

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой

« \_\_\_\_\_ » 20 \_\_\_\_ г.

## **МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

**АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА И НИЗКОДОЗОВОЕ ВЛИЯНИЕ  
ТРИТИЯ НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ**

03.04.02 Физика  
03.04.02.01 Биофизика

Научные руководители \_\_\_\_\_ проф., д.ф.-м.н. Н.С. Кудряшева  
\_\_\_\_\_  
доцент, к.б.н., Т.В. Рожко

Выпускник \_\_\_\_\_ Е.И. Ноговицына  
Рецензент \_\_\_\_\_ Т.А. Зотина  
с.н.с., к.б.н.

Красноярск 2019

## РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме «Активные формы кислорода и низкодозовое влияние трития на бактериальные клетки» содержит 53 страниц текстового документа и 6 рисунков, 1 таблицу и 61 литературных источников.

**ТРИТИЙ, НИЗКОДОЗОВЫЙ ЭФФЕКТ, СВЕТЯЩИЕСЯ БАКТЕРИИ, АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА, БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ, РАДИАЦИОННЫЙ ГОРМЕЗИС, ЭФФЕКТ СВИДЕТЕЛЯ, ТОРИЙ.**

Цель работы – выявление биологической роли активных форм кислорода (АФК) при хроническом низкодозовом воздействии бета-излучающего радионуклида трития и сопоставление с аналогичным воздействием альфа-излучающего радионуклида тория-232.

Рост загрязнения окружающей среды техногенными радионуклидами ставит перед исследователями новую задачу – изучение механизмов воздействия низкодозового облучения на живые организмы. Биологическое действие ионизирующего излучения связано с образованием активных форм кислорода. Низкодозовое облучение организмов представляют особый интерес, так как он может активировать физиологические функции организмов, наряду с их подавлением – эффект «радиационного гормезиса».

Показано, что низкодозовое воздействие трития на люминесцентные бактерии увеличивают интенсивность биолюминесценции и выработку АФК. Рассчитаны коэффициенты корреляции Спирмена и подтверждены связи между интенсивностью биолюминесценции и образованием АФК. Воздействие трития объяснено с позиций «эффекта свидетеля» и «сигнальной» функции АФК. Проведен сравнительный анализ между воздействием трития и тория-232 на бактериальные клетки, определены сходства (рост интенсивности биолюминесценции) и различия (содержания АФК в бактериальной и безбактериальных средах). Таким образом, несмотря на низкую энергию распада трития, следует учитывать его влияние на водную биоту через продуцирование АФК микроорганизмами.

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1 Обзор литературы .....	8
1.1 Биолюминесцентные системы и их использование для мониторинга токсичности окружающей среды.....	8
1.1.1 Тестовые системы на основе морских светящихся бактерий.....	8
1.1.2 Механизм биолюминесценции морских бактерий.....	9
1.1.3 Использование биолюминесцентных систем для мониторинга токсичности окружающей среды.....	13
1.2 Радиоактивное излучение и его источники.....	15
1.2.1 Типы источников ионизирующего излучения .....	15
1.2.2 Взаимодействие ионизирующего излучения с веществом .....	17
1.2.3 Биологические эффекты ионизирующего излучения.....	20
1.2.4 Радиоактивные элементы торий и тритий в окружающей среде .....	22
1.3 Роль активных форм кислорода в биологических процессах .....	24
1.3.1 Радиолиз воды .....	24
1.3.2 Характеристика активных форм кислорода.....	24
1.3.3 Активные формы кислорода – как сигнальные молекулы .....	26
2 Материалы и методы исследования .....	29
2.1 Объекты исследований .....	29
2.2. Регистрация биолюминесценции бактериальной системы.....	29
2.2.1 Исследование биолюминесценции в присутствии трития .....	29

2.2.2 Исследование биолюминесценции в присутствии тория-232 .....	30
2.3 Определение содержания АФК в бактериальной суспензии хемилюминесцентным люминольным методом .....	31
2.4 Статистическая обработка методом ранговой корреляции Спирмена.....	33
<b>3 Воздействие радионуклидов на бактериальные клетки. Роль активных форм кислорода .....</b>	<b>34</b>
3.1 Влияние трития на биолюминесценцию морских бактерий .....	34
3.2 Содержание АФК в бактериальной суспензии в присутствии трития.....	35
3.3 Коэффициенты корреляции Спирмена между интенсивностью биолюминесценции и содержанием АФК в присутствии трития.....	37
3.4. Особенности влияния трития на клетки светящихся бактерий при низкодозовом хроническом облучении .....	38
3.5 Воздействие тория-232 на интенсивность биолюминесценции морских бактерий .....	39
3.6 Исследование содержание АФК в люминесцентных бактериях при воздействии тория-232.....	41
3.7 Сравнительный анализ воздействия радионуклидов трития и тория-232 на люминесцентные бактерии .....	42
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>44</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>45</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....</b>	<b>46</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....</b>	<b>47</b>

## **ВВЕДЕНИЕ**

Биологические эффекты низкоинтенсивного излучения в настоящее время представляют особый интерес в связи с расширением районов с радиоактивными загрязнениями. Продукты радиоактивного распада могут воздействовать на сопряженные химические и биологические процессы в природных экосистемах, сопровождаемые естественным изменением баланса экосистемы в целом.

Биологические эффекты низкодозовой радиации связаны с образованием активных форм кислорода (АФК) [1, 2]. Известно, что АФК, образующиеся в водных экосистемах в результате радиоактивного распада, воздействуют на их обитателей [3, 4, 5]. С другой стороны, АФК являются продуктами естественного метаболизма водных организмов [6, 7]. Представляет интерес взаимосвязь между содержанием АФК в радиоактивных растворах и изменением физиологических функций организмов. Низкодозовое облучение организмов представляют особый интерес, так как оно способно активировать физиологические функции организмов – эффект «радиационного гормезиса» [8, 9, 10]. Известно, производство АФК в водных растворах бета- и альфа-излучающих радионуклидов различается на порядки [11], поэтому актуальным является сопоставление физиологических и содержания АФК в растворах различных радионуклидов в процессе жизнедеятельности организмов.

Выбор объектов исследования (бета-излучающего радионуклида трития и альфа-излучающего радионуклида тория-232) связан с тем, что эти радионуклиды являются природными и фонообразующими; техногенное загрязнение окружающей среды часто сопровождается ростом содержания этих радионуклидов.

Тритий ( $^3\text{H}$  или Т) является бета-излучающим радиоизотопом водорода и считается одним из менее опасных радионуклидов. Это один из самых распространенных продуктов радиационного распада радиоактивных изотопов, использующихся в атомной промышленности. В настоящее время

концентрация трития в Мировом океане варьируется; ее локальный подъем отмечен в районах атомных электростанций и после ядерных испытаний и инцидентов. Несмотря на то, что энергия трития мала, попадая в ткани, он создает ионизацию среды. При его распаде образуется инертный газ гелий, из-за которого могут рваться водородные связи в живых клетках, и, что особенно важно – в молекулах ДНК, которое может сказываться как на нарушении процесса синтеза органических структур при жизни индивида, так и оказывать воздействие на наследственность, возможно отдаленную.

Торий-232 ( $^{232}\text{Th}$ ) – это природный альфа-излучатель, является наиболее распространенным и самым долгоживущим изотопом тория. Торий-232 используется в качестве ядерного горючего в уран-ториевом реакторе; при его работе выделяется колоссальное количество энергии. Специалисты называют торий, в частности торий-232, «ядерным топливом будущего». Опасность тория-232 как внешнего источника излучения невысока, однако, при попадании в тело человека во время приема пищи или при контакте с кожей он представляет большую опасность. Так, попадая в кровь, он может привести к заболеваниям кроветворной системы и к образованию специфических опухолей.

Микроорганизмы являются основным и самым простым биологическим компонентом водных экосистем, они вносят значительный вклад в поддержание баланса в экосистемах. Продукты метаболизма водных микроорганизмов могут влиять на всех обитателей водных сред. Биолюминесцентные системы, основанные на светящихся бактериях, являются подходящими биообъектами для изучения биологических эффектов радиации. В качестве тестируемой физиологической функции биолюминесцентных систем используется интенсивность свечения. Для выявления роли АФК в работе использовали хемилюминесцентный люминольный метод, который широко используется для определения содержания пероксидов.

Цель работы: выявление биологической роли активных форм кислорода при хроническом низкодозовом воздействии бета-излучающего радионуклида

трития и сопоставление с аналогичным воздействием альфа-излучающего радионуклида тория-232.

В работе поставлены следующие задачи:

1. Изучить воздействие трития на кинетику биолюминесценции морских бактерий *P. Phosphoreum* в условиях хронической низкодозовой нагрузки.

2. Определить содержание АФК в условиях хронического низкодозового воздействия трития на бактериальную суспензию хемилюминесцентным люминольным методом.

3. Провести корреляционный анализ между кинетическими зависимостями интенсивности биолюминесценции и содержания АФК в бактериальных средах при хроническом воздействии трития.

4. Провести сравнительный анализ хронического воздействия природных фонообразующих радионуклидов трития и тория-232, имеющих различный тип распада.

# **1 Обзор литературы**

## **1.1 Биолюминесцентные системы и их использование для мониторинга токсичности окружающей среды**

### **1.1.1 Тестовые системы на основе морских светящихся бактерий**

Видимое свечение живых организмов (биолюминесценция) представляет собой увлекательный и интересный процесс, происходящий в природе; это явление встречается в основном в бактериях, грибах, рыbach, насекомых и кальмарах. Биолюминесценция возникает в результате хемилюминесцентной реакции, в которой химическая энергия частично преобразуется в энергию света, т.е. в «холодный свет».

В настоящее время известно около 800 видов светящихся живых организмов. Большинство светящихся организмов являются морскими, несколько видов обитают на суше. Среди светящихся организмов только бактерии излучают свет непрерывно. Они распространены по всему Мировому океану от тропических до полярных широт и от поверхностных слоев до глубин в несколько тысяч метров [12]. Светящиеся бактерии также колонизируют морских животных как сапрофиты, комменсальные кишечные симбионты и паразиты. Несколько видов светящихся бактерий живут в симбиозе с морскими рыбами и кальмарами [13].

Люминесцентные бактерии представляют собой уникальную тестовую систему. Свечение бактерий обычно доступно визуальному наблюдению при суммировании световых потоков от большого ( $\sim 10^6$ ) числа бактериальных клеток. При этом интенсивность люминесценции постоянна и не обладает никакой временной организацией, исключая, конечно, зависимость от фаз развития культуры [14].

Чувствительность светящихся бактерий к различным веществам зависит от многих факторов, и, прежде всего, от штамма и условий культивирования бактерий (состава питательной среды, pH среды, фазы роста бактерий и т.д.).

Светящиеся бактерии используют в биотестах в нескольких видах: клеточная суспензия, твердая среда, лиофилизированный препарат.

Бактериальная биолюминесценция известна с 1875 года, когда Пфлюгер связал присутствие бактерий в поверхностной слизи рыбы с люминесценцией [13]. Более ранние наблюдения биолюминесценции отмечены в 1700 и 1800-х годах; вероятно, они были связаны с присутствием светящихся бактерий, таких, как сапрофиты или паразиты, в различных продуктах животного происхождения, таких как мясо, рыба и яйца, а также в разлагавшихся телах морских и наземных животных и даже в человеческих ранах и трупах [15].

