

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

_____ В.А. Кратасюк

«_____» _____ 2019 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

03.03.02 – физика

Совместное воздействие трития и гуминовых веществ на
биолюминесценцию ферментативной системы

Руководитель _____ проф., д.ф-м.н. Н.С. Кудряшева
подпись, дата

Руководитель _____ доцент., к.б.н Т.В Рожко
подпись, дата

Выпускник _____ О.Е. Мурзова
подпись, дата

Красноярск 2019

РЕФЕРАТ

Бакалаврская работа по теме «Совместное воздействие трития и гуминовых веществ на биолюминесценцию ферментативной системы» содержит 48 страниц текстового документа, 49 использованных источников, 12 рисунков, 2 формулы, 1 приложение.

**ГУМИНОВЫЕ ВЕЩЕСТВА; ТОКСИЧНОСТЬ;
БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ ФЕРМЕНТАТИВНАЯ СИСТЕМА; ТРИТИЙ,
АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА.**

Работа посвящена анализу совместного воздействия радионуклида трития и природных биоактивных соединений – гуминовых веществ на биолюминесцентную тестовую систему. Гуминовые вещества (ГВ) являются высокомолекулярными органическими соединениями природного происхождения, которые образуются при разложении растительных и животных остатков в почве и донных отложениях. Известно, что ГВ способны нейтрализовать токсические воздействия разной природы, включая радиоактивное, основанное на нейтрализации радикальных соединений. В качестве источника низкодозового бета-излучения выбран тритий, изотоп водорода, который является одним из самых распространенных продуктов распада в ядерной промышленности. Изучение влияния гуминовых веществ на низкодозовые ионизирующие воздействия актуально с точки зрения выявления элементарных физико-химических и молекулярных механизмов различных откликов организмов на стрессовые воздействия и имеет большое практическое значение для сохранения безопасности окружающей среды. В качестве биотестовой системы выбрана ферментативная система НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза–люцифераза. В работе (1) проведено сравнение влияния на кинетику этой системы радионуклида трития в присутствии и отсутствии гуминовых веществ; (2) изучено совместное действие трития и ГВ на содержание активных форм кислорода в биолюминесцентной системе.

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|--|----|
| ВВЕДЕНИЕ..... | 5 |
| 1. Литературный обзор | 7 |
| 1.1 Принцип биолюминесцентного анализа на основе люминесцентных бактерий и выделенных ферментов | 7 |
| 1.2 Биолюминесцентная система двух сопряженных реакций, катализируемых бактериальными ферментами НАДН:ФМН–оксидоредуктаза и люцифераза | 9 |
| 1.3 Общая характеристика гуминовых веществ | 12 |
| 1.4 Гуминовые вещества как детоксиканты | 15 |
| 1.5 Радионуклиды и загрязнение окружающей среды | 16 |
| 1.6 Распад трития его поведение в окружающей среде | 17 |
| 1.7 Активные формы кислорода | 19 |
| 2. Материалы и методы | 22 |
| 2.1. Реактивы..... | 22 |
| 2.2. Регистрация биолюминесценции | 24 |
| 2.3. Ферментативная система..... | 24 |
| 2.4 Исследование содержания АФК в ферментативной системе при воздействии трития | 27 |
| 3. Результаты и обсуждения..... | 29 |
| 3.1 Изменение эффекта трития под действием гуминовых веществ | 29 |
| 3.2 Содержание АФК в ферментативной системе эффекта трития в присутствии гуминовых веществ | 34 |
| 3.3 Анализ корреляций между интенсивностью биолюминесценции и содержанием АФК | 37 |

| | |
|--|----|
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 39 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... | 40 |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ | 41 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 1 | 47 |

ВВЕДЕНИЕ

В связи с ростом антропогенной нагрузки на окружающую среду, в настоящее время актуальным является необходимость изучения механизмов нейтрализации токсичных соединений в природных условиях и использования выявленных закономерностей. Особый интерес представляет нейтрализация воздействий радиоактивных воздействий.

В связи с этим, актуальными являются исследования токсичности водных растворов радионуклидов в присутствии гуминовых веществ – продуктов естественной трансформации органической массы в почве и донных отложениях. В процессе образования гуминовых веществ (гумификацию) вовлекается около 20 Гт углерода в год; это второй по масштабности после фотосинтеза процесс трансформации органического вещества в окружающей среде. Известно, что гуминовые вещества выполняют в природных условиях роль детоксицирующих агентов.

Способность гуминовых веществ снижать токсичность растворов является предметом интереса для многих исследователей. В настоящее время предполагается, что детоксицирующая способность гуминовых веществ является следствием гидрофобного связывания, комплексообразовательных и окислительно-восстановительных процессов, которые приводят к уменьшению концентрации свободных токсичных соединений в водных растворах. Вместе с тем, термин «токсичность» является не только химическим, но и биологическим. Токсичность среды определяется реакцией организмов на неблагоприятное воздействие токсичных веществ. В настоящее время именно реакция организмов на воздействие токсичных соединений, а также изменение токсичности в присутствии гуминовых веществ представляет наибольший интерес.

Ранее [1] было изучена детоксикация высокоразбавленных растворов америция-241(альфа-излучающего радионуклида высокой удельной радиоактивности). Детоксикация гуминовыми веществами растворов других радионуклидов до сих пор не изучена.

В качестве биологической тестовой системы выбрана биолюминесцентная система двух сопряженных реакций, катализируемых ферментами люциферазы и НАД(Ф)Р:ФМН-оксидоредуктаза. Использование этой системы дает возможность оценивать эффекты на биохимическом уровне. Как и все биолюминесцентные системы, эта система характеризуется высокой скоростью анализа, что определяет возможность большого количества измерений в сопоставимых условиях и следовательно, достоверной статистической обработки этих результатов.

Цель работы: выявить результаты совместного воздействия радионуклида трития и природных биоактивных соединений – гуминовых веществ на биолюминесцентную тестовую систему.

В работе поставлены следующие задачи:

1. Сравнить влияние на кинетику биолюминесценции ферментативной системы НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза–люцифераза бета-излучающего радионуклида трития в присутствии и отсутствии гуминовых веществ.
2. Выявить результаты совместного воздействия радионуклида трития и гуминовых веществ на содержание активных форм кислорода в биолюминесцентной биферментной системе.

1. Литературный обзор

1.1 Принцип биолюминесцентного анализа на основе люминесцентных бактерий и выделенных ферментов

В настоящее время одним из перспективных экспрессных методов биологического мониторинга является биолюминесцентный анализ.

Биолюминесценция – это способность живых организмов испускать свет в ходе ферментативной хемилюминесцентной реакции. Испускание света, обусловленное такой реакцией, тесно связано с метаболизмом клетки. Интенсивность этого света отражает уровень метаболической активности организма. В силу простоты регистрации света и быстроты ответа на вредное воздействие, биолюминесцентные методы нашли широкое применение в экологическом мониторинге [2].

Существующие биолюминесцентные биотесты отличаются от классических биотестов, использующих инфузории, дафний, водоросли, рыб, тем, что в качестве параметра физиологической активности используется биолюминесценция [3]. В основе этих методов лежит изменение интенсивности биолюминесценции биологических объектов после воздействия того или иного тестируемого образца (подавление интенсивности биолюминесценции оценивает токсичность водных растворов, в то время как активация биолюминесценции служит доказательством активации люминесцентной физиологической функции), что обеспечивает несложную приборную регистрацию этой физиологической функции организма с помощью простых физических устройств. Данные биологические тесты дают количественную меру токсичности, часто превосходят известные биотесты по простоте, быстродействию, чувствительности к токсичным соединениям [4]. Как и все биотесты, они позволяют осуществлять интегральную оценку токсичности любого числа токсикантов в растворе, что очень важно при мониторинге качества окружающей среды, загрязненной большим количеством антропогенных отходов. В этих условиях точный химический анализ каждого

из веществ сложен и длителен, поэтому большое значение приобретают быстрые и дешевые экспресс-биотесты, позволяющие получить информацию об интегральном загрязнении среды [5].

Биолюминесцентные системы уже более 50 лет используются в качестве биотестов для мониторинга токсичности различных сред. Впервые биотест, основанный на биолюминесцентных бактериях, был использован в 1963 г [6]. Позже, в 1980 г. этот тест был стандартизирован в Германии как метод обнаружения поллютантов. Применение ферментативных биолюминесцентных реакций сейчас стало новым направлением в этой области, оно связано с использованием не светящихся бактерий, а выделенных из них люцифераз. Для анализа токсичности среды было предложено использовать биолюминесцентную систему сопряженных ферментативных реакций, чувствительность которой можно оптимизировать к определенным поллютантам, варьируя концентрации субстрата или изменяя состав ферментативной системы [7].

Наибольшее распространение получила биолюминесцентная система двух сопряженных реакций, катализируемых бактериальными ферментами редуктазой и люциферазой. В люциферазных биотестах действие токсических веществ происходит непосредственно на люциферазу – ключевой фермент метаболизма светящихся бактерий (происходит ингибирование реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, компонентами анализируемых смесей) или оксидоредуктазу. В случае светящихся бактерий прямое влияние токсикантов на люциферазу и редуктазу невозможно благодаря защитной функции клеточных стенок и мембран бактерий, препятствующих проникновению посторонних веществ в клетки, однако, происходит влияние на другие важные процессы жизнедеятельности (например, дыхание), опосредованно связанные с биолюминесценцией.

Бактериальная люминесценция *in vivo* – чувствительный индикатор ксенобиотической токсичности, это связано с тем, что действие таких соединений напрямую сопряжено с дыханием (через электронную

транспортную цепь) и, таким образом, отражает метаболический статус клетки. Если присутствует токсичное вещество, то интенсивность люминесценции уменьшается. С помощью подобных биотестов возможно выявлять состояния экосистем как при мгновенном, так и при хроническом воздействии токсичного вещества на организм [8]. Оценка антиоксидантной активности и токсичности биоактивных соединений является новой и перспективной областью применения биолюминесцентных биотестов. Простота используемых биотестов и высокая скорость тестирования позволяют одновременно анализировать большое число проб-образцов в сопоставимых внешних условиях и выполнять надлежащую статистическую обработку эффектов низких концентраций биологически активных соединений. Возможность использования биолюминесцентных систем различной сложности позволяет сравнивать токсические эффекты на клеточном и бioхимическом (уровне биомолекул и физико-химических процессов) уровнях и выявить закономерности воздействия токсикантов [9].

1.2 Биолюминесцентная система двух сопряженных реакций, катализируемых бактериальными ферментами НАДН:ФМН–оксидоредуктаза и люцифераза

Методы биолюминесцентного анализа основаны на способности ферментов (люцифераз) с высокой квантовой эффективностью переводить в излучение оптического диапазона энергию химических реакций, которые они катализируют. Концентрацию анализируемого вещества определяют, измеряя параметры этого излучения [10].

Принцип люциферазных методов анализа состоит в обнаружении токсических свойств тестируемых веществ и смесей по их влиянию на биолюминесцентные ферментативные реакции. В основе биолюминесцентных методов лежит ингибирование люциферазной реакции (самого фермента люциферазы или низкомолекулярных компонентов реакции) компонентами анализируемых смесей.

