAD}(\text{P})\text{H}}}, \\ \varkappa_{2} &= \frac{S_{290/385}^{3}}{S_{290/385}^{3} + S_{290/450}^{5}} = \frac{F_{5-\text{Phos.Piridox}}}{F_{5-\text{Phos.Piridox}} + F_{\text{NAD}(\text{P})\text{H}}}, \\ \varkappa_{3} &= \frac{(S_{290/420}^{4} + S_{340/420}^{4})/2 + (S_{290/450}^{5} + S_{340/450}^{5})/2}{(S_{290/420}^{4} + S_{340/420}^{4})/2 + (S_{290/450}^{5} + S_{340/450}^{5})/2} = \\ &= \frac{F_{\text{Piridox}}}{F_{\text{Piridox}} + F_{\text{NAD}(\text{P})\text{H}}}, \\ \varkappa_{4} &= \frac{(S_{340/510}^{7} + S_{420/510}^{7})/2 + (S_{340/530}^{8} + S_{420/530}^{8})/2}{(S_{340/510}^{7} + S_{420/510}^{7})/2 + (S_{340/530}^{8} + S_{420/530}^{8})/2} = \\ &= \frac{F_{\text{Vit.A}}}{F_{\text{Vit.A}} + F_{\text{FAD}}}, \\ \varkappa_{5} &= \frac{(S_{290/530}^{8} + S_{340/530}^{8})/2 + (S_{290/450}^{5} + S_{340/450}^{5})/2}{(S_{290/530}^{8} + S_{340/530}^{8})/2 + (S_{290/550}^{5} + S_{340/530}^{9})/2} = \\ &= \frac{F_{\text{FAD}}}{F_{\text{FAD}} + F_{\text{NAD}}(\text{P})\text{H}}, \\ \varkappa_{6} &= \frac{(S_{340/565}^{9} + S_{420/565}^{9})/2 + (S_{340/530}^{8} + S_{420/530}^{8})/2}{(S_{340/565}^{9} + S_{420/565}^{9})/2 + (S_{340/530}^{8} + S_{420/530}^{8})/2} = \\ &= \frac{F_{\text{Lipids}}}{F_{\text{Lipids}} + F_{\text{FAD}}}, \\ \varkappa_{7} &= \frac{S_{12}^{12}}{(S_{420/675}^{12} + S_{420/530}^{8})} = \frac{F_{\text{Porph}}}{F_{\text{Porph}} + F_{\text{FAD}}}. \end{split}$$

где  $\varkappa_1$  — индекс триптофана,  $\varkappa_2$  — индекс аминокислотного обмена,  $\varkappa_3$  — индекс метаболизма пиридоксина,  $\varkappa_4$  — антиоксидантный индекс,  $\varkappa_5$  индекс дыхательной активности,  $\varkappa_6$  — индекс деградации внутриклеточных органелл и  $\varkappa_7$  — индекс деградации гемопротеинов. Систематизированные данные такого анализа показаны на рис. 4. Из рисунка хорошо видно, что длительное воздействие токсиканта приводит к достоверному уменьшению значений спектральных индексов флуоресценции  $\varkappa_1$ ,  $\varkappa_2$  и  $\varkappa_4$  до 50%, в то время как индексы  $\varkappa_3$ ,  $\varkappa_5 - \varkappa_7$  обнаруживают рост до 50%.

Анализ и обобщение обнаруженной зависимости спектральных индексов  $\varkappa_1 - \varkappa_7$  для суспензий синаптосом при различной длительности интоксикации тиаметоксамом позволяет обсуждать патологическое действие этого пестицида в рамках свободно-радикальной модели. По-видимому, участие свободных радикалов кислорода в детоксикации ксенобиотиков через систему цитохрома P-450 неизбежно вызывает окислительный стресс на уровне молекул белков, липидов и нуклеиновых кислот [22].

Данное предположение находит свое подтверждение в известных механизмах биохимического действия тиаметоксама [23, 24]. В частности, известно, что сконцентрированный преимущественно в ядрах и цитоплазме клеток триптофан участвует в синтезе коферментов тканевого дыхания и серотонина, действие которых направлено на компенсацию патологических процессов в мозге и антиоксидантную защиту. Вследствие этого воздействие данного токсиканта приводит к увеличению скорости аминокислотного обмена, что сопровождается снижением индексов  $\varkappa_1$  и  $\kappa_2$  до 20%, а так же угнетением тканевого дыхания, в том числе за счет окислительной деструкции NAD(P) · H (индекс  $\varkappa_5$ ). Это позволяет рассматривать уменьшение содержания триптофана, а также усиление окислительной деструкции пиридоксина как компенсаторную реакцию фонда нейромедиаторных аминокислот (приводящих к росту индекса  $\varkappa_3$  до 30%) и как реакцию на снижение концентрации восстановленных NAD(P) [22-25].