Функции биолюминесценции для каждого организма различны. Организмы могут использовать биолюминесценцию в качестве (1) защиты, (2) привлечения добычи, (3) внутривидового общения и (4) контриллюминации (биолюминесцентного освещения) [16]. Однако биологическая роль биолюминесценции для морских бактерий все еще не ясна.

### **1.1.2 Механизм биолюминесценции морских бактерий**

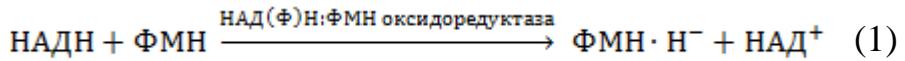
Виды светящихся бактерий различаются конкретными условиями выращивания (т.е. потребностью в питании и температуре роста) и кинетикой реакции люциферазы, участвующей в генерации света. Светящиеся бактерии являются факультативными анаэробами, которые способны к росту при ограниченном количестве молекулярного кислорода. Но, несмотря на физиологическое разнообразие различных видов светящихся бактерий, все люминесцентные микроорганизмы используют биохимические механизмы для производства света.

Бактериальная люцифераза – это фермент, который катализирует биолюминесцентную реакцию, являющуюся основой бактериальной биолюминесценции. Однако в непрерывном производстве света светящимися бактериями участвует не только бактериальная люцифераза, но и другие ферменты, регенерирующие субстраты для люциферазы, в частности,

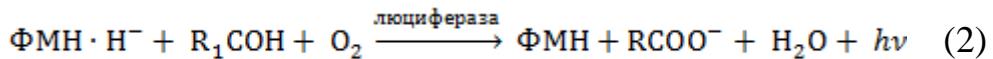
восстановленный флавин. Субстратами люциферазы являются восстановленный мононуклеотид флавина ФМН·Н<sup>-</sup>, молекулярный кислород и алифатический альдегид.

Высвобождаемая в ходе биолюминесцентной реакции энергия выделяется в виде излучения сине-зеленого света. Функцией бактериальной люциферазы является окисление субстрата (восстановленного флавина) с акцептированием него протонов и последующим переносом к акцептору.

ФМН восстанавливается до ФМН·Н<sup>-</sup>, в ходе реакции, катализируемой ферментом НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазой, при этом формально процесс выглядит как присоединение протона и двух электронов (уравнение 1):



Затем бактериальная люцифераза катализирует окисление восстановленного флавинмононуклеотида (ФМН·Н<sup>-</sup>) с образованием окисленного ФМН и жирной кислоты (миристиновая) в присутствии алифатического альдегида (тетрадеканаль) и молекулярного кислорода О<sub>2</sub> с излучением света (уравнение 2). Спектральный диапазон биолюминесценции составляет от 420 нм до 660 нм [17].



Общая схема преобразования реагентов в реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, была предложена достаточно давно [18], и последующие исследования подтвердили ее правильность. Согласно этой схеме, реакция проходит через образование трех промежуточных комплексов с ферментом (интермедиатов): 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 [19]. Образование интермедиата III пока не нашло экспериментального доказательства, но признается неизбежной

стадией реакции [20]. Методами ЯМР было также показано, что основные химические перестройки в ходе реакции происходят на  $C(4a)$  атоме изоаллоказинового 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 изоаллоказинового фрагмента флавина, которая подвергается модификации; рибитилфосфатный «хвост» обозначен RibP.

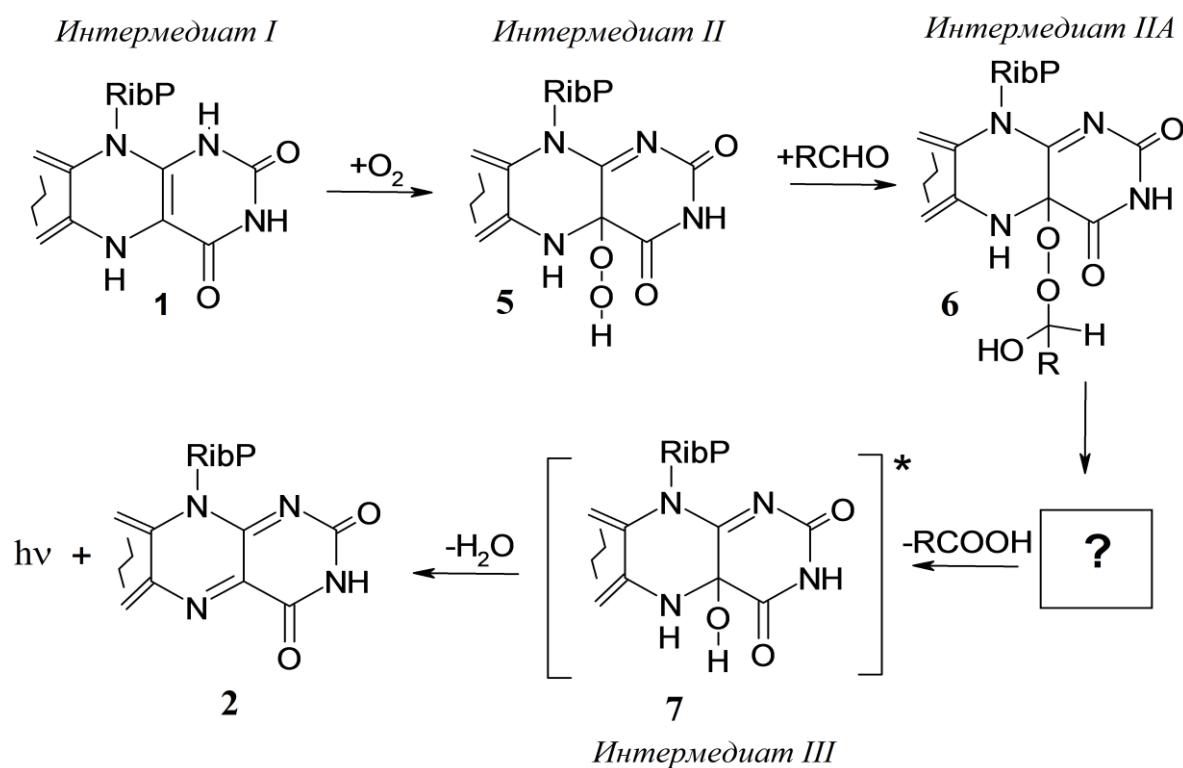


Рисунок 1 – Последовательность химических преобразований восстановленного флавина в активном центре бактериальной люциферазы

Относительно механизма преобразования в возбужденный эмиттер интермедиата IIА ( $4a$ -гидропероксидацеталь-5-гидрофлавинмононуклеотид) (6, рис. 1), связанного с люциферазой, до сих пор не существует единого мнения. Этот этап, возможно, включает в себя несколько стадий (обозначен на рисунке 1 вопросительным знаком). Проблема идентификации структуры излучающего

хромофора (эмиттера) также до сих пор обсуждается. Большинством исследователей принято, что эмиттером бактериальной биолюминесценции является связанный с люциферазой 4 $\alpha$ -гидрокси-5-гидрофлавинмононуклеотид (7, рис. 1). Спектр фотолюминесценции этого соединения (в связанном состоянии) близок спектру биолюминесцентной реакции.

В работах [21, 22] перечислены три основные стадии хемилюминесцентных и биолюминесцентных реакций бактерий:

1. Образование интермедиатов I, II, IIА. Энергетический интервал возможных возбужденных состояний интермедиатов бактериальной биолюминесценции – приблизительно 260 – 390 кДж·моль<sup>-1</sup> (21700 – 32700 см<sup>-1</sup>).

2. Элементарный акт возбуждения, в котором интермедиат IIА превращается в эмиттер P\*.

3. Стадия испускания кванта света P\* → P + hν.

Спектр бактериальной биолюминесценции представляет собой почти симметричное гауссовское распределение по шкале частот с максимумом, соответствующим длине волны около 490 нм. Положение спектра бактериальной биолюминесценции не зависит от кислотности или температуры реакционной смеси. Квантовый выход биолюминесценции данной реакции в оптимальных условиях составляет от 0,1 до 0,16 в зависимости от типа люциферазы и альдегида [23]. В соответствии с результатами ЯМР-исследований [19], восстановленный флавин (1, рис. 1.1.2) связывается с люциферазой в виде аниона ФМН·Н<sup>-</sup>. Спектры поглощения интермедиатов I, II, IIА мало отличаются друг от друга и характеризуются присущим всем гидрофлавинам максимумом в области 380 нм [23, 24]. Среди этих интермедиатов заметной флуоресценцией (с максимумом около 490 нм) обладает только последний – связанный с люциферазой гидроксифлавин (7, рис. 1).

Логично предположить, что варьирование содержания пероксидных соединений в окружающей среде должно изменять скорости образования

пероксидных интермедиатов и, следовательно, скорости биолюминесцентной реакции

### **1.1.3 Использование биолюминесцентных систем для мониторинга токсичности окружающей среды**

Повышенный интерес к проблеме контроля воздействия токсичных веществ на водную экосистему и человека привело к развитию биоиндикаторов на основе чувствительных организмов для мониторинга загрязнения окружающей среды. Микроорганизмы являются простейшими и основополагающими компонентами водных экосистем, а их физиологические показатели служат индикаторами состояния биосфера в целом. Следовательно, микроорганизмы могут быть использованы для мониторинга токсичности окружающей среды, в том числе радиотоксичности [25].

Биотесты на основе светящихся морских бактерий являются подходящими кандидатами для мониторинга токсичности окружающей среды. Эту систему можно использовать для изучения как хронических, так и острых радиоактивных воздействий. Благодаря высокой чувствительности биолюминесценции светящихся морских бактерий к присутствию токсичных соединений, они используются в качестве биотеста на токсичность уже более пятидесяти лет. Тестируемым параметром в этих исследованиях является интенсивность свечения, которая рассматривается в качестве физиологической функции бактерий; ее можно легко измерить инструментально простыми физическими приборами. Высокая скорость регистрации биолюминесценции (1-3 мин) и простота тестируемого организма открывают возможность одновременного проведения большого количества измерений, что обеспечивает достоверность статистической обработки результатов [26, 27]. Эти преимущества очень важны для биологических анализов, которые, как правило, характеризуются более низкой воспроизводимостью, чем химические или радиометрические методы.

С другой стороны, морские бактерии можно рассматривать как простую модель живых объектов для изучения механизмов воздействия радионуклидов – от первичных физико-химических процессов в условиях ионизации в водных растворах до молекулярной трансформации и клеточных мембранных процессов. Закономерности воздействия ионизирующего излучения на одноклеточные микроорганизмы могут применяться для анализа радиоактивного воздействия на высшие организмы [25]. Следовательно, светящиеся морские бактерии являются хорошими кандидатами для мониторинга радиационной токсичности. Впервые данные по их использованию для изучения токсичности растворов радионуклида америция-241 были опубликованы в 2007 году [28].

Кроме клеточных биотестов, основанных на биолюминесцентных бактериях, в последние годы используются биолюминесцентные ферментативные биотесты. Наибольшее распространение получила биолюминесцентная система двух сопряженных реакций, катализируемых бактериальными ферментами НАДН:ФМН-оксидоредуктаза и люцифераза. В 1990 году было предложено использовать эту биолюминесцентную систему двух сопряженных реакций для мониторинга токсичности окружающей среды. Принцип люциферазных биотестов заключался в обнаружении токсических свойств тестируемых веществ и смесей по их влиянию на биолюминесцентные ферментативные реакции. В основе биолюминесцентных биотестов чаще всего лежит ингибирование люциферазы компонентами анализируемых смесей [29]. В настоящее время бактериальная биферментная система НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза активно используется в биолюминесцентных анализах в экологии, сельском хозяйстве и других областях [27]. Использование ферментов светящихся бактерий в качестве тестируемых объектов привело к значительному разнообразию характеристик биолюминесцентных тестов.