Система двух сопряженных ферментативных реакций, катализируемых люциферазой и редуктазой представлена ниже:



В результате первой реакции, катализируемой НАДН:ФМН–оксидоредуктазой, происходит восстановление ФМН с помощью НАДН, при этом формально процесс выглядит как присоединение водорода. Однако в таком полярном растворителе, как вода, перенос водорода складывается из переноса протона и электрона: $\text{H} = \text{e}^- + \text{H}^+$. При этом НАДН переходит в НАДН^+ , передавая молекуле ФМН протон и два электрона с образованием $\text{ФМН}\cdot\text{H}^-$ (депротонированная форма восстановленного флавина). В водных растворах при нейтральных pH восстановленный флавин на 90% состоит из депротонированной формы и только 10% из $\text{ФМН}\cdot\text{H}_2$, который образуется в результате отрыва протона от подходящего донора, воды [11]. С помощью этой реакции в системе на протяжении довольно большого интервала времени происходит постоянная наработка $\text{ФМН}\cdot\text{H}_2$, в результате чего поддерживается постоянное (стационарное) свечение. Вторая реакция, катализируемая люциферазой, является биолюминесцентной. В этой реакции восстановленный флавин и алифатический альдегид окисляются кислородом воздуха. В результате реакции образуется окисленная форма флавина, жирная кислота, а также испускается квант света [12]. Общая схема преобразования реагентов в реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, была предложена достаточно давно [13], и последующие исследования подтвердили ее правильность. Согласно этой схеме, реакция проходит через образование трех промежуточных комплексов с ферментом (интермедиаторов): I – связанный с люциферазой восстановленный флавин, II – связанный с люциферазой пероксифлавин и III – связанный с люциферазой перокси-полуацеталь

флавина. Существование интермедиатов I и II было доказано с помощью методов ЯМР [14]. Образование интермедиата IIА пока не нашло экспериментального доказательства, но признается неизбежной стадией реакции [15]. Методами ЯМР было также показано, что основные химические перестройки в ходе реакции происходят на C(4a) атоме изоаллоксазинового фрагмента флавина (нумерация атомов приведена на рис.1). Результаты этих исследований позволили составить последовательность химических перестроек восстановленного флавина в активном центре бактериальной люциферазы (рис.1). На этой схеме показана только та часть изоаллоксазинового фрагмента флавина, которая подвергается модификации; рибитилфосфатный «хвост» обозначен RibP.

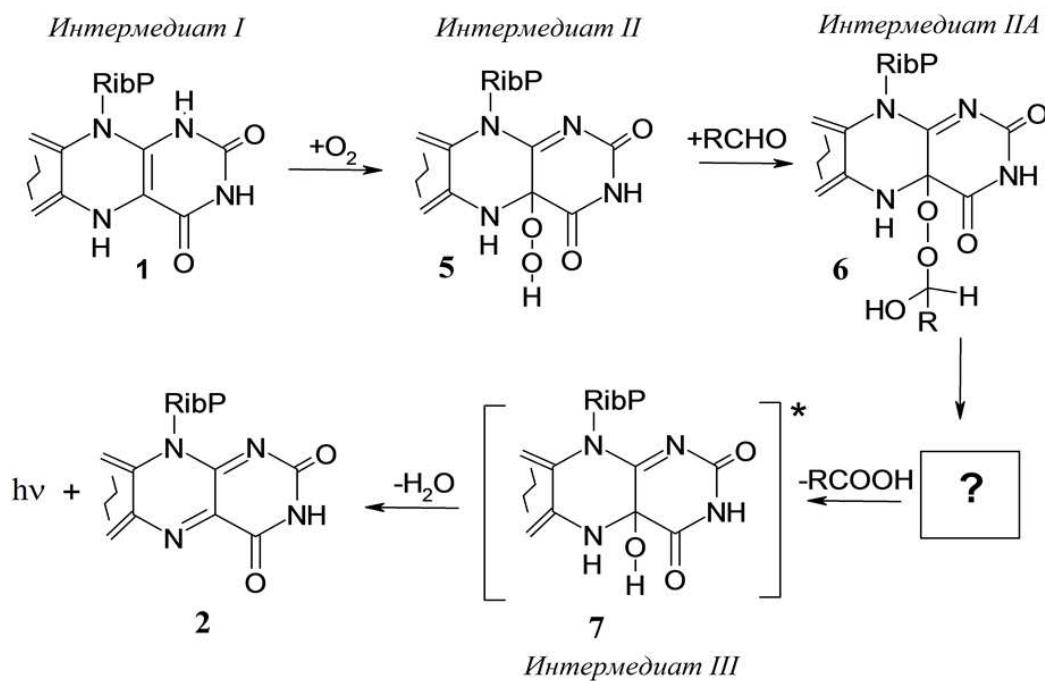


Рисунок 1 – Последовательность химических преобразований восстановленного флавина в активном центре бактериальной люциферазы [15]

Относительно механизма преобразования в возбужденный эмиттер интермедиата IIА (4а-гидропероксиацеталь-5-гидрофлавинмононуклеотид) (6, рис.1), связанного с люциферазой, до сих пор не существует единого мнения.

1.3 Общая характеристика гуминовых веществ

Гуминовые вещества (ГВ) – это сложные смеси высокомолекулярных темноокрашенных органических соединений природного происхождения, образующихся при разложении растительных и животных остатков под действием микроорганизмов и абиотических факторов среды [16]. ГВ представляют собой основную часть органического вещества почвенных и водных экосистем, а также твердых горючих ископаемых, особенно верхнего окисленного слоя бурого угля – леонардита. Их доля от общего содержания органических веществ в почвах и водах составляет 60-80%; в торфах и углях она колеблется от 20 до 90%.

В настоящее время классификация гуминовых веществ и изучение их свойств базируется на растворимости и способе их извлечения. ГВ можно разделить на три основные составляющие: гумин – неизвлекаемый остаток, не растворимый ни в щелочах, ни в кислотах; гуминовые кислоты (ГК) – фракция ГВ, растворимая в щелочах и нерастворимая в кислотах; фульвокислоты (ФК) – фракция ГВ, растворимая в щелочах и кислотах. В качестве обобщающего названия, обозначающего как гуминовые, так и фульвокислоты, применяют термин «гумусовые кислоты». Это наиболее подвижная и реакционноспособная компонента гуминовых веществ, активно участвующая в природных химических процессах [17].

ГВ образуются в результате разложения останков живых организмов, при этом происходит отбор фрагментов, наиболее устойчивых в окружающей среде. Как следствие, к фундаментальным свойствам ГВ относятся нестехиометричность состава, нерегулярность строения, гетерогенность структурных элементов и полидисперсность. Поэтому для ГВ неприменимо понятие молекулы, а вероятную схему их строения представляют с помощью так называемой структурной ячейки (рисунок 2), то есть минимального по размеру фрагмента молекулы, который содержит все важнейшие структурные единицы.

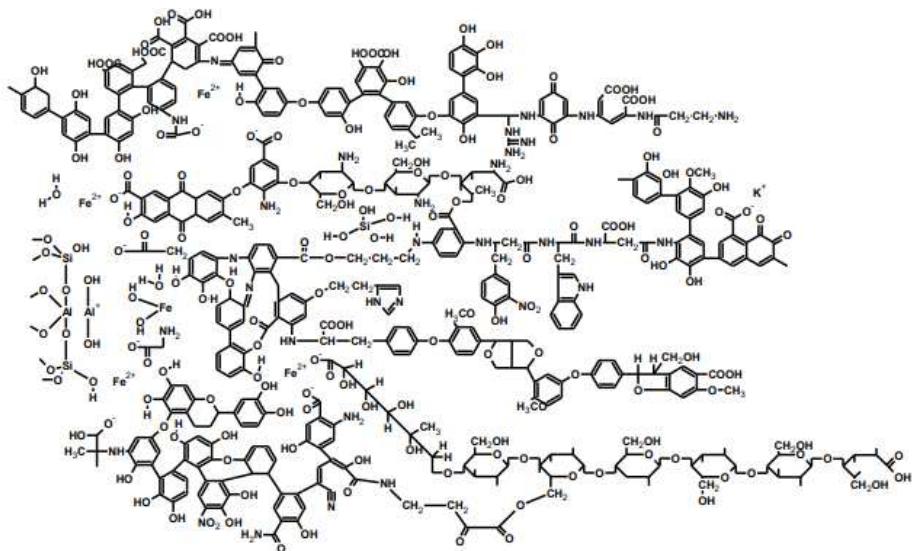


Рисунок 2 – Гипотетический структурный фрагмент гуминовых веществ почв [18]

Как видно из выше приведенного структурного фрагмента, ГВ обладают широким спектром химических групп, включая карбоксильные, фенольные, гидроксильные и аминогруппы. По этой причине строение ГВ сложнее строения других природных соединений (нефти, лигнины и угли).

В силу сложности строения, гуминовые вещества способны вступать в ионные и донорно-акцепторные взаимодействия, образовывать водородные связи и активно участвовать в сорбционных процессах. Так, например, гуминовые вещества хорошо связывают воду, способны к ионному обмену, образуют комплексы с металлами и органическими соединениями различных классов. Обладая указанными свойствами, гуминовые вещества выполняют целый набор важных биосферных функций. К их числу относятся структурирование почвы, накопление питательных элементов и микроэлементов в доступной для растений форме, регулирование геохимических потоков металлов в водных и почвенных экосистемах [18].

В последнее десятилетие наблюдается резкое повышение интереса к аспектам применения гуминовых веществ в медицине, животноводстве, растениеводстве и в охране природных сред от загрязнения. Это связано с тем, что гуминовые вещества являются определяющим фактором плодородия почв, обладают пролонгированным действием и ослабляют действие некоторых

неблагоприятных факторов. Гуминовые вещества способны снижать токсичность как тяжелых металлов, так и некоторых органических соединений. Однако, роль гуминовых веществ в изменении биологической активности разнообразных химических веществ, загрязняющих окружающую среду, остается недостаточно изученной и противоречивой. До настоящего времени остаются очень слабо разработанными направления по использованию гуминовых веществ для детоксикации конкретных загрязнителей окружающей среды, за исключением тяжелых металлов.

Все чаще для рекультивации загрязненных почв и вод, детоксикации сточных вод промышленных предприятий используются препараты на основе гуминовых веществ. Их пытаются также применять для очистки и рекультивации территорий, загрязненных органическими веществами и нефтепродуктами, а также тяжелыми металлами [19].

1.4 Гуминовые вещества как детоксиканты

Гуминовые вещества (ГВ) выполняют многие полезные функции в почве и считаются одним из фундаментальных факторов, определяющих практически все свойства и преобразования, происходящие в ней, также являются природными органическими соединениями, которые повсеместно присутствуют в почвах, отложениях и водах и получены не только из почвы, но и из навоза, торфа, углей, таких как лигнит и леонардит, или сланцев [20]. Благодаря своей структуре гуминовые вещества могут иммобилизировать и нейтрализовать тяжелые металлы, способствуя процессу детоксикации почвы. Карбоновые кислоты и фенольные группы в гуминовых веществах ответственны за комплексообразование с тяжелыми металлами и показали значительное влияние на сорбцию токсичных ионов металлов, таких как Cu, Pb, Cd, As, Cr и Mn [21].