В тоже время рост индекса  $\varkappa_5$  на 30%, свидетельствующий об уменьшении концентрации восстановленных форм NAD(P) · Н и увеличении окисленных форм FAD, происходящих в результате разобщения митохондриального дыхания вследствие эффекта перекисного окисления липидов, приводит к продуцированию липофусцина и, как следствие, к росту индекса  $\varkappa_6$  до 40%. Последний флуорофор (в комплексе с витамином D и производными порфириновых групп) является маркером повреждения внутриклеточных структур, цитоскелета и гемопротеинов под действием активных форм кислорода и активации свободно-радикальных процессов, что, как видно



**Рис. 4.** Значения спектральных индексов  $\varkappa_1 - \varkappa_7$ , характеризующих динамику вкладов эндогенных флуорофоров в суммарные спектры флуоресценции суспензий синаптосом в норме и по мере развития интоксикации.

из рис. 4, сопровождается ростом индекса  $\kappa_7$  на 50% [22-25]. В дополнение к этому уменьшение индекса  $\varkappa_{4}$  до 60%, связанное со снижением интенсивности флуоресценции витамина А, также может свидетельствовать в пользу свободно-радикальной теории биохимического влияния хлорорганического токсиканта. Известно, что витамин А является одним из важнейших антиоксидантов, локализованных преимущественно в мембранах, содержащихся в большом количестве в везикулах синаптосом. В этой связи ослабление свечения витамина А можно объяснить его прямым антиоксидантным эффектом, в результате которого связывание свободных радикалов приводит к окислению витамина А, форма которого имеет крайне низкую флуоресценцию [24, 25].

В завершении следует заметить, что, несмотря на наличие только косвенных факторов, указывающих на свободно-радикальную модель биохимического влияния хлорорганических пестицидов, полученные результаты, тем не менее, хорошо согласуются с известными литературными и справочными данными [23, 24]. Однако более глубокое и детальное рассмотрение этих процессов требует проведения дополнительных биохимических исследований, что несколько выходит за рамки данной работы.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, систематизация и обобщение результатов спектрально-флуоресцентных исследований токсического влияния хлорорганических пестицидов на биохимические свойства синаптосом позволяют сформировать следующие выводы.

1. Флуоресценция суспензий синаптосом при возбуждении на длине волны  $290 \pm 5$  нм образует спектральный контур с максимумом на длине волны  $355 \pm 5$  нм и спектральными компонентами вблизи  $425 \pm 5$ ,  $455 \pm 10$ ,  $485 \pm 5$  и  $525 \pm 5$  нм, сформированными свечением триптофана, производных витаминов B<sub>6</sub>, A и D, NAD(P) · H и FAD. Свечение последних флуорофоров наиболее отчетливо проявляется во второй и третьей спектральной группах (возбуждение на длинах волн  $340 \pm 5$  и  $420 \pm 5$  нм), где дополнительно наблюдается флуоресценция липидных и порфириновых комплексов на длинах волн  $565 \pm 10$  и  $675 \pm 5$  нм.

2. Воздействие токсиканта приводит как к ослаблению общего уровня интенсивности флуоресценции синаптосом во всех спектральных группах, так и к изменению формы спектральных контуров. В частности,

— наблюдается ослабление интенсивности флуоресценции триптофана до 5 раз, а NAD(P) · H, производных витаминов  $B_6$  и A – до 50% при увеличении интенсивности свечения пиридоксиновой кислоты, FAD, липофусцина и порфириновых комплексов в среднем на 45–60%,

– данный факт находит отражение в динамике спектральных индексов в виде снижения индексов триптофана ( $\varkappa_1$ ) и аминокислотного обмена ( $\varkappa_2$ ) примерно на 20–25%, а антиоксидантного индекса ( $\varkappa_4$ ) в среднем на 50%; в то же время наблюдается рост индекса дыхательной активности ( $\varkappa_5$ ) и индекса метаболизма пиридоксина ( $\varkappa_3$ ) на 30%, а деградации внутриклеточных органелл ( $\varkappa_6$ ) и деградации гемопротеинов ( $\varkappa_7$ ) до 50%,

 происходит снижение общего уровня интенсивности флуоресценции первой спектральной группы и возрастание роли второй и третьей спектральных групп соответственно до 1.5 и 3 раз.