## **1.2 Радиоактивное излучение и его источники**

### **1.2.1 Типы источников ионизирующего излучения**

Ионизирующее излучение является одним из внешних факторов воздействия окружающей среды, которые сопровождают развитие жизни на планете Земля, начиная с ее создания. Ионизирующее излучение (ИИ) – это потоки фотонов, элементарных частиц или продуктов ядерного деления, которые могут ионизировать вещество.

По физической природе различают два типа ИИ: корпускулярное, представляющее собой частицы с ненулевой массой покоя – это альфа-, бета- и нейтронное излучение, – и электромагнитное, к которому относится гаммаизлучение, рентгеновское излучение и синхротронное (тормозное) излучение. Эти излучения могут быть обнаружены только по их взаимодействию с веществом и его изменению.

Альфа-распад – это тип радиоактивного распада, при котором атомное ядро испускает альфа-частицу (ядро гелия), тем самым превращаясь или распадаясь в новое атомное ядро. В природе альфа-частицы образуются в результате распада атомов тяжелых элементов, таких как уран, торий и радий, называющихся родительским ядром. Альфа-частицы обладают двойным положительным зарядом, длина пробега в воздухе не более 5 сантиметров; они как правило, полностью задерживаются листом бумаги, при этом теряют всю свою энергию. Альфа-излучение характеризуется высокой линейной плотностью ионизации (ЛПИ) и линейной передачей энергии (ЛПЭ). ЛПИ – это число пар ионов, образующихся на единице длины пробега частиц (пар ионов/мкм). ЛПЭ - количество энергии, переданной веществу заряженной частицей на единице длины ее пробега (КэВ/мкм). Ионизирующее излучение, у которого ЛПЭ менее 10 КэВ/мкм, относится к редкоионизирующем, а более 10 КэВ/мкм – к плотноионизирующем излучениям.

Бета-частицы представляют собой высокоэнергетические высокоскоростные электроны или позитроны, испускаемые некоторыми

первичными радиоактивными ядрами. Традиционно существует две формы бета-распада: распад с участием электронов ( $\beta^-$  распад), который сопровождается излучением антинейтрино, и распад с участием позитронов ( $\beta^+$  распад) с излучением нейтрино. Кроме  $\beta^-$  и  $\beta^+$  распадов, к бета распадам относят также электронный захват (К-захват), в котором ядро захватывает электрон из своей электронной оболочки и испускает нейтрино.

Нейтронное излучение представляет собой незаряженную частицу, которая испускается во время ядерной детонации почти исключительно в результате самих процессов деления и синтеза. Нейтрон является незаряженной элементарной частицей с массой протона. Энергия нейтрона зависит от его скорости. В зависимости от энергии нейтроны подразделяются на: тепловые (с средней энергией 0,025 эВ), резонансные (до 0,05 эВ), промежуточные (от 0,05 кэВ до 0,5 МэВ), быстрые (0,5–20 МэВ) и сверхбыстрые (с энергией выше 20 МэВ). Проникающая способность нейтронного излучения сравнима с гаммаизлучением.

Гамма-излучение, в отличие от альфы- и бета-частиц, не представляет собой поток каких-либо частиц, а является электромагнитным излучением, испускаемым нестабильным ядром. Гамма-излучение сопровождает альфа- и бета-распады, а также возникает при ядерных реакциях, при торможении заряженных частиц, их распаде. Гамма-излучение характеризуется чрезвычайно малой длиной волны ( $\lambda = 10^{-3}$ – $10^{-6}$  нм) и слабым ионизирующим эффектом, но обладает высокой проникающей способностью.

Рентгеновское излучение (Х-лучи) – это вид электромагнитного излучения, обладающий высокой проникающей способностью. Х-лучи похожи на гамма-излучения, с основным отличием в том, что они генерируются электронной оболочкой атома. Излучение связано с переходом электронов из более высокого энергетического уровня на более низкий, что приводит к высвобождению избыточной энергии. Длинноволновая часть спектра рентгеновского излучения перекрывается коротким ультрафиолетовым излучением, коротковолновая часть – длинноволновым гамма-излучением.

Рентгеновское излучение возникает при работе рентгеновских трубок, а также сложных электронных установок. X-лучи характеризуются большей длиной волны ( $10^{-3}$ – $10$  нм) и более низкой энергией (от 1237 кэВ до 0,12 эВ), чем гамма-излучение. Однако, несмотря на различные происхождения гамма и рентгеновского излучений, их природа одинакова, поэтому их называют фотонным излучением.

Еще одним из видов электромагнитного излучения является синхротронное (магнитотормозное) излучение. Это электромагнитное излучение, возникающее при торможении электронов и других заряженных частиц в веществе. Синхротронное излучение характеризуется непрерывным спектром излучения с длинами волн от  $10^{-3}$  до 100 нм.

### **1.2.2 Взаимодействие ионизирующего излучения с веществом**

Как известно, при взаимодействии ИИ с веществом, ему передается энергия излучения, которая равна разности между суммарной энергией всех заряженных и незаряженных частиц, входящих в данный объем вещества, и суммарной энергией всех частиц, выходящих из этого объема; следствием прохождения ИИ является изменение структуры вещества. Плюс изменяется энергия, которая связана с массой покоя частиц при ядерных превращениях, происходящей в объеме. Кроме того, взаимодействие ИИ с веществом зависит не только от энергии, но и от плотности потока, вида излучения и физических и химических свойств самого вещества.

Различают два типа взаимодействия ИИ с веществом:

- Упругое рассеяние частиц – это процесс столкновения частиц, при котором сохраняется полная кинетическая энергия системы.
- Неупругое рассеяние частиц – в этом процессе в отличие упругого рассеяния, кинетическая энергия частицы не сохраняется, а уменьшается или увеличивается.

При взаимодействии заряженных частиц с веществом уменьшается его энергия. Тяжелые заряженные частицы взаимодействуют с веществом главным образом посредством кулоновских сил между их положительным зарядом и отрицательным зарядом электронов с атомных орбиталей. Однако внутренняя энергия атома квантуется, поэтому только определенное количество энергии им может быть передано. Обычно заряженные частицы передают свою энергию за счет возбуждения и ионизации. Любая заряженная частица может иметь электронное, ядерное или гравитационное взаимодействия с частицами вещества, через которое она проходит. Однако гравитационное взаимодействие слишком мало, поэтому обычно игнорируется.

По сравнению с альфа-излучением, ионизирующее действие бета-частиц на единицу длины пройденного пути в веществе, т.е. удельная ионизация, меньше, а их проникающая способность больше (максимальная энергия 2МэВ) [30]. Главной причиной такого явления является малая масса электронов по сравнению с тяжелыми заряженными частицами. Из-за их низкой массы, электроны движутся так быстро, что их скорость может стать близкой к скорости света. Всякий раз, при прохождении через материалы отдельные электроны в пучке могут взаимодействовать с атомами или молекулами-мишеньями различными способами, такими как ионизация, электрон-позитронная аннигиляция и тормозное излучение.

Бета-частица, проходя через вещество, расходует свою энергию на ионизацию и возбуждение атомов и молекул. При прохождении вблизи ядер атомов бета-частицы замедляются, теряют часть своей энергии, которая выделяется в виде гамма-квантов электромагнитного излучения (тормозное излучение) [31].

При прохождении позитронов через вещество они «термолизуются», т.е. теряют свою кинетическую энергию и затем аннигилируют в веществе – позитрон и электрон среды дают два гамма-кванта с энергией, равной массе покоя каждой частицы [32].

Взаимодействие гамма-квантов с веществом значительно отличается от взаимодействия альфа- и бета- частиц. Если заряженные частицы передают свою энергию электронам атомов при многократных процессах соударения, то гамма-кванты отдают всю или же большую часть своей энергии при однократном взаимодействии. Это взаимодействие мало, поэтому гамма-кванты обладают большей проникающей способностью, чем заряженные частицы.

Существует три ключевых механизма взаимодействия гамма-квантов с веществом: фотоэлектрический эффект (ФЭ), комптоновское рассеяние и образование электрон-позитронных пар. Фотоэффект – это взаимодействие гамма-кванта с атомом, при котором гамма-квант поглощается, т.е. исчезает, а из атома вырывается электрон. ФЭ происходит только тогда, когда энергия гамма-кванта больше энергии связи электрона в оболочке атома [32]. Комптон эффект можно рассматривать как результат упругого столкновения двух частиц – фотона и электрона, при котором фотон передает электрону часть своей энергии, из-за чего уменьшается его частота и увеличивается длина волны. Энергия, передаваемая электрону отдачи, может варьироваться от нуля до большой доли энергии падающего гамма-излучения, т.к. возможны любые углы рассеяния. Взаимодействие фотонного излучения с веществом, при котором энергия фотона в поле ядра переходит в энергию массы покоя и кинетическую энергию электрона и позитрона, называется образованием электрон-позитронных пар. Происходит этот процесс только с фотонами с энергией, которая должна быть выше пороговой энергии, т.е. превышающими 1,02 МэВ, и эквивалентной массе покоя двух электронов.

Нейтроны – это нейтральные частицы; они движутся по прямым линиям, отклоняясь от своего пути только тогда, когда они фактически сталкиваются с ядром. В результате соударения нейтроны рассеиваются в новом направлении или поглощаются. Ни электроны, окружающие ядро, ни электрическое поле, вызванное положительно заряженным ядром, не влияют на полет нейтрона, т.е. нейтроны сталкиваются с ядрами, а не с атомами. Причиной столкновения нейтрона с ядром является его электрическая нейтральность [32]. Явления,

происходящие при взаимодействии нейтронов с ядрами, зависят от кинетической энергии нейтронов. Поэтому обычно нейтроны делят на отдельные энергетические группы: тепловые, медленные и быстрые. Механизм взаимодействия нейтронов с веществом связан с такими этапами, как замедление быстрых нейтронов на легких ядрах, диффузия тепловых нейтронов и захват нейтронов ядрами атомов, которые имеют высокие сечения захвата тепловых нейтронов [31].

### **1.2.3 Биологические эффекты ионизирующего излучения**

Прямое воздействие ИИ на живые организмы может непосредственно нарушать атомные структуры, вызывая химические и биологические изменения. Кроме того, ИИ может воздействовать косвенно через радиолиз воды, в результате которого образуются химически активные вещества, которые могут влиять на организм. Вместе прямые и косвенные воздействия радиации инициируют серию биохимических и молекулярных сигнальных событий, которые могут как активировать, так и повреждать организм, а также завершаться постоянными физиологическими изменениями или гибелью клеток.

В дополнение к прямым клеточным воздействиям, радиационное воздействие может также повредить клетки за счет образования АФК. Вода является жизненно важным компонентом клеток всех живых организмов. Поглощение излучений водой приводит к возбуждению, ионизации, образованию свободных радикалов, которые могут атаковать другие молекулы [5]. Клетка реагирует на повышенные концентрации свободных радикалов, генерируя природные антиоксиданты, которые могут минимизировать или устраниć повреждение клеточных структур, вызванные свободными радикалами. При повышенном уровне ИИ клетка усиливает экспрессию антиоксидантных ферментов. Однако, при высоком уровне АФК клеточные защитные механизмы нарушаются, клетка повреждается. При больших

концентрациях радикалов повреждения приводят к канцерогенезу, некрозу или апоптозу [33].