Кроме того, будучи экологически безвредными, гуминовые вещества могут улучшить физические, химические и биологические свойства почвы. Большинство опубликованных исследований, связанных с гуминовыми веществами, показывают широкий спектр преимуществ, включая рост полезных почвенных микробов, улучшение структуры почвы, включая способность к удержанию воды, а также пористость почвы, аэрацию, уплотнение, адгезию, дыхание корней, активность ферментов и устойчивость к абиотическому стрессу, как соленость и экстремальный pH [22].

Для оценки детоксицирующей способности гуминовых веществ было предложено использование биолюминесцентных биотестов, основанных на морских бактериях и их ферментах. В этих работах исследована детоксикация гуматами органических и неорганических окислителей [23,24,25,26,27,28,29], а также радионуклидов [30].

1.5 Радионуклиды и загрязнение окружающей среды

Во всем мире технологические разработки могут вызвать радиоактивное загрязнение, вызванное промышленными и ядерными отходами. Кроме того, природные радиоактивные элементы с большим временем жизни, вносят вклад в естественный уровень радиации. Каждое живое существо на Земле постоянно подвергается воздействию радиоактивных веществ, образующихся в результате как естественного излучения, так и деятельности человека [31].

Естественная радиоактивность включает в себя излучение радионуклидов, которые образуются при создании Земли, известные как первичные радионуклиды, или те, которые образуются при взаимодействии космических лучей с атмосферными веществами, известными как космогенные радионуклиды [32]. Первичные радионуклиды – это природные радиоактивные элементы, содержащиеся в рядах распада урана, тория и актиния, а также радиоактивный изотоп калия. Уровни концентрации как первичных, так и космогенных радионуклидов в окружающей среде Земли зависят от нескольких факторов, которые включают высоту, процессы выветривания, географию и общую геологию конкретной среды. Искусственные радионуклиды – это те, которые образуются в результате деятельности человека. Средняя часть излучения, поступающего из природных источников, составляет 2,4 мЗв / год, тогда как доля излучения из искусственных источников составляет 0,8 мЗв / год. Таким образом, 75% общей радиации, влияющей на здоровье человека, приходится на источники естественного излучения [33].

Основное воздействие радиации, вызванной радиацией почвы, происходит из верхнего слоя почвы в котором источниками радиоактивности являются Th-232, U-238 и U-235, их продукты распада и радионуклид ^{40}K , которые являются так называемыми альфа, бета или гамма-излучателями [34]. Радиологическое воздействие природных радионуклидов на человека выражается главным образом гамма-излучением, действующим на организм, а также радоном и процессами, вызванными вдыханием его продуктов распада.

При этом биологические эффекты радионуклидов в организме человека, обусловленные физическими и химическими процессами, происходят сразу после прохождения радиации через живое вещество [35]. Взаимодействие ионизирующего излучения, возникающего либо из внешних источников вне тела, либо из-за внутреннего загрязнения тела радиоактивными веществами, приводит к биологическим эффектам, которые могут позже проявляться как клинические симптомы. Длительное воздействие и вдыхание тяжелых металлов и природных радионуклидов может вызвать многие проблемы со здоровьем, такие как острый лейкоз, анемия, катаракта глаза, а также различные виды рака [36].

1.6 Распад трития его поведение в окружающей среде

Тритий (${}^3\text{H}$) - радиоактивный изотоп водорода (${}^1\text{H}$). Образуется естественным образом в верхних слоях атмосферы при взаимодействии нейтронов в космическом излучении с азотом и кислородом. Очень небольшое количество природного трития также возникает в результате захвата нейтронов литием в породах земной коры. Антропогенные источники трития включают испытания ядерного оружия, военное производство, заводы по переработке топлива, производство тритиевых огней и медицинские и академические исследования. Ядро трития содержит один протон и два нейтрона; ядро водорода также содержит один протон, но без нейтронов. Тритий распадается до ${}^3\text{He}$, испуская бета-частицу (электрон) и нейтрино из одного из своих нейтронов [37].



Диапазон энергий бета-частицы от 0 до 18,6 кэВ при средней энергии 5,69 кэВ. Радиоактивный период полураспада трития составляет 12,26 года.

Тритий выбрасывается в окружающую среду с ядерных установок в двух основных химических формах: тритиевая вода (HTO) и тритиевый водородный газ (HT). HTO доминирует в выбросах из реакторов деления и из большинства

существующих установок по переработке трития и является наиболее распространенной формой в окружающей среде [38]. НТО, выпущенный в атмосферу, смешиается с влагой воздуха и обменивается с водными бассейнами в почве, растениях и животных. Пути воздействия на человека включают вдыхание, всасывание через кожу и прием пищи. НТО, выделяющийся с жидкими стоками, загрязняет принимающий водный объект и поглощается водными организмами [39]. Люди подвергаются воздействию, когда они пьют загрязненную воду и едят загрязненную рыбу. Растения и животные включают фракцию своего содержания НТО в органические соединения в изотопно-обменных или ферментативно-катализируемых реакциях.

Низкая энергия бета-частицы трития означает, что излучение не может проникнуть в кожу человека. Таким образом, тритий не передает внешнюю дозу от осажденной радиоактивности или погружения в загрязненный воздух. Тритий может нанести вред организмам, только если попадет в организм при вдыхании, проглатывании или всасывании через кожу. Попав внутрь организма, тритий может быть составным атомом любой молекулы воды и органического соединения [40]. Период биологического полувыведения тритий содержащей воды колеблется от 9 до 14 суток для разных людей (в среднем 12 суток). Из-за низкой растворимости трития в жидкости человеческого организма обычно считают, что тритий содержащая вода представляет большую биологическую опасность, чем газообразный тритий. Кроме того, из-за его низкой начальной энергии средняя плотность ионизации, вызванной прохождением бета-частицы трития, выше, чем у частицы с высокой энергией [41].

В настоящее время тритий широко используется в мирных целях. Он является сравнительно дешевым радионуклидом, что способствует широкому его использованию в различных сферах человеческой деятельности. В лабораторной практике применяется для получения меченых образцов. Также он находит все более широкое применение в исследованиях механизма и

кинетики химических реакций, а также при исследовании реакций переноса водорода. В биологических исследованиях тритий используют для определения времени биологического полувыведения воды из организма человека и животных [42]. Газообразный тритий может быть применен в клинической практике для определения вентиляционного объема легких, а также в фармакологических исследованиях и экспериментальной радиотерапии. Водный раствор трития востребован в гидрографии при изучении перемещений воды на поверхности и в глубинах земли, а также при изучении распределения грунтовых вод в нефтяных пластах [43].

1.7 Активные формы кислорода

Кислород является одним из важнейших химических элементов в биоэнергетике большинства живых организмов. Он служит окислителем питательных веществ при дыхании животных, растений, грибов и бактерий. Наряду с окислительным фосфорилированием в живых организмах постоянно происходят реакции, приводящие к образованию активных форм кислорода (АФК).

Под термином «активные формы кислорода» понимают совокупность взаимопревращающихся реакционноспособных форм кислорода у которых периоды полураспада находятся в диапазоне наносекунд до часов. Эти формы могут возникать во многих химических и биологических процессах в виде молекул, ионов и свободных радикалов. К АФК относятся супероксид анион-радикал (O_2^-), перекись водорода (H_2O_2), гидроксильный радикал (OH), синглетный кислород (1O_2), гипохлорит ($HOCl$), гидропероксильный радикал (HOO), а также окись азота (NO) и пероксинитрит ($ONOO^-$), обладающие высокой окислительной активностью [44].

Традиционно АФК рассматриваются как инициаторы окислительного стресса и повреждений, что приводит к износу тканей и органов, старению и болезням. АФК постоянно генерируются, изменяются и потребляются во всех живых организмах в результате их аэробного функционирования. Существуют

данные о положительном значении АФК в физиологии. Показано, что в низких и умеренных дозах АФК способствуют регуляции жизненно важных физиологических функций они ответственны за пролиферацию, миграцию, дифференцировку и метаболизм. Их роли значительно различаются в зависимости от типов АФК, реакций, в которых они участвуют, и молекул-мишеней, с которыми они реагируют. Их использование в химических процессах связано с их высокой реакционной способностью; они широко используются, например, для разложения опасных химических веществ. В биологических процессах АФК являются естественными побочными продуктами метаболических окислительных процессов и играют важную роль в передаче клеточного сигнала и гомеостаза [45].

Существует два типа радикала, которые формируются в организме: природные радикалы, которые образуются в живых клетках; и чужеродные, которые возникают при воздействии ионизирующего излучения, ультрафиолетового облучения или при освещении интенсивным видимым светом, например, лазерным. В свою очередь свободные радикалы подразделяются на первичные, вторичные и третичные.

Первичные радикалы – это радикалы, которые выполняют «полезные» для организма функции, т.е. это эндогенные молекулы, постоянно образующиеся в клетках и межклеточном пространстве живых организмов как естественный побочный, а иногда и как основной продукт нормального метаболизма кислорода. Из первичного радикала – супероксида, а также в результате других реакций в организме могут образовываться очень активные молекулярные соединения: перекись водорода, гипохлорит и гидроперекиси липидов [46].

Под действием ионов металлов переменной валентности, в первую очередь – ионов Fe^{2+} , из этих веществ образуются вторичные свободные радикалы, такие как радикал гидроксида и радикалы липидов, которые оказывают разрушительное действие на клеточные структуры. Вторичные свободные радикалы не выполняют физиологически полезных функций,

оказывают разрушительное действие на клеточные структуры, т.е. они стараются отнять электроны у «полноценных» молекул, благодаря которому «пострадавшая» молекула сама становится свободным радикалом – третичным, но в основном слабыми, не способными к разрушающему действию.

Для определения содержания АФК использовался хемилюминесцентный люминольный метод, который широко используется для определения содержания пероксидов. Данный метод очень чувствителен, может обнаружить высокореакционные короткоживущие радикалы кислорода (например, время полуразложения гидроксильного радикала примерно равно 10^{-9} с), которые не могут регистрироваться другими методами; может регистрировать даже активные радикалы, обладающие в изучаемой системе ничтожно малой концентрацией. Метод не связан с изменением хода процесса в растворе, биологических клетках, тканях, в которых регистрируется свечение. Регистрация хемилюминесценции занимает не более 4-5 минут и отвечает всем требованиям, предъявляемым к экспресс-анализу [47].

2. Материалы и методы

2.1. Реактивы

В работе использовали комплект реактивов аналитической биолюминесценции (КРАБ), который включает лиофилизированные препараты люциферазы *P. leiognathi* (0,5 г/л) и НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазы из *V. fischeri* (0,15 ед. активности), степень чистоты люциферазы 98%. Этот препарат был произведен в лаборатории нанобиотехнологии и биолюминесценции Института Биофизики СО РАН (Красноярск). Для проведения экспериментов использовали следующие химические реагенты: никотинамидинуклеотид восстановленный (НАДН) (ICN, США), флавинмононуклеотид (ФМН) (SERVA, Германия), тетрадеканаль (RCHO) (Serva, Германия) и 0,05 М калий-фосфатный буфер pH 6,85.