3. Анализ результатов спектрально-флуоресцентных исследований свидетельствует в пользу свободнорадикальной модели токсического действия хлорорганического пестицида тиаметоксам, лежащей в основе окислительного стресса.

Работа выполнена с использованием приборного парка ЦКП "Аналитическая спектроскопия" Дагестанского государственного университета и при финансовой поддержке проектной части Госзадания Минобрнауки России в научной деятельности, проект 3.1262.2014 К.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Optical-Thermal Response of Laser Irradiation Tissues / Ed. by Welch A.J., Van Gemert M.J.C. Springer Science+Business Media B.V., 2011. 958 p.
- Оптическая биомедицинская диагностика / Пер. с англ. под ред. Тучина В.В. М.: ФИЗМАТЛИТ, 2007. Т. 1. 560 с.; Т. 2. 368 с.

- 3. Handbook of Biomedical Optics / Ed. by Boas D.A., Pitris C., Ramanujam N. Springer Science+Business Media, 2013.
- Handbook of Biomedical Fluorescence / Ed. by Mycek M., Pogue B.W. New York: Marcel Dekker, Inc., 2003.
- Lakowicz J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Third Edition. Springer Science+Business Media, LLC, 2006. 954 p.
- 6. *Vishvanath K., Ramanujam N.* Fluorescence Spectroscopy in Vivo. Encyclopedia of Analytical Chemistry. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2011. P. 1–42.
- Chaturvedi P., Majumder S.K., Krishna H. et al. // J. Cancer Res. Ther. 2010. V. 6. P. 497–502.
- Гираев К.М., Ашурбеков Н.А., Лахина М.А. // ЖПС. 2012. Т. 79. С. 288–299.
- Zhang L., Pu Y., Xue J. et al. // J. Biomed. Optics. 2014. V. 19. P. 037005-5.
- Liu W., Zhang X.H., Liu K.P. et al. // Chinese Science Bulletin. 2013. V. 58. P. 2003–2016.
- Орлов Д.С., Садовникова Л.К., Лозановская И.Н. Экология и охрана биосферы при химическом загрязнении. М.: Высшая школа, 2002. 334 с.
- Каган Ю.С. Общая токсикология пестицидов. Киев: Здоровье, 1981. 176 с.
- Бочкарев М.В., Ботнарь В.П., Василаки А.Ф. и др. Клиника, дифференциальная диагностика и лечение хронических интоксикаций пестицидами. Кишинев: Штиинца, 1979. 318 с.
- 14. Hajos F. // Brain Res. 1975. V. 93. № 3. P. 285–289.
- Volynskaya Z., Haka A.S., Bechtel K.L. et al. // J. Biomed. Optics. 2008. V. 13. P. 024012-9.
- 16. *Montcuquet A.S., Herve L., Navarro F. et al.* // IEEE Trans. Biomed. Eng. 2011. V. 58. P. 2554–2565.
- 17. Xu H., Rice B.W. // J. Biomed. Optics. 2009. V. 14. P. 064011-9.
- Prahl S.A. (2015). Код доступа: http://omlc.ogi.edu/ spectra/PhotochemCAD/html/index.html
- 19. Карнаухов В.Н. // Цитология. 1976. С. 622-629.
- 20. *Hanson G.T., Aggeler R., Oglesbee D. et al.* // J. Biological Chemistry. 2004. V. 279. P. 13044–13053.
- 21. *Hassinen I.E.* // J. Innovative Optical Health Sciences. 2014. V. 7. P. 1350058-6.
- 22. Дубинина Е.Е., Тавровская С.В., Кузьмич Е.В. и др. // Биохимия. 2002. Т. 67. С. 413–421.
- 23. Шаронов Б.П., Говорова Н.Ю. и др. // Биохимия. 1988. Т. 53. С. 816-824.
- 24. Ленинджер А. Биохимия. М.: МИР, 1976. 958 с.
- 25. Dean R.T., Fu S., Stocker R. et al. // Biochemical J. 1997. V. 324. P. 1–18.