Чтобы защитить целостность генома, клетки обладают сложным механизмом обнаружения и восстановления повреждений ДНК – реакцией повреждения ДНК. При воздействии ИИ на ДНК, она резко скручивается, а между разными нитями ДНК образуются водородные мостики, нарушается спиральное строение молекулы. Особенно характерными являются разрушения двойных спиралей ДНК, скручивание или внутримолекулярная полимеризация, раскрытие двойных спиралей, разветвление и т.п. Молекулярный вес ДНК, как и радиус спиралей ДНК, варьируется в зависимости от дозы облучения и мощности дозы [34].

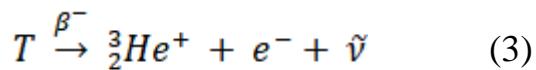
Клеточный уровень воздействия включает в себя все нарушения и процессы, вызванные изменениями функциональных свойств облученных клеточных структур. Повреждение внутриклеточных структур приводит к изменению и нарушению обменных процессов в клетках, что приводит к появлению новых нарушений после окончания облучения. Примерами могут быть: нарушения структуры нуклеотидов и их последовательностей в ДНК и РНК приводят к дефициту продуктов матричного синтеза, необходимых для нормального функционирования, а также к образованию продуктов, необычных для клетки и чуждых ей. Этот ход событий называется «биологическим усилением». При сочетании таких процессов может возникнуть серьезное нарушение жизнедеятельности и даже гибель клеток. Однако полученное повреждение может быть исправлено с восстановлением нормального функционирования клетки. Чем выше доза облучения, тем больше первичных повреждений и тем меньше вероятность их полного восстановления. Повреждение и гибель клеток лежат в основе развития повреждений ткани, органов и организма в целом при всех видах радиационного воздействия.

В результате облучения могут наблюдаться следующие клеточные реакции: угнетение деления, различные типы хромосомных аберраций и различные летальные исходы.

#### 1.2.4 Радиоактивные элементы торий и тритий в окружающей среде

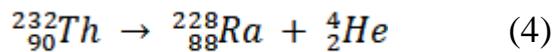
Радионуклиды, как и космические излучения, существовали еще задолго до возникновения жизни на Земле, воздействуя на химические и геологические и впоследствии на биологические процессы. Тритий является бета-излучающим радиоизотопом водорода с периодом полураспада к 12,32 года. Считается, что тритий – один из наименее опасных радиоизотопов. Накопление трития в окружающей среде происходит естественным и искусственным путем. Будучи одним из самых распространенных радиоактивных изотопов, тритий непрерывно генерируется в верхних слоях атмосферы Земли в результате космического облучения; скорость его образования составляет  $1200 \text{ атомов}\cdot\text{с}^{-1}\text{м}^{-2}$  [35]. Тритий встречается в основном в виде тритиевой воды (HTO), а также входит в состав любых органических и неорганических соединений, содержащих водород (так называемый органический связанный тритий). В настоящее время содержание трития в Мировом океане оценивалось как один атом на  $10^{18}$  атомов водорода. Однако после ядерных испытаний в 1950-х годах оно возросло. Тритий является побочным продуктом большого количества радиохимических процессов в атомной промышленности. В настоящее время концентрация HTO в Мировом океане варьируется; ее локальный подъем отмечен в районах атомных электростанций и после ядерных испытаний и инцидентов.

В процессе распада тритий ( $T$ ) превращается в  ${}^3\text{He}$  с испусканием электрона и антинейтрино:



Торий ( $^{232}\text{Th}$ ) представляет собой естественный альфа-излучающий радионуклид.  $^{232}\text{Th}$  испускает  $\alpha$ - (90%),  $\beta$ - (1%) и  $\gamma$ - (9%) лучи [36]. В природе Th встречается в виде мягкого серебристо-белого металла, который присутствует практически во всех породах, в почве, воде, растениях и животных.

Торий имеет несколько изотопов как природных, так и искусственных, все они являются радиоактивными. Природный торий содержит 2 изотопа: торий-232 (наиболее распространенная форма тория, долгоживущий материнский  $\alpha$ -источник с периодом полураспада  $1,4 \cdot 10^{10}$  лет, который является родоначальником радиоактивного семейства тория) и торий-228, находящийся в равновесии с торием-232 и являющийся, альфа-излучателем с периодом полураспада 1,91 года [37]. Однако в соответствии с периодами полураспада природных изотопов тория количество последнего (тория-228) незначительно.  $^{232}\text{Th}$  распадается за счет альфа-излучения с сопутствующим гамма-излучением и образует бета-радиоактивный изотоп радия-228:



$^{232}\text{Th}$  образуется тремя путями: при бета-распаде нуклида  $^{232}\text{Ac}$  с испусканием электрона и антинейтрино; при К-захвате, осуществляемом  $^{232}\text{Ra}$  с образованием антинейтрино; и при альфа-распаде радионуклида  $^{236}\text{U}$ .

$^{232}\text{Th}$  является не только токсичным радионуклидом, а также перспективным энергетическим материалом; он является ядерным топливным сырьем, которое при поглощении нейтронов превращается в уран-233, который, в свою очередь, является основой уран-ториевого топливного цикла.

## **1.3 Роль активных форм кислорода в биологических процессах**

### **1.3.1 Радиолиз воды**

При действии радиоактивного ионизирующего излучения на живой организм наиболее существенен процесс радиолиза воды, составляющей основную массу (до 90 %) вещества в клетках. Под термином «радиолиз воды» понимают разложение молекул воды при действии ионизирующей радиации с образованием ионов и свободных радикалов. Подсчитано, что основная часть (до 90 %) косвенного действия облучения на живые клетки обуславливается взаимодействием макромолекул с продуктами радиолиза воды. В присутствии растворенного кислорода образуются и другие продукты радиолиза, обладающие окислительными свойствами – активные формы кислорода (АФК). АФК обладают высокой реакционной способностью и легко вступают в химические реакции с органическими молекулами для приобретения недостающего электрона.

### **1.3.2 Характеристика активных форм 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 АФК.

Под термином «активные формы кислорода» понимают совокупность взаимопревращающихся реакционноспособных форм кислорода [38], у которых периоды полураспада находятся в диапазоне наносекунд до часов [39]. Эти формы могут возникать во многих химических и биологических процессах в виде молекул, ионов и свободных радикалов. К группе АФК относятся супероксид анион-радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ), перекись водорода ( $H_2O_2$ ), гидроксильный радикал ( $\cdot OH$ ), синглетный кислород ( ${}^1O_2$ ), гипохлорит ( $HOCl$ ),

гидропероксильный радикал ( $\text{HOO}\cdot$ ), а также окись азота (NO) и пероксинитрит ( $\text{ONOO}^-$ ), обладающие высокой окислительной активностью.

Традиционно АФК рассматриваются как инициаторы окислительного стресса и повреждений, что приводит к износу тканей и органов, старению и болезням [40, 41, 7, 42]. АФК постоянно генерируются, изменяются и потребляются во всех живых организмах в результате их аэробного функционирования. Существуют данные о положительном влиянии АФК на физиологию организмов. Показано, что в низких и умеренных дозах АФК способствуют регуляции жизненно важных физиологических функций [43, 44, 45]; они ответственны за пролиферацию, миграцию, дифференцировку и метаболизм [46, 47]. 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 вредных химических веществ. В биологических процессах АФК являются естественными побочными продуктами метаболических окислительных процессов и играют важную роль в передаче клеточного сигнала и гомеостаза [39, 48].

Существует два типа радикалов, которые формируются в организме: (1) природные радикалы, которые образуются в живых клетках, и (2) чужеродные радикалы, 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 [49]. Из первичного радикала – супероксида, а также в результате других реакций в организме могут образовываться очень активные

молекулярные соединения: перекись водорода, гипохлорит и гидроперекиси липидов. Под действием ионов металлов переменной валентности, в первую очередь – ионов  $\text{Fe}^{2+}$ , из этих веществ образуются вторичные свободные радикалы, такие как радикал гидроксида и радикалы липидов, которые оказывают разрушительное действие на клеточные структуры [49]. Вторичные свободные радикалы не выполняют физиологически полезных функций, оказывают разрушительное действие на клеточные структуры. Они акцептируют электроны от «полноценных» молекул, благодаря чему «пострадавшая» молекула сама становится свободным радикалом – третичным, но в основном неактивным, не способными к разрушающему действию.

Для определения содержания АФК использовался хемилюминесцентный люминольный метод, который широко используется для определения содержания пероксидов. Преимуществом метода хемилюминесценции является то, что он эффективен в изучении реакций с участием свободных радикалов. 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 самые активные радикалы, обладающие в изучаемой системе ничтожно малой концентрацией. Регистрация хемилюминесценции занимает не более 4-5 мин и отвечает всем требованиям, предъявляемым к экспресс-анализу.

### **1.3.3 Активные формы кислорода – как сигнальные молекулы**

АФК являются продуктами естественного метаболизма организмов. Долгое время АФК рассматривались как вредные для клеток живых организмов, однако в последнее время ряд доказательств свидетельствует об обратном. АФК являются очень важными участниками в передаче сигналов и регуляции клеток. При этом регистрировали зависимость эффективности

передачи сигналов от концентрации АФК [50]. На сегодняшний день имеется признание того, что АФК – это внутриклеточные мессенджеры.

Считается, что АФК играют важную роль в увеличении числа физиологических и патологических процессов. АФК принимают участие в передаче внутриклеточных сигналов от различных факторов роста, способны изменять активность различных транскрипционных белков [34]. Установлено, что АФК играют две разные роли в организме: при высоких концентрациях токсичны, а при низких концентрациях ведут себя как сигнальные молекулы, могут быть полезными или необходимыми [51]. Процесс образования избыточных АФК называют окислительным стрессом. Окислительный стресс является фактором, влияющим на развитие большого количества заболеваний. Для борьбы с окислительным стрессом организмы активируют механизм внутренней защиты с использованием антиоксидантов. Антиоксиданты можно классифицировать как – ферментативные, неферментативные или низкомолекулярные [52].

Такие организмы, как бактерии, имеют множество механизмов адаптации к стрессу при различных воздействиях. Такие воздействия, как ультрафиолетовое излучение, ионизирующее излучение и химические токсиканты, также производят АФК в растворах, на что клетки или ткани могут активировать выработку свободных радикалов в качестве защитной реакции [52]. В этой работе показано, что после воздействия ИИ, в бактериях активируется производство АФК в качестве адаптивного ответа на окислительный стресс. В такой ситуации существует четкое пороговое значение для вредного воздействия ИИ [53].

Фактором, который может оказать существенное влияние на соотношение доза-эффект, является «эффект свидетеля». В этом эффекте, облученные клетки передают сигналы о повреждениях к необлученным клеткам в популяции, что приводит к возникновению биологических эффектов в клетках, которые не подвергались прямому радиационному воздействию. Наблюдения за тем, что облученные клетки или ткани могли оказывать вредное воздействие на

необлученные клетки или ткани, были продемонстрированы много лет назад и были названы абскопальными эффектами [53]. Есть доказательства того, что АФК могут действовать как межклеточные сигнальные молекулы в эффекте свидетеля; они инициируют и активируют отклики необлученных молекул при низкодозовом воздействии [34].