В качестве источника биологически активного соединения использовались гуминовые вещества (ГВ) (препарат Гумат-80 производство ООО «Гумат», Иркутск, Россия). Препарат получен механохимической реакцией бурого окисленного угля (Черемховское месторождение, Россия) со щелочью (КОН, NaOH) (Левинский, 2000). Характеристики препарата: гуминовые кислоты ≈ 85%, растворимый калий (K_2O) – 9%, Fe – 1%, вода – 5%, pH 8-9 в 1% водном растворе. Реагенты для измерения биолюминесценции были следующими: люминол от Sigma-Aldrich, 3% раствор перекиси водорода (H_2O_2) (Тульского фармацевтического завода, Россия), $K_3[Fe(CN)_6]$ (Химреактив, Россия).

Для экспериментов выбрана концентрация ГВ, равная 10^{-4} г/л, которая не действует на интенсивность биолюминесценции биферментной системы. Выбор основан на ранее полученной зависимости интенсивности биолюминесценции от концентрации ГВ (рисунок 3), которая указывает на токсичность гуминового препарата при концентрации более 10^{-3} г/л (подавление биолюминесценции) [19].

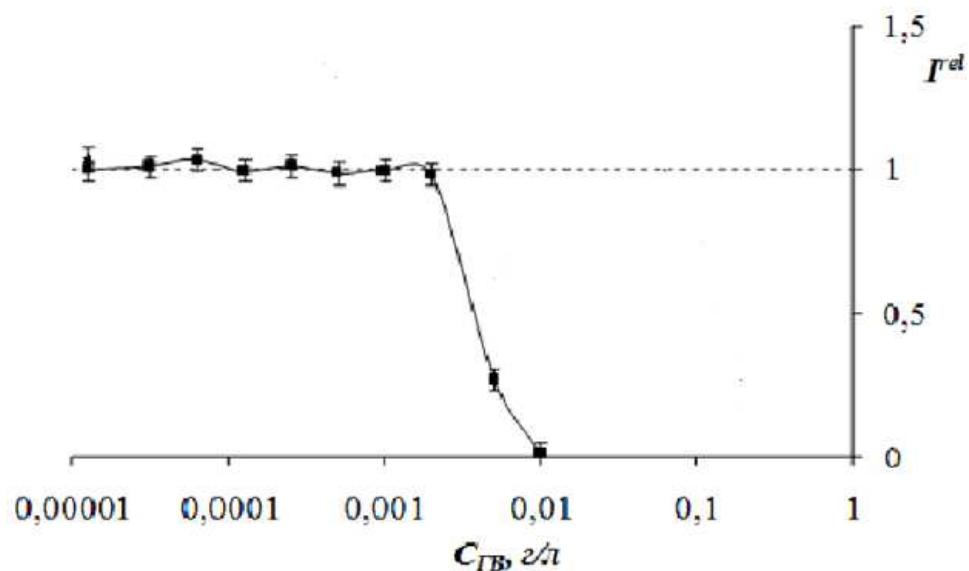


Рисунок 3 – Зависимость интенсивности биолюминесценции ферментативной системы, I^{rel} , от концентрации ГВ [19].

В качестве источника облучения использовалась тритиевая вода (НТО). Препараты НТО предоставлены кафедрой радиохимии МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва.

2.2. Регистрация биолюминесценции

Для регистрации кинетики биолюминесцентного сигнала был использован планшетный люминометр Luminoskan Ascent (Thermo Scientific, США), который измеряет световой поток автоматически по заданной программе (задается при помощи программного обеспечения (ПО) Ascent Software version 2.6 с использованием компьютера), при этом регистрация кинетики биолюминесцентного сигнала происходит сразу же после запуска реакции, что обеспечивает точность измерений и возможность сравнивать данные. Кроме того, ПО и устройство прибора позволяет провести одновременно измерение в 96 лунках микропланшета в течение большого промежутка времени.

В данной работе производилась регистрация максимальной интенсивности свечения биолюминесцентной системы контрольных (без токсичного соединения) – (I_o) и опытных (I) образцов. Погрешность измерений интенсивности биолюминесценции бактериальной, ферментативной систем в большинстве случаев была 1-2%.

2.3. Ферментативная система

Исследовали биолюминесцентную систему двух сопряженных реакций, катализируемых ферментами НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза и люцифераза для тестирования токсичности растворов.

Растворы готовили следующим образом: НАДН растворяли 0,05 М калий-фосфатном буфере с pH 6,8. Для приготовления раствора 0,0025% тетрадеканаля (RCHO) добавили 5 мл 0,05 М калий-фосфатного буфера (pH 6,8) к 50 мкл 0,25%-ному спиртовому раствору альдегида. Во флакон КРАБа (в состав которого входят препарат бактериальной люциферазы и НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазы) вносили 2 мл 0,05 М калий-фосфатного буфера. Растворы хранили на льду.

Для определения интенсивности биолюминесценции контрольного образца в лунку микропланшета люминометра вносили:

6 мкл раствора препарата ферментов «КРАБ»;

25 мкл $5,4 \cdot 10^{-4}$ М раствора ФМН;

25 мкл 0,0025% раствора RCHO;

50 мкл 0,05 М калий-фосфатного буфера (рН 6,8);

100 мкл $4 \cdot 10^{-4}$ М раствора НАДН.

Интенсивность биолюминесценции в ферментативной системе в присутствии радионуклида измеряли в смеси следующего состава:

6 мкл препарата ферментов «КРАБ» в растворе радионуклида (НТО);

25 мкл $5,4 \cdot 10^{-4}$ М раствора ФМН;

25 мкл 0,0025% раствора RCHO;

50 мкл 0,05 М калий-фосфатного буфера (рН 6,8);

100 мкл $4 \cdot 10^{-4}$ М раствора НАДН.

Интенсивность биолюминесценции в растворах радионуклида, I_p , сопоставляли со свечением контрольного образца, I_0 :

$$I_{rel}^p = I_p / I_0.$$

При исследовании действия гуминовых веществ на ферментативную систему, измерения интенсивности свечения контрольного образца проводили в растворе следующего состава:

6 мкл раствора препарата ферментов «КРАБ» с гуматом ($C_{ГВ}=10^{-4}$ г/л);

25 мкл 0,0025% раствора RCHO;

50 мкл 0,05 М калий-фосфатного буфера (рН 6,8);

25 мкл $5,4 \cdot 10^{-4}$ М раствора ФМН;

100 мкл $4 \cdot 10^{-4}$ М раствора НАДН.

Интенсивности биолюминесценции ферментативной системы в растворе радионуклида трития и гуминовых веществ, измеряли в смеси следующего состава:

6 мкл препарата ферментов «КРАБ» в растворе радионуклида трития в присутствии ГВ ($C_{ГВ}=10^{-4}$ г/л);

25 мкл 0,0025% раствора RCHO;

25 мкл $5,4 \cdot 10^{-4}$ М раствора ФМН;

100 мкл $4 \cdot 10^{-4}$ М раствора НАДН.

Общий объем смеси – 206 мкл.

Интенсивность биолюминесценции в присутствии радионуклида и гуминовых веществ, I_{P+GB} , сопоставляли ее со свечением контрольного образца, I_0 :

$$I^{rel}_{P+GB} = I_{P+GB}/I_0$$

Измерение свечения производили не раньше, чем через 30 мин после разведения препарата ферментов «КРАБ» 0,05 М калий-фосфатным буфером с целью стабилизации биолюминесценции ферментативной системы. Во всех случаях запуск реакции осуществлялся добавлением в реакционную смесь раствора НАДН. Использовали только свежеприготовленные растворы КРАБа, НАДН, ФМН, RCHO.

Каждое измерение проводили в 20–25 повторностях. Статистическая обработка результатов и построение графиков проводилась с использованием пакетов программы MS Office (Microsoft, США).

2.4 Исследование содержания АФК в ферментативной системе при воздействии трития

Для определения содержания АФК в ферментативной системе при воздействии бета-излучающего радионуклида НТО в присутствии гуматов использовали калибровочную зависимость интенсивности хемилюминесценции люминола от концентрации H_2O_2 , которая представлена на рисунке 4. Для получения данной калибровочной кривой в лунку микропланшета люминометра вносили следующую смесь:

40 мкл раствора H_2O_2 ;

135 мкл раствора люминола ($C_{\text{люминола}} = 10^{-4} \text{ M}$);

75 мкл раствора $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ($C_{\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]} = 10^{-3} \text{ M}$).

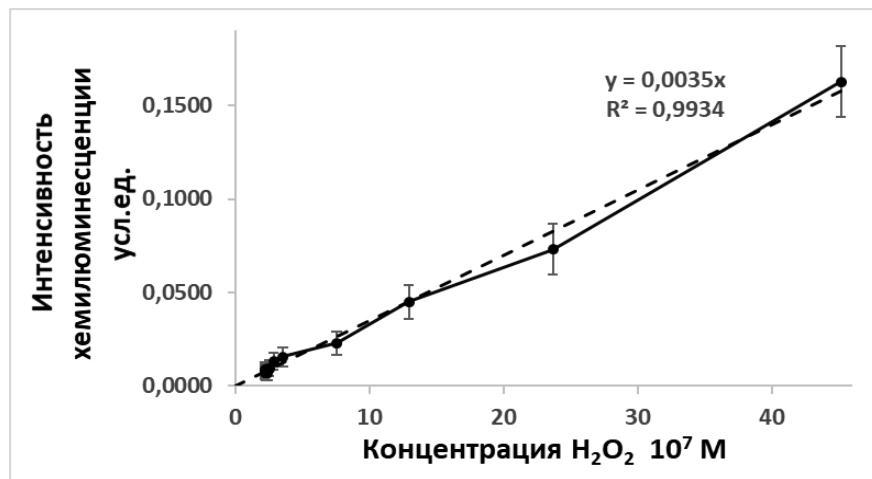


Рисунок 4 – Зависимость интенсивности хемилюминесценции люминола от концентрации пероксида водорода H_2O_2 в растворе 0,05 М калий-фосфатного буфера (pH 6,8)

Калибровочная кривая аппроксимирована линейной зависимостью с коэффициентом аппроксимации $R^2=0,99$.

Для определения содержания АФК в ферментативной системе в контрольных и радиоактивных образцах в лунку микропланшета люминометра вносили:

6 мкл раствора препарата ферментов «КРАБ» (или «КРАБ» в растворе радионуклида НТО);

25 мкл $5,4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ раствора ФМН;

25 мкл 0,0025% раствора RCHO;

50 мкл 0,05 М калий-фосфатного буфера (рН 6,8);

100 мкл $4 \cdot 10^{-4}$ М раствора НАДН;

50 мкл раствора люминола ($C_{\text{люминола}} = 10^{-4}$ М);

75 мкл раствора $K_3[Fe(CN)_6]$ ($C_{K_3[Fe(CN)_6]} = 10^{-3}$ М).

Состав реакционной смеси для определения содержания АФК в присутствии гуминовых веществ:

6 мкл препарата ферментов «КРАБ» в растворе радионуклида (НТО) в присутствии гуматов ($C_{\Gamma В} = 10^{-4}$ г/л);

25 мкл $5,4 \cdot 10^{-4}$ М раствора ФМН;

25 мкл 0,0025% раствора RCHO;

50 мкл 0,05 М калий-фосфатного буфера (рН 6,8);

100 мкл $4 \cdot 10^{-4}$ М раствора НАДН;

50 мкл раствора люминола ($C_{\text{люминола}} = 10^{-4}$ М);

75 мкл раствора $K_3[Fe(CN)_6]$ ($C_{K_3[Fe(CN)_6]} = 10^{-3}$ М).