Таким образом, предполагается, что АФК могут функционировать как межклеточные мессенджеры и, таким образом регулировать процессы внутри клеток, не подвергшихся прямому облучению [34, 54, 55]. Причины, по которым АФК могут выполнять роль сигнальных молекул следующие: во-первых, они малы и могут распространяться на короткие расстояния; во-вторых, имеется несколько механизмов для их производства, некоторые из которых являются быстрыми и контролируемыми; и в-третьих, существует очень много способов (механизмов) их удаления.

## **2 Материалы и методы исследования**

### **2.1 Объекты исследований**

В качестве объекта исследования использовались интактные морские светящиеся бактерии *Photobacterium Phosphoreum* 1883 IBSO [56]. Штамм получен из коллекции светящихся бактерий ССОБСО-836 Института биофизики СО РАН, Красноярск, Россия. Препарат NaCl (analytical grade) применяли для получения 3% раствора для измерения бактериальной биолюминесценции.

Реагенты для измерения хемилюминесценции были следующими: люминол от Sigma-Aldrich, 3% раствор перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) (Тульского фармацевтического завода, Россия),  $K_3[Fe(CN)_6]$  (Химреактив, Россия).

В качестве источника радиоактивного облучения использовались бета-излучающий радионуклид тритий и альфа-излучающий радионуклид торий-232 ( $^{232}Th$ ). В качестве препарата трития использовали тритиевую воду (HTO). Препарат HTO предоставлен кафедрой радиохимии МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва; Препарат  $^{232}Th$  был предоставлен кафедрой химической технологии редких, рассеянных и радиоактивных элементов ТПУ, г. Томск. Характеристики препарата  $Th(NO_3)_4 \cdot 4H_2O$ : торий – 98,6%, сульфаты ( $SO_4^{2-}$ ) – 0,005%, хлориды ( $Cl^-$ ) – 0,002%, железо (Fe) – 0,005%, церий (Ce) – 0,05%, оксид фосфора ( $P_2O_5$ ) – 0,005% и Al, Ca, Mg – 0,05 %.

### **2.2. Регистрация биолюминесценции бактериальной системы**

#### **2.2.1 Исследование биолюминесценции в присутствии трития**

Бактериальные суспензии подвергали низкодозовому воздействию трития. Чтобы имитировать морскую среду для бактериальных клеток и сбалансировать осмотические процессы, использовали 3%-ный водный раствор NaCl. Кинетику свечения бактериальной биолюминесценции изучали в образцах бактерий без радионуклида и с радионуклидом.

Контрольные (нерадиоактивные) и радиоактивные бактериальные суспензии готовили следующим образом:

Радиоактивные образцы: 10 мкл бактериальной суспензии добавляли к 30 мкл радиоактивного раствора НТО в 3% растворе NaCl.

Контрольные образцы: 10 мкл нерадиоактивных (контрольных) суспензий добавляли 30 мкл 3% раствора NaCl.

Для исследования хронического низкодозового эффекта уровня бета-излучения на бактериальную биолюминесценцию, радиоактивные и контрольные образцы бактериальных суспензий выдерживали при +4 °C. Измерения биолюминесценции продолжались в течение 52 ч, пока интенсивность биолюминесценции контрольных образцов не снизилась до 20% от максимальной. Измерения биолюминесценции проводились по стандартной методике [55, 57]. Интенсивности биолюминесценции контрольных и радиоактивных образцов измеряли при комнатной температуре в 3-4 повторах для контрольного и радиоактивного образцов. Экспериментальная погрешность измерений биолюминесценции не превышала 1-2%.

### **2.2.2 Исследование биолюминесценции в присутствии тория-232**

Регистрировали биолюминесценцию бактериальной суспензии в присутствии тория. В качестве источника тория использовалась  $^{232}\text{Th}$ .

Контрольные образцы готовили следующим образом:

10 мкл бактериальной суспензии;

30 мкл 3% водного раствора NaCl.

Интенсивности биолюминесценции бактериальной суспензии в растворе радионуклида измеряли в смеси следующего состава:

10 мкл бактериальной суспензии;

30 мкл раствора  $^{232}\text{Th}$  в 1,5% растворе NaCl.

Все образцы бактериальной суспензии выдерживали при +4 °C. Измерения биолюминесценции продолжались в течение 72 ч. Измерения

биолюминесценции проводились по стандартной методике [56, 57]. Интенсивности биолюминесценции бактериальных образцов измеряли при комнатной температуре 3-4 повторах для контрольного и радиоактивного образцов. Экспериментальная погрешность измерений биолюминесценции не превышала 1-2%.

### **2.3 Определение содержания АФК в бактериальной супензии хемилюминесцентным люминольным методом**

Для исследования содержания АФК в экспериментальных растворах предварительно определяли зависимость интенсивность хемилюминесценции в зависимости от концентрации  $H_2O_2$ . Концентрация водно-щелочного раствора люминола составляла  $10^{-4}$  М. Реакцию хемилюминесценции инициировали  $10^{-3}$  М раствором  $K_3[Fe(CN)_6]$ .

Для оценки содержания АФК в растворах и бактериальных супензиях получена зависимость интенсивности хемилюминесценции от концентрации перекиси водорода, которая использована в качестве модельного представителя АФК. Полученная зависимость приведена на рис. 2. Результаты аппроксимированы линейной зависимостью с коэффициентом аппроксимации  $R^2=0,99$ .

Максимальная интенсивность хемилюминесценции определялась в 3% растворе  $NaCl$  и бактериальных образцах (контрольных и радиоактивных) после измерений биолюминесценции. Реакцию хемилюминесценции инициировали 75 мкл раствором  $K_3[Fe(CN)_6]$  с использованием инжектора. Экспериментальная погрешность измерений хемилюминесценции не превышала 10%. Интенсивность хемилюминесценции использовали для расчета содержания АФК в экспериментальных растворах по калибровочной зависимости.

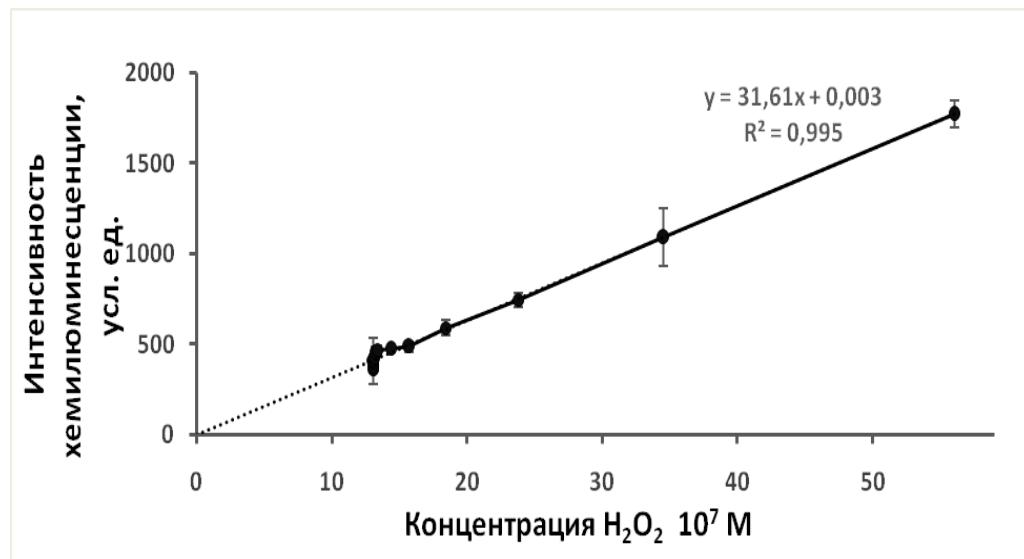


Рисунок 2 – Зависимость интенсивности хемилюминесценции люминола от концентрации пероксида водорода  $\text{H}_2\text{O}_2$  в 3% растворе  $\text{NaCl}$

Исследовали содержание АФК при воздействии тритиевой воды на бактериальную суспензию. Для определения содержания АФК в контрольной бактериальной суспензии в лунку микропланшета люминометра вносили:

30 мкл 3% водного раствора  $\text{NaCl}$ ;

10 мкл суспензии бактерий;

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

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

Состав реакционной смеси для определения содержания АФК в бактериальной суспензии при воздействии трития:

30 мкл НТО в 3% водном растворе  $\text{NaCl}$ ;

10 мкл суспензии бактерий;

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

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

Общий объем смеси – 250 мкл.

Для определения содержания АФК в бактериальной суспензии в присутствии тория-232 готовили состав следующей смеси:

30 мкл  $^{232}\text{Th}$  в 1,5% водном растворе  $\text{NaCl}$ ;

10 мкл бактериальной суспензии;

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

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

Общий объем смеси – 250 мкл.

Все измерения проводились при комнатной температуре. Каждое измерение проводили в 3-4 повторностях. Статистическая обработка результатов и построение графиков проводилась с использованием прикладных программ MS Office (Microsoft, США).

## **2.4 Статистическая обработка методом ранговой корреляции Спирмена**

Чтобы оценить корреляцию между интенсивностью биолюминесценции и содержанием АФК, была проанализирована статистическая зависимость между ранжированием двух переменных [58], рассчитаны ранговые коэффициенты корреляции Спирмена г. Применение этого метода было оправдано отсутствием нормального распределения интенсивности биолюминесценции и содержания АФК, а также ограниченным набором данных.

### 3 Воздействие радионуклидов на бактериальные клетки. Роль активных форм кислорода

#### 3.1 Влияние трития на биолюминесценцию морских бактерий

Интенсивность бактериальный биолюминесценции в присутствии трития показана на рис. 3. Из рисунка, видно, что НТО увеличивает интенсивность биолюминесценции примерно в три раза по сравнению с контрольным бактериальным образцом. Из рисунка видно, что в этих экспериментах не наблюдается ингибирования бактериальной биолюминесценции. Также наблюдали, что интенсивность биолюминесценции была одинаковой для трех концентраций трития в течение всего времени регистрации биолюминесценции, что подтверждает результаты, полученные ранее [11].

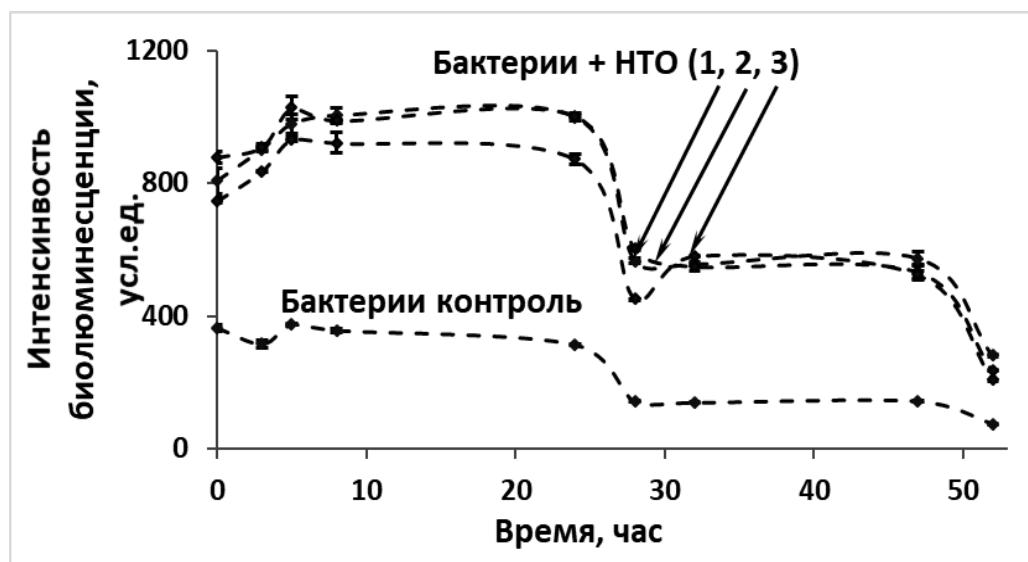


Рисунок 3 – Кинетика биолюминесценции бактерий в НТО для контрольных и радиоактивных образцов.

Удельные радиоактивности: 1 – 0,03 МБк/л; 2 – 4 МБк/л; 3 – 500 МБк/л

Активация бактериальной биолюминесценции тритием была продемонстрирована ранее во многих экспериментах. Более детальный анализ влияния трития на свечение морских бактерий был проведен в работах [25, 11]. Бифазная зависимость интенсивности биолюминесценции от времени (активация + ингибирование) была обнаружена в [3, 11]; и монофазная

зависимость (только активация) была продемонстрирована в [59, 60]. Наши результаты (рис. 3) продемонстрировали монофазную зависимость интенсивности биолюминесценции от времени воздействия трития. При этом максимальная доза, поглощенная бактериальной супензией, соответствует 0,08 Грей, что не превышает условного предела низких доз.

Результаты низкодозового воздействия трития на биолюминесцентные бактерии можно объяснить следующим образом: продукты распада трития способны воздействовать как «триггеры», запускающие метаболические процессы сначала в нескольких клетках, включая внутриклеточное производство АФК. Предполагается, что эти АФК выделяются в окружающую среду и служат специфическими сигнальными молекулами для других клеток бактерий - так называемый «эффект свидетеля» (“bystander effect”). Следовательно, АФК, которые постоянно вырабатываются бактериальными клетками в процессе их аэробного функционирования, являются подходящими кандидатами для межклеточных мессенджеров при низкодозовом воздействии трития.

### **3.2 Содержание АФК в бактериальной супензии в присутствии трития**

Изучено содержание АФК на морские светящиеся бактерии при различных временах воздействия НТО.

На рис. 4 представлено содержание АФК при различных временах воздействия НТО на бактериальную супензию.

Предварительно содержание АФК изучали в 3% водном растворе NaCl (в отсутствии бактериальных клеток), который обычно используют для имитации морской среды и баланса осмотических процессов для клеток морских бактерий. Незначительная концентрация АФК в 3% растворах NaCl без бактерий демонстрируется на рис. 4А.

На рис. 4 показано, что бактериальная супензия продуцирует АФК в нерадиоактивных растворах: содержание АФК в бактериальной супензии

(контроль) была примерно на порядок выше, чем в 3%-ном растворе NaCl. Этот результат подтверждает концепцию, что АФК постоянно вырабатываются бактериальными клетками в процессе их аэробного функционирования [47].

Содержание АФК в 3%-ном растворе NaCl, не содержащем бактерий, изучали в присутствии НТО. Из сравнения рис. 4А и 4Б видно, что добавление НТО к 3%-ному раствору NaCl не увеличивало заметным образом содержание АФК в растворе.

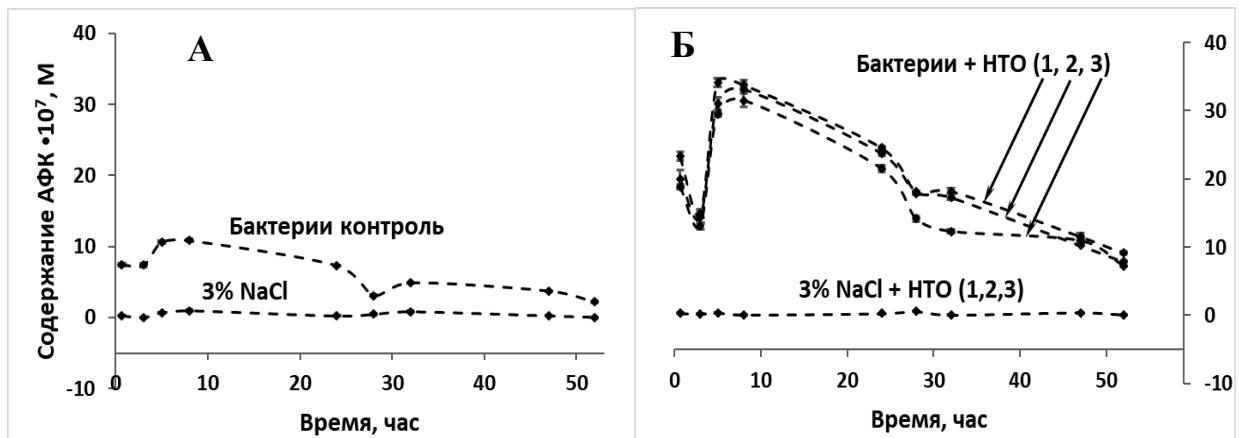


Рисунок 4 – Содержание АФК в бактериальных супензиях и безбактериальных средах (3%-ные растворы NaCl): А – в отсутствии НТО; Б – в присутствии НТО: 1 – 0,03 МБк/л, 2 – 4 МБк/л, 3 – 500 МБк/л.

Ранее сообщалось о низких концентрациях АФК в безбактериальной среде, содержащей НТО в диапазоне удельных радиоактивностей 0,002 – 250 МБк/л [3]. В этой статье сравнивалось содержание АФК в безбактериальных средах – в НТО и растворах  $^{241}\text{Am}(\text{NO}_3)_3$ , альфа-излучающего радионуклида с высокой удельной радиоактивностью. В отличие от трития, значительный избыток АФК и зависимость содержания АФК от концентрации  $^{241}\text{Am}$  были продемонстрированы [4, 25]. Различия могут быть объяснены различной энергией радиоактивного распада  $^{241}\text{Am}$  и трития (5637,8 и 18,6 кэВ [61]). Результаты, текущие и предыдущие, показывают, что низкоинтенсивное излучение трития (<500 МБк/л) не может обеспечить заметную выработку АФК в водных растворах без бактерий.

Добавление НТО к бактериальной суспензии значительно увеличивает количество АФК: рис. 4Б демонстрирует 3-кратное увеличение содержания АФК по сравнению с контролем (контроль приведен на рис. 4А). Следует отметить, что содержания АФК были одинаковыми для трех активности НТО с разницей примерно в четыре порядка между минимальной и максимальной, рис. 4Б. Как видно из рисунка, влияние трития на содержание АФК аналогично влиянию на биолюминесценцию бактерий (рис. 3).

### **3.3 Коэффициенты корреляции Спирмена между интенсивностью биолюминесценции и содержанием АФК в присутствии трития**

Рассчитывали ранговые коэффициенты корреляции Спирмена,  $r$ , между интенсивностью бактериальной биолюминесценции и содержанием АФК в нерадиоактивных (контрольных) и радиоактивных бактериальных суспензиях.

В табл. 1 представлены коэффициенты корреляции  $r$  между интенсивностью биолюминесценции и содержанием АФК в бактериальных суспензиях при воздействии НТО разной радиоактивности. Удельные радиоактивности НТО: 0,03 МБк/л, 4 МБк/л, 500 МБк/л.

Таблица 1 – Коэффициенты корреляции Спирмена между интенсивностью бактериальной биолюминесценции и содержанием АФК в нерадиоактивных (контрольных) и радиоактивных бактериальных суспензиях

<b>r</b>			
Контроль	0,03 МБк/л	4 МБк/л	500 МБк/л
0,891	0,830	0,903	0,897

Результаты показали высокие положительные корреляции ( $r>0,7$ ) между интенсивностью биолюминесценции и содержанием АФК во всех бактериальных средах – контрольных и радиоактивных. Подтверждена значимость коэффициентов корреляции ( $p<0,003$ ). Положительные значения

коэффициентов корреляции свидетельствует о прямой связи между интенсивностью бактериальной биолюминесценции и содержанием АФК в бактериях. Можно сделать вывод, что активация биолюминесценцной физиологической функции бактерий связана с продукцией АФК в бактериальной среде. Поскольку скорость продуцирования АФК в безбактериальной НТО низкая, рост продукции АФК в бактериальных суспензиях является результатом интенсификации метаболических кислородзависимых процессов в бактериальных клетках.

### **3.4. Особенности влияния трития на клетки светящихся бактерий при низкодозовом хроническом облучении**

Таким образом, особенности влияния трития на клетки светящихся бактерий при низкодозовом хроническом облучении заключаются в следующем:

- Низкое содержание АФК в безбактериальной водной среде;
- Активация бактериальной биолюминесценции и повышение содержания АФК;
- Корреляции между интенсивностью биолюминесценции и содержанием АФК;
- Отсутствие монотонных зависимостей интенсивности биолюминесценции и содержания АФК от концентрации трития.

Эти особенности могут объясняться следующим:

- Низкой энергией радиоактивного бета-распада трития;
- Триггерной функцией продуктов распада трития, запускающих метаболические кислородзависимые процессы (включая биолюминесценцию) сначала в малом количестве бактериальных клеток;
- Сигнальной ролью АФК как межклеточных мессенджеров и «эффектом свидетеля» в бактериальной суспензии;

- Фиксированным количеством бактериальных клеток, что обеспечивает верхний предел интенсивности биолюминесценции и содержания АФК.

Ранее на примере альфа-излучающего радионуклида Америция-231 [11] было показано, что содержание АФК в растворах этого радионуклида может превышать 2-15 раз фоновое значение в зависимости от концентрации радионуклида. Это отличие от бета-излучающего радионуклида трития является базовым, оно должно определять отличия механизмов биологического воздействия бета- и альфа- излучающих радионуклидов. Возникает вопрос, каким образом жизнедеятельность бактерий будет различаться в низкоконцентрированных растворах альфа- и бета- излучающих радионуклидов, в частности, как будут отличаться содержание АФК и интенсивность биолюминесценции в бактериальных суспензиях.

Для изучения воздействия альфа- излучающих радионуклидов на биолюминесценцию бактерий и содержание АФК в бактериальных суспензиях, а также сравнения этих характеристик с бета-излучающим радионуклидом тритием, выбран радиоизотоп тория-232.

### **3.5 Воздействие тория-232 на интенсивность биолюминесценции морских бактерий**

Исследовано воздействие тория-232 различных радиоактивностей на биолюминесценцию бактерий (рис. 5). Показано, что торий-232 увеличивает свечение бактериальной суспензии, аналогично НТО. Максимальное увеличение – приблизительно в 7 раз. Стадии ингибирования свечения не обнаружено. Второе сходство с эффектом трития – отсутствие монотонных зависимостей интенсивности биолюминесценции от концентрации тория (концентрации различались на 6 порядков). При этом максимальная доза, поглощенная бактериальной суспензией, соответствует 0,03 Грей, что не превышает условного предела низких доз.