Общий объем смеси составлял 331 мкл.

Интенсивность биолюминесценции в растворах радионуклида, I_p , сопоставляли со свечением контрольного образца, I_0 :

$$I^{rel}_p = I_p / I_0.$$

Каждое измерение проводили 20-25 повторностях. Статистическая обработка результатов и построение графиков проводилась в использованием пакетов прикладных программ MS Office (Microsoft, США). Интенсивность хемилюминесценции была зарегистрирована Luminoskan Ascent (Thermal Fisher Corp.). Все измерения проводились при комнатной температуре.

3. Результаты и обсуждения

3.1 Изменение эффекта трития под действием гуминовых веществ

Изучено влияние трития на биолюминесценцию биферментной системы в отсутствии и присутствии гуматов. Полученные результаты приведены на рисунках 5–7.

На рисунке 5 представлена зависимость относительной интенсивности биолюминесценции ферментативной системы от времени воздействия трития при различных радиоактивностях бактериальной среды: 1 – 0,03 МБк/л, 2 – 2 МБк/л, 3 – 40 МБк/л, 4 – 200МБк/л, 5 – 500 МБк/л.

Из рисунка 5 видно, что при воздействии трития любых концентраций наблюдается активация люминесценции, а ингибирование и задержки эффекта как в случае америция [48] не наблюдается. Аналогичные кинетические кривые биолюминесценции в присутствии трития были получены в предыдущих работах для люминесцентных бактерий [49]. Активация биолюминесценции бактерий и ферментативной системы приписывалась в данной работе «радиационному гормезису». Важно отметить, что эти эффекты трития относятся к низкодозовым: в условиях наших экспериментов, доза, поглощенная ферментативным раствором, не превышает величину 0,1 Грэй – условную границу низких доз. Так, для удельной радиоактивности $A=500$ МБк/л и максимального времени воздействия трития 150 мин, поглощенная доза приблизительно равна 0,08 Грэй.

С понижением активности трития в растворе, полученные кривые стремятся к контролю. Так, кривая с активностью 0,03 МБк/л выше контроля менее, чем на 30%.

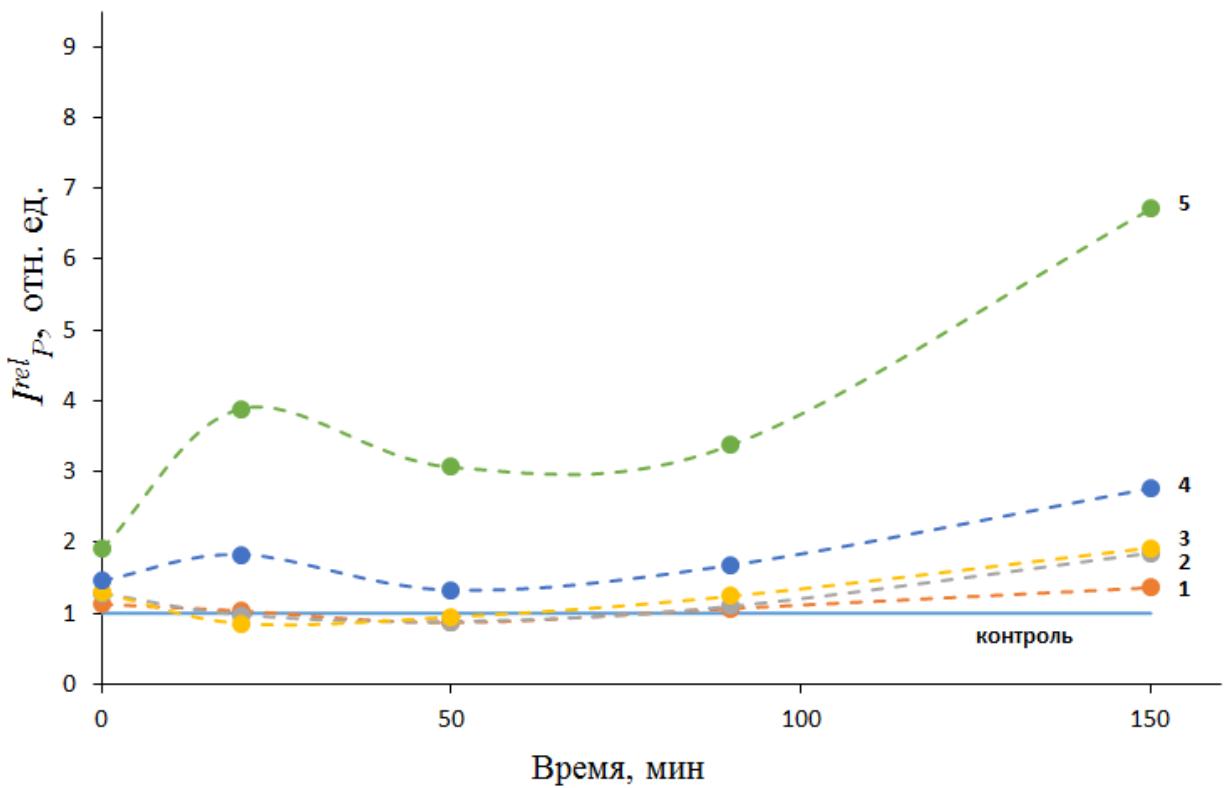


Рисунок 5 – Зависимость интенсивности биолюминесценции ферментативной системы от времени воздействия трития при различных радиоактивностях бактериальной среды: 1 – 0,03 МБк/л, 2 – 2 МБк/л, 3 – 40 МБк/л, 4 – 200МБк/л, 5 – 500МБк/л

На рисунке 6 представлена зависимость интенсивности биолюминесценции ферментативной системы от времени воздействия трития в присутствии гуматов при тех же радиоактивностях бактериальной среды. Для экспериментов выбрана концентрация гуматов ($C = 10^{-4}$ г/л), не изменяющая интенсивность биолюминесценции биферментной системы.

Из рисунка 6 видно, что воздействие трития на всех временных этапах в присутствии гуматов вызывает активацию люминесценции при любых концентрациях трития. Однако ход кинетических кривых изменился при действии гуматов, как видно из сравнения рисунков 5 и 6. Видно, что присутствие гуматов вызывает еще большую активацию люминесценции при всех временах воздействия и концентрациях трития.

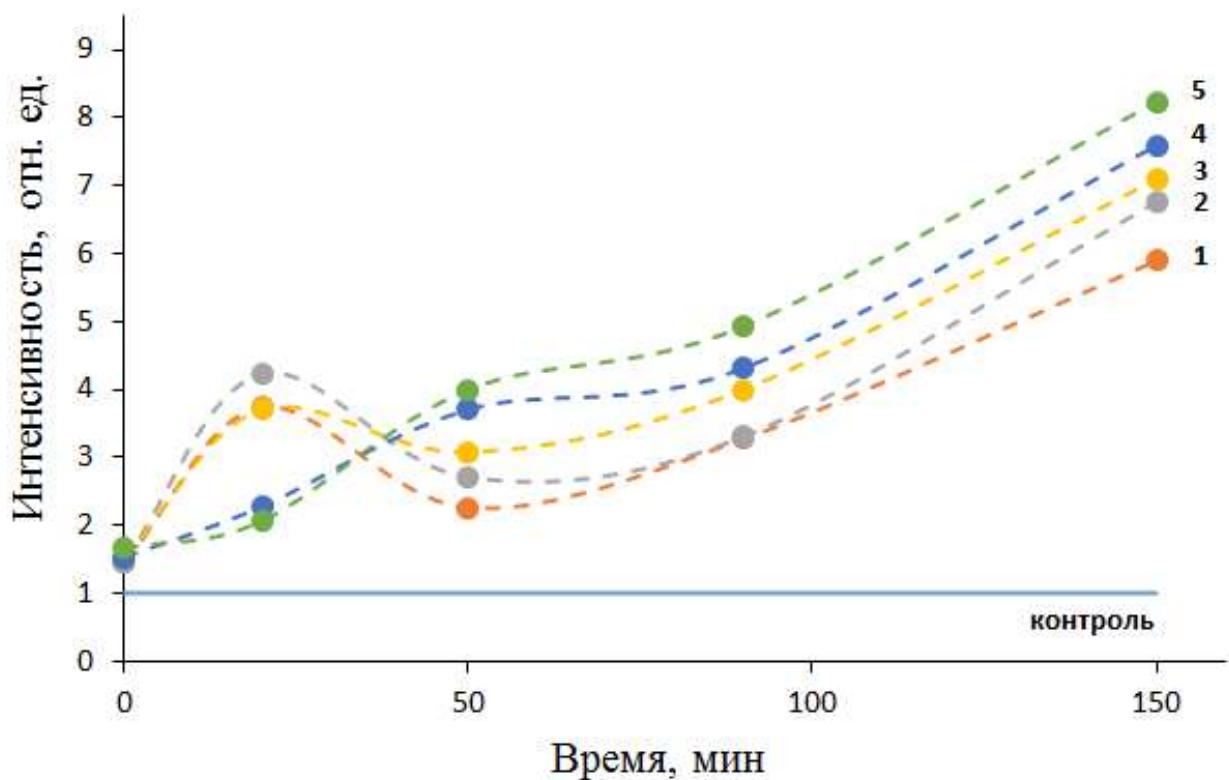


Рисунок 6 – Зависимость интенсивности биолюминесценции ферментативной системы от времени воздействия трития в присутствии гуматов ($C = 10^{-4}$ г/л) при различных радиоактивностях бактериальной среды: 1 – 0,03 МБк/л, 2 – 2МБк/л, 3 – 40 МБк/л, 4 – 200 МБк/л, 5 – 500 МБк/л.

Анализировали изменение эффекта трития под действием гуматов при разных временах (от 20 до 150 минут), сопоставляя кинетики биолюминесценции, представленные на рисунках 5 и 6. Для иллюстрации различий на рисунке 7 выбрано время инкубирования ферментов с тритием и гуминовыми веществами 150 минут и приведены зависимости интенсивности биолюминесценции от радиоактивности сред. Данные этого рисунка подтверждают, что добавление ГВ в радиоактивный раствор увеличивает интенсивность биолюминесценции при всех радиоактивностях среды. Аналогичный эффект виден из анализа данных для меньших времен инкубирования (см. приложения, рис. 10–12). Таким образом, гуминовые вещества дополнительно к эффекту трития увеличивают интенсивность биолюминесценции, демонстрируя синергетический эффект.

Разброс данных на начальных минутах биолюминесцентной реакции во всех случаях можно приписать стохастичности низкодозовых эффектов.