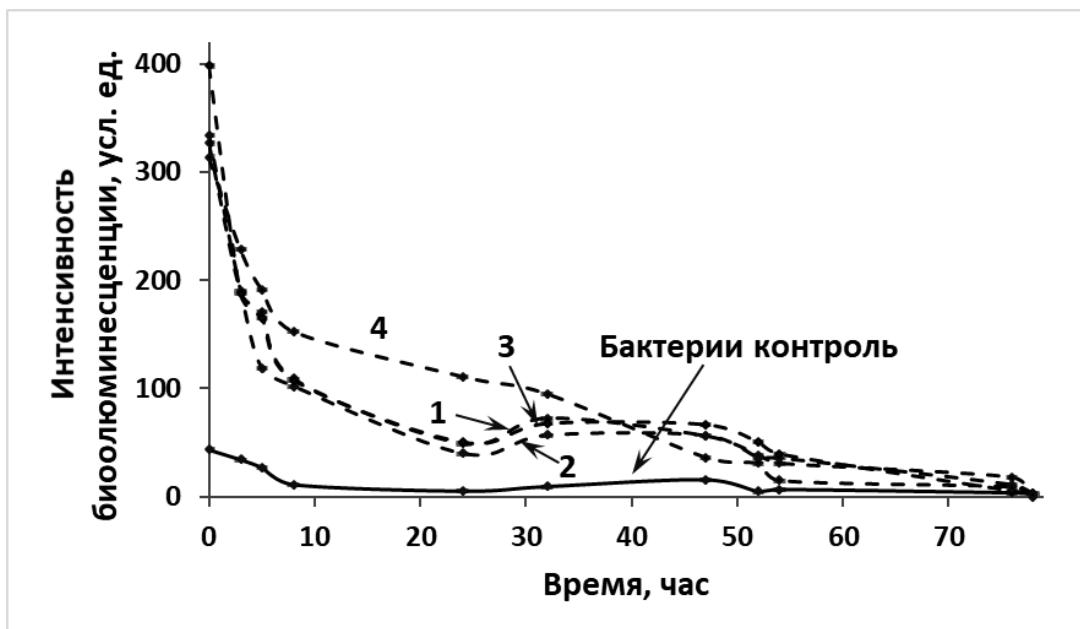


Рисунок 5 – Зависимость интенсивности свечения бактерий от времени воздействия  $^{232}\text{Th}$ . Концентрации тория: 1 –  $10^{-9} \text{ M}$ , 2 –  $10^{-5} \text{ M}$ , 3 –  $10^{-4} \text{ M}$ , 4 –  $10^{-3} \text{ M}$

Таким образом, не обнаружено монотонных зависимостей интенсивности биолюминесценции бактерий от концентраций тория-232 в условиях хронического низкодозового воздействия. Все эффекты тория-232 соответствовали гормезисной (т.е. нелинейной) модели зависимости доза-эффект. Обнаружена только одна стадия (активация) в кинетике биолюминесценции бактерий в присутствии тория-232. Воздействие тория-232 на люминесцентные бактерии схоже не только с эффектом трития, но и альфа-излучающего радионуклида америция-241, исследованного ранее [3].

Результаты воздействия тория-242 на люминесцентные бактерии получены впервые. Далее исследования в этом направлении должны быть продолжены.

### **3.6 Исследование содержание АФК в люминесцентных бактериях при воздействии тория-232**

На рис. 6 представлена зависимость содержание АФК от времени воздействия тория-232 различных концентраций.

Предварительно определяли содержание АФК в безбактериальной среде в водном растворе  $^{232}\text{Th}$  и 3% NaCl. Из рис. 6Б видно, что содержание АФК в водном растворе тория-232 значительно выше, чем в нерадиоактивном 3% водном растворе NaCl (Рис. 6А). Различия достигают 10-15 раз. Вероятно, это связано с высокой энергией и ионизирующей способностью альфа-излучения в отличие от бета-излучения. Известно, что альфа-излучение характеризуется высокой линейной плотностью ионизации (ЛПИ) и линейной передачей энергии (ЛПЭ) (см. главу 1.2.1). Величина ЛПЭ для альфа-частиц тория в биологических тканях составляет 100 КэВ/мкм, альфа-излучение тория относится к плотноионизирующему. Бета-излучение трития по радиobiологическим характеристикам относится к редкоионизирующему с ЛПИ примерно в 1000 раз меньше, чем у альфа-излучения. Средняя энергия бета-частиц низкая – 5,8 кэВ.

Аналогичные результаты, демонстрирующие значительное содержание АФК в растворе альфа-излучающего радионуклида, получены ранее для америция-241 [4, 11].

Из рис. 6 видно, что содержание АФК в контрольных и радиоактивных бактериальных образцах тория-232 близки между собой и ниже, чем в безбактериальной среде. Как и для биолюминесцентного отклика, не наблюдали зависимости содержания АФК в бактериальных суспензиях от концентрации тория. Вероятно, здесь мы сталкиваемся со свойством микроорганизмов нейтрализовывать избыточное количество АФК в окружающей среде путем использования их во внутриклеточных метаболических процессах. В частности, известно, что пероксидное соединение – пероксифлавин - является интермедиатом биолюминесцентного процесса (см.

Главу 1.1.2), и, следовательно, избыток пероксидов в окружающей среде может усилить их потребление в биолюминесцентном процессе, увеличивая скорость биолюминесцентной реакции. Это предположение требует дальнейшей экспериментальной проверки.

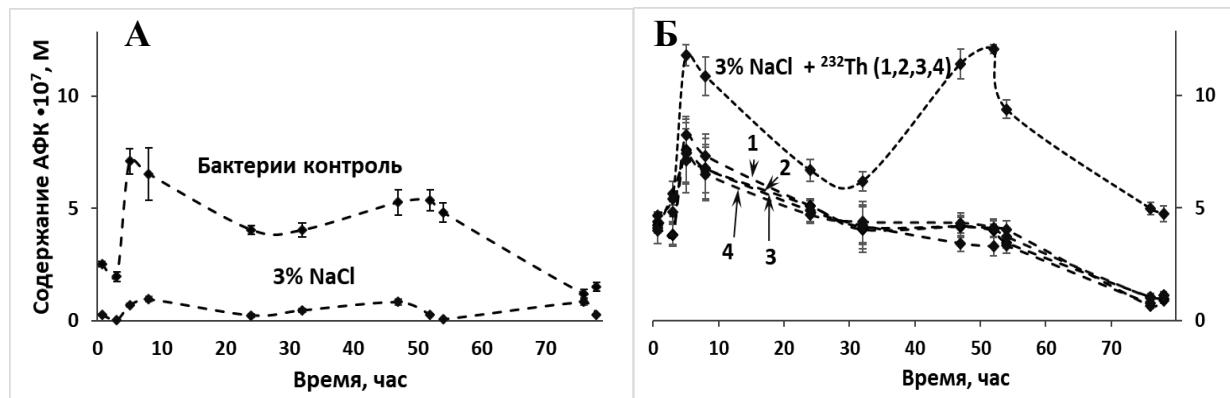


Рисунок 6 – Содержание АФК в бактериальных сусpenзиях и безбактериальных средах (3%-ные растворы NaCl): А – в отсутствии тория-232; Б – в присутствии тория-232: 1 –  $10^{-9} \text{ M}$ , 2 –  $10^{-5} \text{ M}$ , 3 –  $10^{-4} \text{ M}$ , 4 –  $10^{-3} \text{ M}$

Таким образом, мы наблюдали отличия в содержании и потреблении АФК люминесцентными бактериями для радионуклидов тория-232 и трития. Сравнительный анализ эффектов трития и тория-232 на биолюминесценцию бактерий и содержание АФК в водных средах (бактериальных и безбактериальных) приведен в следующей главе.

### 3.7 Сравнительный анализ воздействия радионуклидов трития и тория-232 на люминесцентные бактерии

Особенности влияния тория-232, в отличие от трития, на клетки светящихся бактерий при низкодозовом хроническом облучении проявляются в следующем:

Сходства с тритием:

- Активация бактериальной биолюминесценции;

- Отсутствие монотонной зависимости интенсивности биолюминесценции и содержания АФК от концентрации тория.

Отличия от трития:

- Повышение содержания АФК в безбактериальной водной среде;
- Понижение содержания АФК в бактериальной суспензии (по сравнению с водной безбактериальной средой) до величины, характерной для нерадиоактивных сред.

## **ВЫВОДЫ**

1. Выявлены особенности влияния трития на светящиеся бактерии при низкодозовом (<0,08 Грей) хроническом облучении: (а) активация бактериальной биолюминесценции и повышение содержания АФК; (б) корреляции между интенсивностью биолюминесценции и содержанием АФК; (в) отсутствие монотонных зависимостей интенсивности биолюминесценции и содержания АФК от концентрации трития.

2. Особенности воздействия трития связаны с: (а) низкой энергией радиоактивного бета-распада; (б) триггерной функцией продуктов распада трития; (в) сигнальной ролью АФК как межклеточных мессенджеров и «эффектом свидетеля» в бактериальной суспензии; (г) фиксированным количеством бактериальных клеток, обеспечивающим верхний предел интенсивности биолюминесценции и содержания АФК.

3. Низкодозовое (<0,03 Грей) влияние тория-232 на бактериальную биолюминесценцию сходно с влиянием трития: наблюдается активация биолюминесценции и отсутствие монотонной зависимости интенсивности биолюминесценции от концентрации тория.

4. В отличие от тритий-содержащей среды, в растворах альфа-излучающего радионуклида тория-232, бактерии уменьшают избыточное содержание АФК до величины, характерной для нерадиоактивных сред.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Таким образом, несмотря на низкую энергию распада трития, его влияние на живые организмы в водной среде может быть значительным. Механизм низкодозового воздействия трития на водную биоту вероятно связан с вторичными процессами, то есть производством избыточного количества АФК микроорганизмами вследствие роста скоростей внутриклеточных метаболических процессов. Повышенное содержание АФК может оказывать как положительное, так и отрицательное влияние на обитателей водной среды.

Возможность повышения содержания АФК следует всегда учитывать в условиях загрязнения трития в Мировом океане, а также в реках, озерах и других природных водных экосистемах.

Бактерии способны уменьшать избыточное содержание АФК в растворах альфа-излучающего радионуклида тория-232.

## **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

АФК – активные формы кислорода;  
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;  
ИИ – ионизирующее излучение;  
ЛПИ – линейная плотность ионизации;  
ЛПЭ – линейная передача энергии;  
НАДН – никотинамиддинуклеотидфосфат;  
HTO – тритиевая вода;  
РНК – рибонуклеиновая кислота;  
ФМН – flavinmononukleotid;  
ФМН<sup>·</sup> H<sup>+</sup> – flavinmononukleotid восстановленный;  
ФЭ – фотоэлектрический эффект;  
ЯМР – ядерный магнитный резонанс.

## **СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ**

1. Matsumoto, H. Vanguards of paradigm shift in radiation biology: radiation-induced adaptive and bystander responses / H. Matsumoto, N. Hamada, A. Takahashi, Y. Kobayashi, T. J. Ohnishi // Journal of Radiation Research. – 2007. – Vol. 48, № 2.– P. 97–106.
2. Smith, R. W. Proteomic changes in the rat brain induced by homogeneous irradiation and by the bystander effect resulting from high energy synchrotron X-ray microbeams / R. W. Smith, J. Wang, E. Schultke, C. B. Seymour, E. Brauer-Krisch, J. A. Laissue, H. Blattmann, C. E. Mothersill // International Journal of Radiation Biology. – 2013. Vol. 89, – P. 118–27.
3. Selivanova, M. A. Comparison of chronic low-dose effects of alpha- and beta-emitting radionuclides on marine bacteria / M. A. Selivanova, T. V. Rozhko, A. S. Devyatlovskaya, N. S. Kudryasheva // Central European Journal of Biology. – 2014. – Vol. 9, № 10. – P. 951 – 959.
4. 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. 102. – P. 407 – 411.
5. Azzam, E. I. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury /E. I. Azzam, J. P. Jay-Gerin, D. Pain // Cancer Letters. –2012. – Vol. 327. – P. 48 –60.
6. Brynildsen, M. P. Potentiating antibacterial activity by predictably enhancing endogenous microbial ROS production / M. P. Brynildsen, J. A. Winkler, C. S. Spina, I. C. MacDonald, J. J.Collins // Nature Biotechnology. – 2013. – Vol. 31. – P. 160 – 165.
7. Ezraty, B. Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria / B. Ezraty, A. Gennaris, F. Barras, J. F. Collet // Nature Reviews Microbiology. – 2017. – Vol. 15, № 7. – P. 385 – 396.