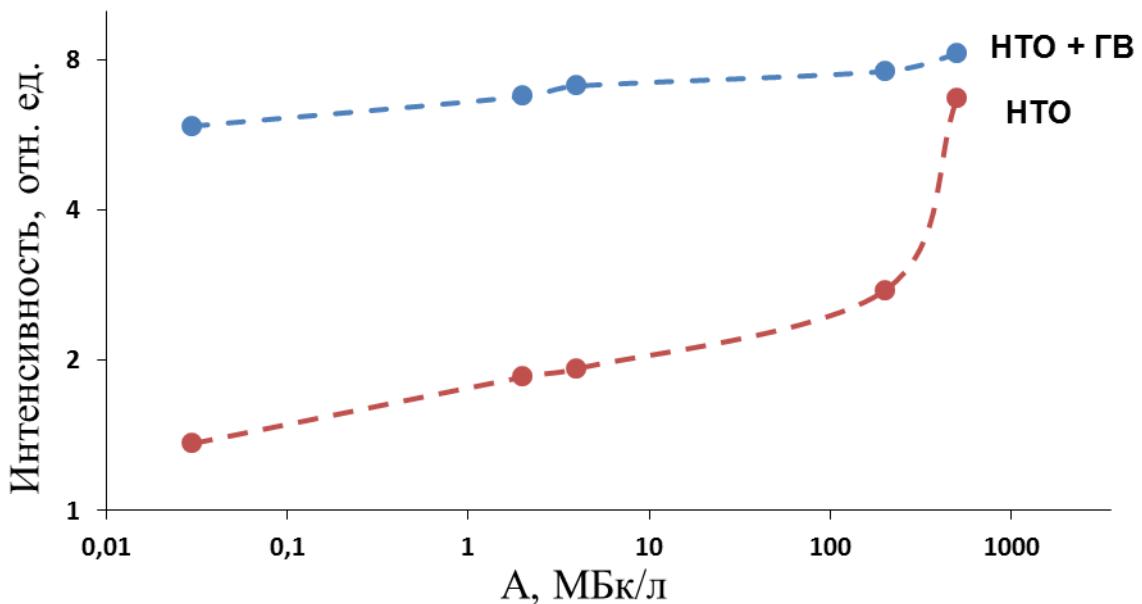


Рисунок 7 – Зависимость интенсивности биолюминесценции от радиоактивности бактериальной среды. Красные точки – НТО; Синие точки – НТО+Гуминовые вещества.
Время инкубирования ферментов с тритием и гуминовыми веществами – 150 минут

Из анализа рисунков 5–7 видно, что присутствие гуминовых веществ уменьшает различия эффектов трития в растворах различной радиоактивности, т.е. «унифицирует» воздействия трития. На это указывает соотношение тангенсов угла наклона зависимостей в присутствии и отсутствии гуматов, которое равно 3:5. (Расчет проведен до удельной радиоактивности $A = 200$ МБк/л).

Вероятно, эффект «унификации» и дополнительной активации ГВ-ами связан с возможностью участия различных функциональных групп макромолекул ГВ в сопряжённых процессах передачи электронной плотности к активным центрам на ферментах в водных растворах и возможно в сопряжении двух ферментов – люциферазы и редуктазы. Как известно, макромолекулы гуминовых веществ включают большое количество различных химических групп (см. рисунок 2 в литобзоре), которые сопряжены между собой двойными связями или представляют собой сопряженные ароматические структуры. Именно такие структуры играют роль «буферных окислительно-восстановительных систем», которые в природных системах способны смягчать

(унифицировать) различные воздействия. Именно способностью к унификации химических воздействий ранее было объяснено различие в антиоксидантной активности природных и искусственных биоактивных соединений [23].

3.2 Содержание АФК в ферментативной системе эффекта трития в присутствии гуминовых веществ

Изучено содержание АФК в ферментативной системе при воздействии трития в отсутствии и в присутствии гуминовых веществ. Полученные результаты приведены на рисунках 8–9.

На рисунке 8 представлена зависимость содержания АФК в ферментативной системе от удельной радиактивности трития.

Из рисунка 8 видно, что при воздействии трития любых концентраций в биолюминесцентной системе наблюдали как уменьшение содержания АФК (точки меньше 1), так и увеличение содержания АФК (точки более 1) по сравнению с контрольной нерадиоактивной средой, что связано с более (или менее) активным расходованием молекулярного кислорода в ходе биолюминесцентной реакции.

Вероятно уменьшение АФК в биолюминесцентной системе связано с более интенсивным образованием пероксидных интермедиатов в биолюминесцентной реакции (интермедиаты II и ПА на схеме рисунка 1, главы 1), по сравнению с нерадиоактивным контролем. На последних этапах биолюминесцентного процесса наблюдали увеличение АФК по сравнению с контрольным нерадиоактивным образцом.

Разброс данных на начальных минутах биолюминесцентной реакции связывают со стохастичностью низкодозовых эффектов.

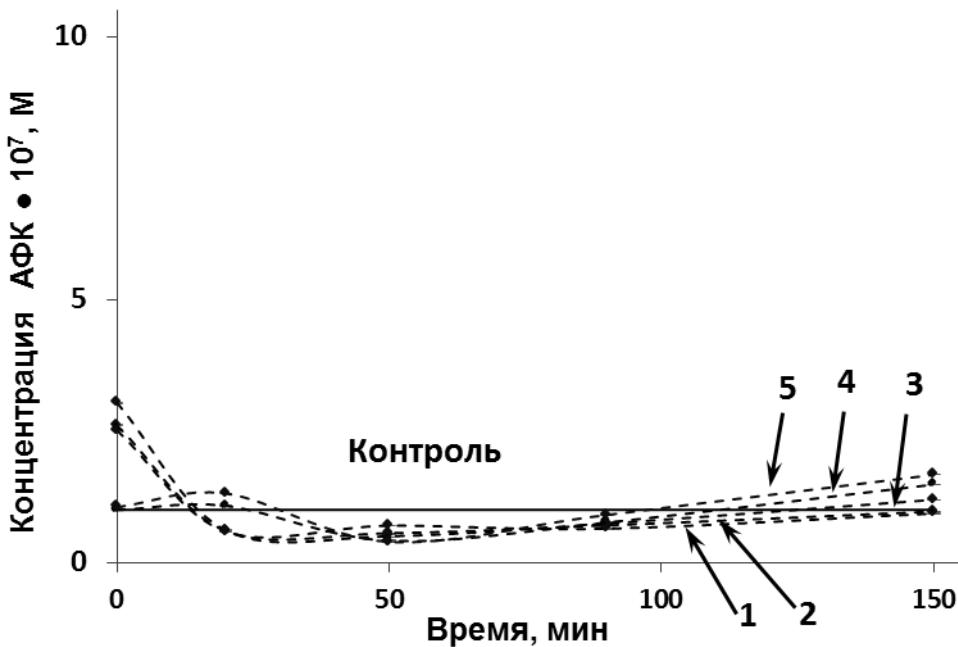


Рисунок 8 – Содержание АФК в ферментативной системе при воздействии трития различной концентрации.

Удельные радиоактивности трития: 1 – 0,03 МБк/л, 2 – 2 МБк/л, 3 – 4 МБк/л, 4 – 200 МБк/л, 5 – 500 МБк/л

На рисунке 9 представлена зависимость концентрация АФК в ферментативной системе при воздействии НТО в присутствии гуминовых веществ. Для экспериментов выбрана концентрация гуматов ($C = 10^{-4}$ г/л), не изменяющая интенсивность биолюминесценции биферментной системы.

Из рисунка 9 видно, что воздействие трития на последних временных этапах в присутствии гуматов вызывает менее активное расходование кислорода и больше накопление АФК по сравнению с нерадиоактивным контролем.

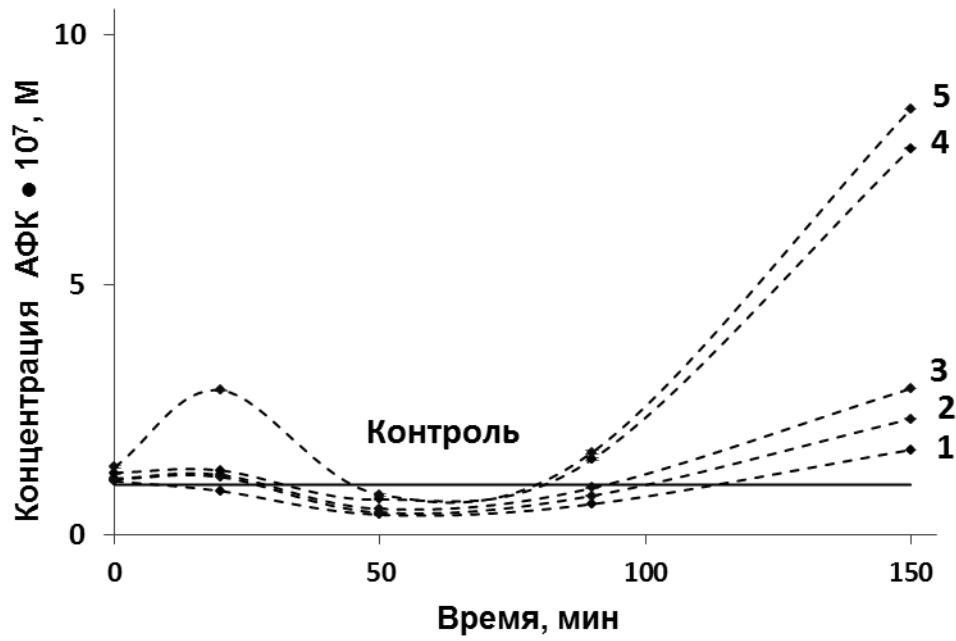


Рисунок 9 – Содержание АФК в ферментативной системе при воздействии НТО в присутствии гуминовых веществ.

Удельные радиоактивности трития: 1 – 0,03 МБк/л, 2 – 2 МБк/л, 3 – 4 МБк/л, 4 – 200 МБк/л, 5 – 500 МБк/л

3.3 Анализ корреляций между интенсивностью биолюминесценции и содержанием АФК

Предполагали, что интенсивность биолюминесценции биферментной системы связана с образованием АФК в растворах в присутствии трития. Сравнивали кинетики биолюминесценции и содержания АФК в этих растворах в присутствии и отсутствии гуминовых веществ. Для этого рассчитывали ранговые коэффициенты корреляции Спирмена, r , между интенсивностью бактериальной биолюминесценции и содержанием АФК в нерадиоактивных (контрольных) и радиоактивных растворах ферментов в отсутствии и присутствии гуминовых веществ.

В таблице 1А представлены коэффициенты корреляции r между интенсивностью биолюминесценции и содержанием АФК при воздействии НТО разной концентрации, в отсутствии гуминовых веществ.

| А) | | r (в отсутствии ГВ) | | | |
|----------|------------|-----------------------|----------|-----------|-----------|
| Контроль | 0,03 МБк/л | 2 МБк/л | 40 МБк/л | 200 МБк/л | 500 МБк/л |
| 0,74 | 0,24 | 0,34 | 0,29 | 0,87 | 0,70 |

| Б) | | r (в присутствии ГВ) | | | |
|----------|------------|------------------------|----------|-----------|-----------|
| Контроль | 0,03 МБк/л | 2 МБк/л | 40 МБк/л | 200 МБк/л | 500 МБк/л |
| 0,71 | 0,67 | 0,85 | 0,83 | 0,87 | 0,78 |

Таблица 1 – Коэффициенты корреляции Спирмена, r , между интенсивностью бактериальной биолюминесценции и содержанием АФК в нерадиоактивных (контрольных) и радиоактивных растворах ферментов в отсутствии А и в присутствии Б гуминовых веществ

Результаты показали высокие положительные корреляции ($r > 0,7$) между интенсивностью биолюминесценции и содержанием АФК только для контрольного раствора и раствора с высокой концентрацией НТО (200 МБк/л, 500 МБк/л). Полученные значения коэффициентов корреляции свидетельствует о прямой связи между интенсивностью бактериальной биолюминесценции и

содержанием АФК в этих растворах. Значения коэффициентов корреляции для растворов с низкой радиоактивностью (0,03 МБк/л, 2 МБк/л, 40 МБк/л) свидетельствует об отсутствии связи между интенсивностью бактериальной биолюминесценции и содержанием АФК.

В таблице 1Б представлены коэффициенты корреляции r между интенсивностью биолюминесценции и содержанием АФК при воздействии НТО разной концентрации, в присутствии гуминовых веществ. Результаты показали высокие положительные корреляции ($r > 0,7$) между интенсивностью биолюминесценции и содержанием АФК во всех средах – контрольных и радиоактивных.

В отличие от растворов без гуминовых веществ (Таблица 1А), растворы, содержащие гуматы (Таблица 1Б), показали большие величины r при всех концентрациях (радиоактивностях) трития. Это указывает на то, что даже при малых концентрациях трития существует зависимость между интенсивностью биолюминесценции и содержанием АФК в присутствии гуминовых веществ.

Таким образом, расчеты показывают, что гуминовые вещества уменьшают разброс в зависимостях: интенсивность биолюминесценции – содержание АФК при малых концентрациях НТО и, тем самым, уменьшают стохастичность процессов с участием АФК. Этот эффект вероятно связан с наличием большого количества сопряженных химических групп в гуматах, что определяет их «буферные свойства» в отношении всех физико-химических процессов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Гуминовые вещества, дополнительно к эффекту трития, увеличивают интенсивность биолюминесценции ферментативной системы, демонстрируя синергетический эффект.
2. Гуминовые вещества «унифицируют» воздействие трития на биолюминесценцию ферментативной системы, т.е уменьшают зависимость интенсивности биолюминесценции от радиоактивности среды. Такой эффект связан с присутствием в структурах гуматов большого количества сопряженных химических групп.
3. Статистический анализ корреляций между интенсивностью биолюминесценции и содержанием АФК показывает, что (А) в нерадиоактивном растворе и при больших концентрациях трития (200 и 500 МБк/л) интенсивность биолюминесценции ферментативной системы связана с потреблением АФК; (Б) при малых концентрациях трития гуминовые вещества уменьшают стохастичность процессов и формируют зависимость между интенсивностью биолюминесценции и содержанием АФК.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГВ – гуминовые вещества;
НАДН – никотинамиддинуклеотид;
НАД(Ф)Н – никотинамиддинуклеотидфосфат;
ФМН – flavинмононуклеотид;
КРАБ – комплект реактивов аналитической биолюминесценции;
ПО – программное обеспечение;
АФК – активные формы кислорода.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ:

1. Alexandrova, M. Effect of americium-241 on luminous bacteria. Role of peroxides / M. Alexandrova, T. Rozhko, G. Vydryakova, N. Kudryasheva // Journal of Environmental Radioactivity. – 2011. – Vol. 4. – P. 407–411.
2. Данн, А. К. Регуляция биолюминесценции в фотобактерии лейогнатиевой деформации KNH6 / А. К. Данн, Б. А. Радер, Е. В. Стабб, М. Џ. Манделевая // Ж. Бактериол. – 2015– V. 197. – P. 663-675.
3. Кратасюк, В. А. Использование бактериальной биолюминесценции и биолюминесцентного анализа / В. А. Кратасюк, И. И. Гительзон // Успехи микробиологии. – 1987. – Т.21. – С. 3–30.
4. Sato, Y. Observation of oscillation in bacterial luminescence / Y. Sato, S. Sasaki // Analytical Sciences. – 2008. – Vol. 24. – P. 423–426.
5. Hastings, J. W. Bioluminescence / J. W. Hastings // Cell Physiology. 3rd Edition. / Academic Press – New York, 2001. – P. 1115–1131.
6. Grabert, E. About the effect of nutrients on the luminescent bacteria test / E. Grabert, F. Kossler // Bioluminescence and chemiluminescence, Wiley, Chichester. – 1997. – P. 291–294.
7. Kratasyuk, V. A. The use of bioluminescent biotests for study of natural and laboratory aquatic ecosystems / V. A. Kratasyuk, E. N. Esimbekova, M. I. Gladyshev, E. B. Khromichek, A. M. Kuznetsov, E. A. Ivanova // Chemosphere. – 2001. – №42. – P. 909–915.
8. Girotti, S. Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria / S. Girotti, E. N. Ferri, M. G. Fumo, E. Maiolini // Analytica chimica acta. – 2008. – Vol. 608. – № 1. – P. 2–29.
9. Stom, D. I. Bioluminescent method in studying the complex effect of sewage components / D. I. Stom, T. A. Geel, A. E. Balayan, A. M. Kuznetsov, S. E. Medvedeva // Archives of Environmental Contamination and Toxicology – 1992. – №22. – P. 203–208.

10. Xiaoyan Y. Ma, Bioassay based luminescent bacteria: Interferences, improvements and applications / Xiaoyan Y. Ma, Xiaochang C. Wang et al. // Science of the Total Environment. – 2014. – Т. 468-469. – С. 1-11.
11. Кудряшева, Н. С. Физико-химические основы биолюминесцентного анализа / Н. С. Кудряшева, В. А. Кратасюк, Е. Н. Есимбекова. – Красноярск : КГУ, 2000. – 154с
12. Гительзон, И. И. Светящиеся бактерии / И. И. Гительзон, Э.К. Родичева, С.Е. Медведева и др. — Новосибирск, 1984.
13. Hastings J. W. Intermediates in the bioluminescent oxidation of reduced flavin mononucleotide / J. W. Hastings, Q. H. Gibson // Journal of Biological Chemistry. – 1963. – V. 238. – P. 2537 – 2554.
14. Vervoort J. Bacterial luciferase, a carbon-13, nitrogen-15 and phosphorus-31 nuclear magnetic resonance investigation / J. Vervoort, F. Muller, D. J. O’Kane, J. Lee, A. Bacher // Biochemistry. – 1986. – V. 25. – P. 8067 – 8075.
15. McCapra F. Chemical generation of excited states: the basis of chemiluminescence and bioluminescence / F. McCapra // Methods in Enzymology. – 2000. – V. 305. – P. 3 – 47.
16. Корнилаева Г. В. Гуминовые вещества как перспективные соединения для создания микробицидных препаратов / Г.В. Корнилаева, И.В. Перминова, А.В. Гилязова, К.М. Хаметова, Э.В. Карамов. // Российский иммунологический журнал. — 2010. — Т. 4, № 3. — С. 255–260.
17. Орлов Д. С. Гумусовые кислоты почв. М.: Изд-во МГУ. 1974. 287 с.
18. Соркина, Т. А. Получение и применение биологически доступных соединений железа, стабилизованных гуминовыми веществами: дис., . канд. химических наук: 03.02.08 / Соркина Татьяна Александровна— Москва, 2014. – 163 с.
19. Тарасова, А. С. Использование биолюминесцентных систем для изучения закономерностей детоксикации растворов модельных поллютантов гуминовыми веществами : автореф. дис. ... канд. биологических наук : 03.01.02 / Тарасова Анна Сергеевна. – Красноярск, 2012. – 22 с.

20. Перминова, И. В. Гуминовые вещества в контексте зеленой химии / И.В. Перминова, Д.М. Жилин // Зеленая химия в России. – М. : Изд-во МГУ, 2004. – С. 146-162.
21. Lorenzo, J. I. Effect of humic acids on speciation and toxicity of copper to paracentrotus lipids larvae in seawater / J.I. Lorenzo, O. Nieto, R. Beiras // Aquatic toxicology. – 2002. – V. 58. – N. 1-2. – P. 27-41.
22. Damian, G. E. Mobilization of Cu and Pb from multi-metal contaminated soils by dissolved humic substances extracted from leonardite and factors affecting the process / G.E. Damia, V. Micle, I.M. Sur // Journal of Soils and Sediments. – 2019. – Vol. 13, c. 1–13.
23. Sachkova, A. S. Biological activity of carbonic nano-structures comparison via enzymatic bioassay / A. S. Sachkova, E. S. Kovel, G. N. Churilov, D. I. Stom, N. S. Kudryasheva // Journal of Soils and Sediments. – 2019. – Vol. 7. – P. 2689-2696.
24. Kudryasheva, N. S. Bioluminescent Enzymatic Assay as a Tool for Studying Antioxidant Activity and Toxicity of Bioactive Compounds / N. S. Kudryasheva, E. S. Kovel, A. S. Sachkova, A. A. Vorobeva, V. G. Isakova, G. N. Churilov // Photochemistry and Photobiology. – 2017. – Vol. 93, № 2, P. 536–540.
25. Sachkova, A. S. ON MECHANISM OF ANTIOXIDANT EFFECT OF FULLERENOLS / A. S. Sachkova, E. S. Kovel, G. N. Churilov, O. A. Guseynov, A. A. Bondar, I. A. Dubinina, N. S. Kudryasheva // Biochemistry and Biophysics Reports. – 2017. – Vol. 9. – P. 1–8.
26. Tarasova, A. S. Antioxidant activity of humic substances via bioluminescent monitoring in vitro / A. S. Tarasova, D. I. Stom, N. S. Kudryasheva // Environmental Monitoring and Assessment. – 2015. – Vol. 187, № 3. – P. 89.
27. Kudryasheva, N. S. Pollutant toxicity and detoxification by humic substances: mechanisms and quantitative assessment via luminescent biomonitoring / N. S. Kudryasheva, A. S. Tarasova // Environmental Science Pollution Research. – 2015. – Vol. 22, № 1. – P. 155–167.