8. Calabrese, E. J. Hormesis: Path and Progression to Significance / E.J. Calabrese // International Journal of Molecular Sciences. – 2018. – Vol. 19. – P. 2871.
9. Jargin, S. V. Hormesis and radiation safety norms: Comments for an update /S. V. Jargin // Human & Experimental Toxicology. – 2018. – Vol. 37. – P. 1233–1243.
10. Shibamoto, Y. Overview of biological, epidemiological, and clinical evidence of radiation hormesis / Y. Shibamoto, H. Nakamura // International Journal of Molecular Sciences. – 2018. – Vol.19, № 8. – P. 2387.
11. 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.
12. Селиванова, М. А. Влияние на люминесцентные бактерии бета- и альфа-излучающих радионуклидов на примере трития и америция-241 : автореферат дис. ... кандидата биологических наук : 03.01.02 / Селиванова Мария Александровна.– Москва, 2013. – 22 с.
13. Dunlap, P. V. Luminous Bacteria / P. V. Dunlap, H. Urbanczyk // The Prokaryotes – Prokaryotic Physiology and Biochemistry / E. Rosenberg, E. F. DeLong, F. Thompson, S. Lory, E. Stackebrandt (eds) // Springer. – Berlin. – 2013. – P. 495 – 528.
14. Nealson, K. H. Isolation, identification and manipulation of luminous bacteria / K. H. Nealson // Methods in enzymology. – 1978. – Vol. 57. – P. 153 – 166.
15. Dunlap, P. Biochemistry and Genetics of Bacterial Bioluminescence / P. Dunlap // Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology / G. Thouand, R. Marks (eds) // Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology / Springer. – Berlin, Heidelberg. – 2014.– Vol. 1. – Vol. 144.

16. Brodl, E. Molecular Mechanisms of Bacterial Bioluminescence / E. Brodl, A. Winkler, P. Macheroux // Computational and Structural Biotechnology Journal. – 2018. – Vol. 16. – P. 551.
17. Ma, X. Y. Bioassay based luminescent bacteria: interferences, improvements, and applications / X.Y. Ma, Wang X. C., Ngo H. H., Guo W., Wu M. N., Wang N. // Science of The Total Environment. –2014. – P. 468 – 469. – C. 1 – 11.
18. 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.
19. 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.
20. McCapra F. Chemical generation of excited states: the basis of chemiluminescence and bioluminescence / F. McCapra // Methods in Enzymology. – 2000. – V. 305. – P. 3 – 47.
21. Журавлев А. И. Спонтанная биохемилюминесценция животных тканей / А. И. Журавлев // Биохемилюминесценция. Москва: Наука. – 1983. – С. 3 – 29.
22. Васильев Р. Ф. Механизмы возбуждения хемилюминесценции / Васильев Р. Ф. // Известия АН СССР, Сер. физ. – 1982. – Т. 46, № 2. – С. 323 – 329.
23. Lee J. Electronic excitation transfer in the complex of lumazine protein with bacterial bioluminescence intermediates / J. Lee, Y. Wang, G. Gibson // Biochemistry. – 1991. – V. 30. – P. 6825 – 6835.
24. Meighen E. A. Bacterial bioluminescence: organization, regulation, and application of the lux genes / E. A. Meighen // FASEB Journal. – 1993. – V. 7. – P. 1016 – 1022.

25. Kudryasheva, N. S. Effect of low-dose ionizing radiation on luminous marine bacteria: radiation hormesis and toxicity / N. S. Kudryasheva, T. V. Rozhko, // Journal of Environmental Radioactivity. – 2015. – Vol. 142, – P. 68 – 77.
26. Girotti, S. Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria / S. Girotti, E. N. Ferri, M. G. Fumo, E. Maiolini // Analytica Chimica Acta. – Vol. 608. – P. 2 – 29.
27. Esimbekova, E. Application of enzyme bioluminescence in ecology / E. Esimbekova, V. Kratasyuk, O. Shimomura // Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology. – 2014. – Vol. 144. – P. 67 – 109.
28. Rozhko, T. V. Effect of low-level  $\alpha$ -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. Bolsunovsky // Photochemical & Photobiological Sciences. – 2007. – V. 6. – P. 67 – 70.
29. Кудряшева, Н. С. Физико-химические основы биолюминесцентного анализа: учеб. пособие / Н. С. Кудряшева, В. А. Кратасюк, Е. Н. Есимбекова. – Красноярск: КрасГУ, 2002. – 154 с.
30. L'Annunziata, M. F. Radioactivity: Introduction and History, From the Quantum to Quarks / M. F. L'Annunziata. – 2 ed. – Elsevier, 2016. – P. 932.
31. Абрамов, А. А. Методическое руководство к курсу «Основы радиохимии и радиоэкологии» / А. А. Абрамов, Г. А. Бадун. Баку: Филиал хим. факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, 2011
32. Syed, N. A. Physics and Engineering of Radiation Detection / N. A. Syed. – 2 ed. – Elsevier, 2015. – P. 784.
33. Smith, T. A. Radioprotective agents to prevent cellular damage due to ionizing radiation / T. A. Smith, D. R. Kirkpatrick // Journal of Translational Medicine. –2017. – Vol. 15. – P. 232.
34. Guéguen, Y. Adaptive responses to low doses of radiation or chemicals: their cellular and molecular mechanisms / Y. Guéguen, A. Bontemps, T. G. Ebrahimian // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2019. – Vol. 76. – P. 1255.

35. Ленский, Л. А. Физика и химия трития / Ленский, Л. А. – Москва: Энергоиздат, 1981. – 113 с.
36. Ma, Y. Toxicity of cerium and thorium on *Daphnia magna* / Y. Ma, J. Wang, C. Peng, Y. Ding, X. He, P. Zhang, N. Li, T. Lan, D. Wang, Z. Zhang, Sun, H. Liao, Z. Zhang // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2016. – Vol. 134, № 1. – P. 226 – 232.
37. Жерин, И. И. Химия тория, урана, плутония: учебное пособие / И. И. Жерин, Г. Н. Амелина – Томск: Изд. ТПУ, 2010. – 147с.
38. Колупаев, Ю. Е. Активные формы кислорода в растениях при действии стрессоров: образование и возможные функции / Ю. Е. Колупаев // Вісник Харківського національного аграрного університету. Сер. Біологія. – 2007. – Вип. 3, № 12. – С. 6 – 26.
39. Su, Y. Recent advances in chemiluminescence for reactive oxygen species sensing and imaging analysis / Y. Su, H. Song, Y. Lv // Microchemical Journal. – 2019. – Vol. 146. – P.83 – 97.
40. Aprioku, J. S. Pharmacology of free radicals and the impact of reactive oxygen species on the testis / J. S. Aprioku // Journal of Reproduction & Infertility. – 2013. – Vol. 14. – P. 158 – 172.
41. Hybertson, B. M. Oxidative stress in health and disease: The therapeutic potential of Nrf2 activation / B. M. Hybertson, B. Gao, K. S. Bose, J. M. McCord // Molecular Aspects of Medicine. – 2011. – Vol. 32. – P. 234 – 246.
42. Imlay, J. A. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium / J. A. Imlay // Nature Reviews Microbiology. – 2013. – Vol. 11, № 7. – P. 443 – 454.
43. Phaniendra, A. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases / A. Phaniendra, D. B. Jestadi, L. Periyasamy // Indian Journal of Clinical Biochemistry. – 2015. – Vol. 30, № 1. – P. 11 – 26.
44. Winterbourn, C. C. Reconciling the chemistry and biology of the reactive oxygen species / C. C. Winterbourn // Nature Chemical Biology. – 2008. – Vol. 4. – P. 278 – 86.

45. Alfadda, A. A. Reactive oxygen species in health and disease / A. A. Alfadda, R. M. Sallam // Journal of Biomedicine and Biotechnology. – 2012. – Vol. 2012. – P. 14.

46. Griendling, K. K. Measurement of reactive oxygen species, reactive nitrogen species, and redox-dependent signaling in the cardiovascular system: A scientific statement from the American Heart Association / K. K. Griendling, R. M. Touyz, J. L. Zweier, S. Dikalov, W. Chilian, Y. R. Chen, D. G. Harrison, A. Bhatnagar // Circulation Research. – 2016. – Vol. 119. – P. 39 – 75.

47. Suzen S. Detection of reactive oxygen and nitrogen species by electron paramagnetic resonance (EPR) technique / S. Suzen, H. Gurer-Orhan, L. Sasو. // Molecules. – 2017. – Vol. 22. – P. 181.

48. Chatterjee, S. Immunity and inflammation in health and disease: Emerging roles of nutraceuticals and functional foods in immune support / S. Chatterjee, W. Jungraithmayr, D. Bagchi. – Academic Press, 2017. – 476 p.

49. Владимира Ю. А. Свободные радикалы в живых системах / Ю. А. Владимира, О. А. Азизова, А. И. Деев и др. // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. – 1992. – Т. 29. – С. 3 – 250.

50. Carrillo, M. C. Reactive oxygen species act as signaling molecules in liver carcinogenesis / M. C. Carrillo, M. D. L. Alvarez, J. P. Parody, A. D. Quiroga, M. P. Ceballos // Lipid Peroxidation / A. Catala. – IntechOpen, 2012. – Ch. 16.

51. Li, Z. Roles of reactive oxygen species in cell signaling pathways and immune responses to viral infections / Z. Li, X. Xu, X. Leng, M. He, J. Wang, S. Cheng, H. Wu // Archives of Virology. – 2017. – Vol. 162. – P. 603.

52. Malik B. Plant Signaling: Response to Reactive Oxygen Species / B. Malik, T. B. Pirzadah, I. Tahir, R. U. Rehman, K. R. Hakeem, M. Z. Abdin // Plant signaling: Understanding the molecular crosstalk / K. Hakeem, R. Rehman, I. Tahir (eds) // Springer. – New Delhi. – 2014. –P. 1 – 38.

53. National Research Council. Health risks from exposure to low levels of ionizing radiation: BEIR VII Phase 2 / National Research Council. – Washington, DC: National Academies Press, 2006.

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Кафедра биофизики

**УТВЕРЖДАЮ**

Заведующий кафедрой

*Виктория* Кратасюк В.А.  
«26» июня 2019 г.

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА И НИЗКОДОЗОВОЕ ВЛИЯНИЕ  
ТРИТИЯ НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ.

03.04.02 Физика

03.04.02.01 Биофизика

Научные руководители	<i>Кудряшев</i> проф., д.ф.-м.н.	Н.С. Кудряшева
	<i>Рожко</i> доцент, к.б.н.,	Т.В. Рожко
Выпускник	<i>Ноговицына</i>	Е.И. Ноговицына
Рецензент	<i>Зотина</i> с.н.с., к.б.н.	Т.А. Зотина

Красноярск, 2019