28. Tarasova, A. S. Bioluminescence as a tool for studying detoxification processes in metal salt solutions involving humic substances / A. S. Tarasova, S. L. Kislan, E. S. Fedorova, A. M. Kuznetsov, O. A. Mogilnaya, D. I. Stom, N. S. Kudryasheva // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2012. – № 117. – P. 164–170.
29. Tarasova, A. S. Bioluminescent toxicity monitoring of oxidizer solutions: effect of humic substances / A. S. Tarasova, D. I. Stom, N. S. Kudryasheva // Environmental Toxicology and Chemistry. – 2011. – Vol. 30, № 5. – P. 1013–1017.
30. Rozhko, T.V. Detoxification of AM-241 solutions by humic substances: bioluminescent monitoring / T.V. Rozhko, L.G. Bondareva, O.A. Mogilnaya, G.A. Vydryakova, A.Ya. Bolsunovsky, D.I. Stom, N.S. Kudryasheva // Analytical and bioanalytical chemistry. – 2011. – V. 400. – N. 2. – P. 329-334.
31. Novikov, A. P. Migration and concentration of artificial radionuclides in environmental objects / A. P. Novikov // Geochemistry International. – 2010. – Vol. 48, № 13, c. 1263–1387.
32. Isinkaye, O. M. Distribution and Multivariate Pollution Risks Assessment of Heavy Metals and Natural Radionuclides Around Abandoned Iron-Ore Mines in North Central Nigeria / O.M. Isinkaye // Earth Systems and Environment. – 2018. – Vol. 2, № 2. – P. 331–343.
33. Popovic, D. Radionuclides and heavy metals in Borovac, Southern Serbia / D. Popovic, D. Todorovic, M. Frontasyeva, J. Ajtic, M. Tasic, S. Rajsic // Environ Sci Pollut Res. – 2008. – Vol. 15, № 1. – P. 509–520.
34. Kılıç, Ö. Multi-pollutant monitoring in a rehabilitated estuary: elements / Ö. Kılıç, M. Belivermiş, N.Sezer, G. Kalaycı, F.Gözel // Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. – 2019. – Vol. 8. – P. 1–8.
35. Academician, G. G. Artificial radionuclides in edible wild mushrooms and berries of the murmansk region / G. G. Academician, N. E Matishov, I. S. Kasatkina, Usyagina, D. A. Farion // Akademii Nauk. – 2014. – Vol. 455, № 5. – P. 589–594.
36. Kapanadze, K. Distribution of natural radionuclides in the soils and assessment of radiation hazards in the Khrami Late Variscan crystal massif (Georgia)

/ K. Kapanadze, A. Magalashvili, P. Imnadze // Journal Heliyon. – 2019. – Vol. 5, № 3. – P.1–19.

37. Снигирева, Г. П. Цитогенетическое обследование профессионалов – атомщиков подвергавшихся хроническому воздействию бета –излучения трития / Г. П. Снигирева Т. И. Хаймович, А. Н. Богомазова // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2009. – Т.49, № 1. – С.60-67

38. Bundy, K. Tritium, health effects and dosimetry / K. Bundy, B. Thériault, R. Lane, J. Burtt, P. Thompson // Thermal Energy Storage. – 2012. – Vol. 3. – P.26–29.

39. Alizadeh, E. Environmental and Safety Aspects of Using Tritium in Fusion / E. Alizadeh // Fusion Energ Journal – 2006. – Vol. 25. – P.47–55.

40. Hara, M. Tritium measurement I—tritium in gas, liquid, and solid / M. Hara, Y. Kawamura , T. Tanabe // Journal of Fusion Energy. – 2006. – Vol. 25. – P. 137-164.

41. Davis, P. A. Tritium in the environment / P. A. Davis, D. C. Galeriu // Encyclopedia of sustainability science and technology. – 2012. – Vol. 589. – P. 27-29.

42. Deng, K. Tritium concentrations in precipitation in Shanghai / K. Deng, L. Wang, ZH. Xia // Nuclear Science and Techniques. – 2018. – Vol. 29. – P.1– 6.

43. Эванс, Э. Тритий и его соединения // М.: Атомиздат. – 1970. – 311 с.

44. Колупаев, Ю. Е. Активные формы кислорода в растениях при действии стрессоров: образование и возможные функции // ВісникХарківського національного аграрного університету. Серіябіологія – 2007. – Вип. 3 (12). – С. 6-26

45. Levine, R. L. Oxidative modification of proteins during aging / R. L. Levine // Experimental Gerontology. – 2001. – Vol. 9, № 9. – P. 1495–1502.

46. Hayyan, M. Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications / M. Hayyan, M. A. Hashim, I. M. AlNashef // Chemical Reviews. – 2016. – Vol. 116, № 5. – P. 3029–3085

47. Hancock, J. T. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways / J. T. Hancock, R. Desikan, S. J. Neill // Biochemical Society Transactions. – 2001. – Vol. 29. – P. 345–350.
48. Rozhko, T. V. Effect of low-level α -radiation on bioluminescent assay systems of various complexity / T. V. Rozhko, N. S. Kudryasheva, A. M. Kuznetsov, G. A. Vydryakova, L. G. Bondareva , A. Ya. Bolsunovsk // Photochemical and Photobiological Sciences. – 2007. – Vol. 3. – P. 67–70.
49. Selivanova, M. A. Effect of tritium on luminous marine bacteria and enzyme reactions / M. A. Selivanova, O. A. Mogilnaya, G. A. Badun, G. A. Vydryakova, A. M. Kuznetsov, N. S. Kudryasheva // Journal of Environmental Radioactivity. – 2013. – Vol. 120. – P. 19–25.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

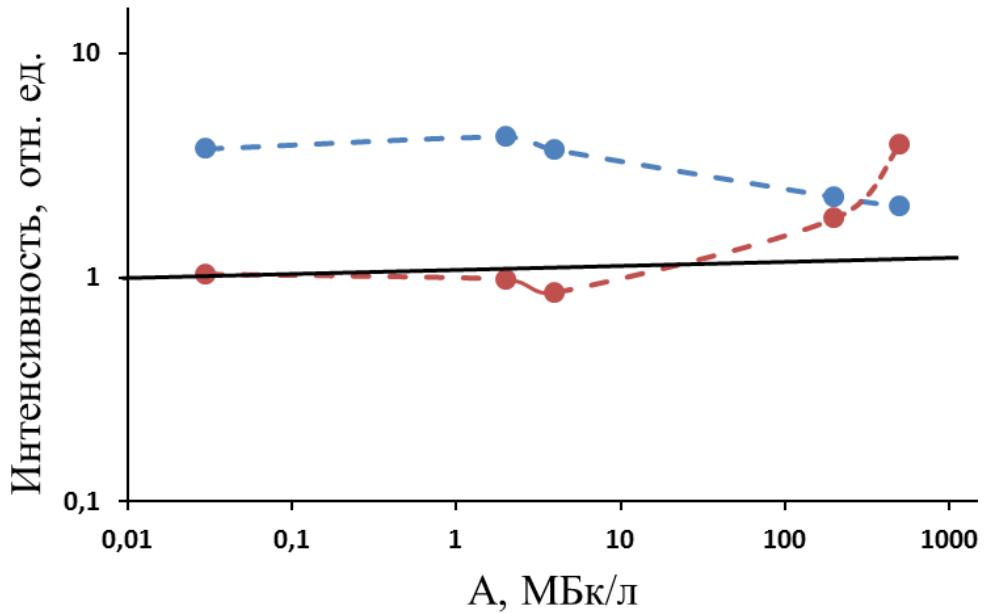


Рисунок 10 – Зависимость интенсивности биолюминесценции от радиоактивности бактериальной среды. Красные точки – НТО; Синие точки – НТО+Гуминовые вещества.
Время воздействия трития и гуминовых веществ – 20 минут

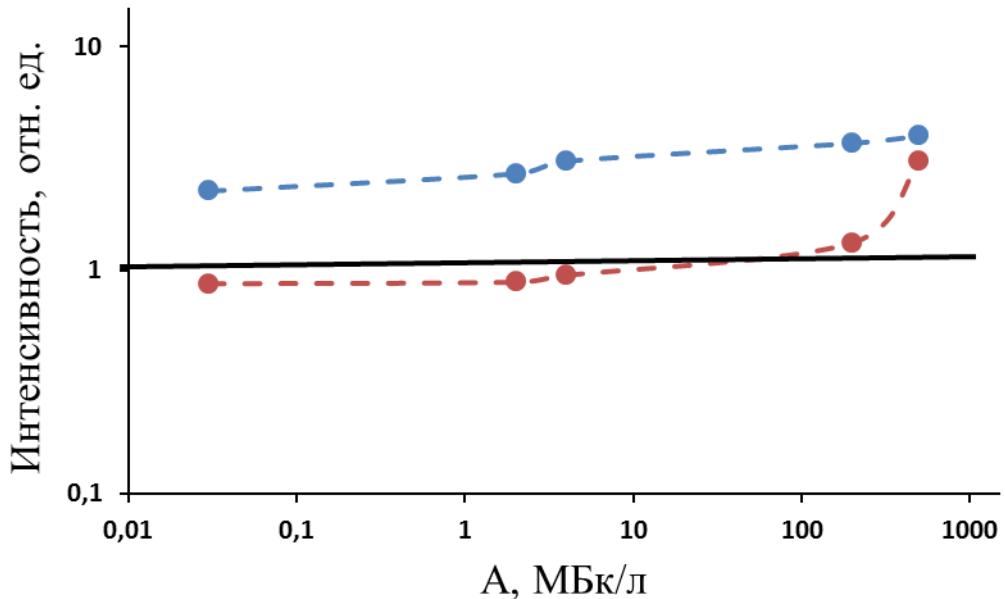
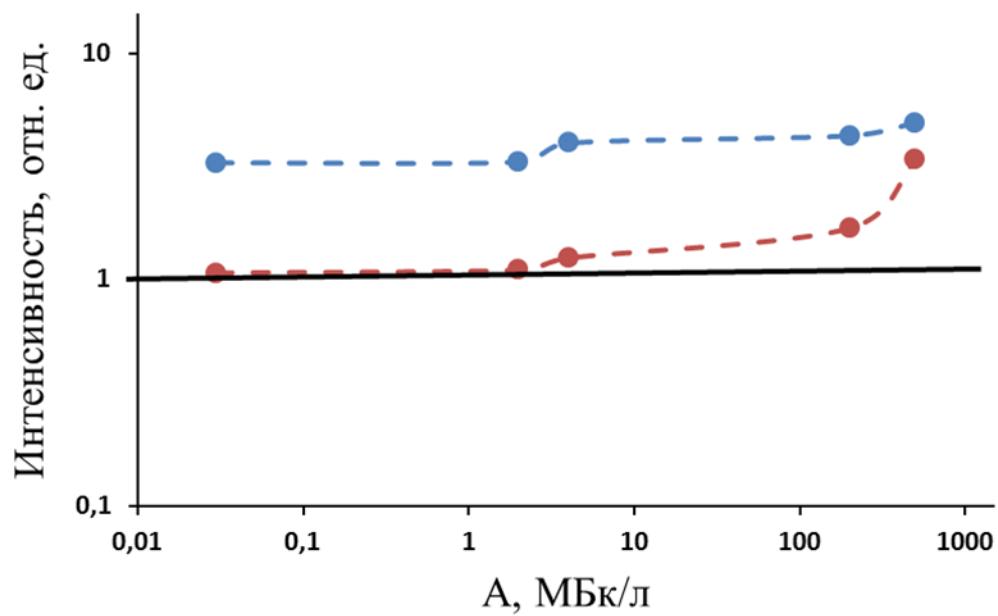


Рисунок 11 – Зависимость интенсивности биолюминесценции от радиоактивности бактериальной среды. Красные точки – НТО; Синие точки – НТО+Гуминовые вещества.
Время воздействия трития и гуминовых веществ – 50 минут



Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

В.А. Кратасюк В.А. Кратасюк
«25 » июня 2019 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

03.03.02 – физика

Совместное воздействие трития и гуминовых веществ на
биолюминесценцию ферментативной системы

Руководитель

Кудряшев Н.С. проф., д.ф-м.н. Н.С. Кудряшева
подпись, дата

Руководитель

Рожко Т.В. доцент., к.б.н Т.В. Рожко
подпись, дата

Выпускник

Мурзова О.Е. О.Е. Мурзова
подпись, дата

Красноярск 2019