

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

_____ В.А. Кратасюк

« _____ » _____ 2020 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

03.03.02 – Физика

Активность ферментов люминесцентных бактерий в присутствии трития

Руководитель _____
подпись, дата

проф., д.ф-м.н. Н.С. Кудряшева

Руководитель _____
подпись, дата

доцент., к.б.н Т.В Рожко

Выпускник _____
подпись, дата

М.В. Гардт

Красноярск 2020

РЕФЕРАТ

Бакалаврская работа по теме «Активность ферментов люминесцентных бактерий в присутствии трития» содержит 50 страниц текстового документа, 44 использованных источников, 23 рисунка, 3 формулы, 2 приложения.

ТОКСИЧНОСТЬ; ФЕРМЕНТАТИВНАЯ СИСТЕМА; ТРИТИЙ, АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТА; АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА.

Работа посвящена анализу воздействия радионуклида трития на ферментативные реакции люминесцентных бактерий. Тритий встречается в природе в основном в виде тритиевой воды (НТО) и обладает высокой проникающей способностью. Известно, что энергия бета-частиц трития мала, поэтому он является удобным модельным радионуклидом при изучении защитных функций организма в условиях низких доз облучения. В связи с этим, выявление молекулярных механизмов, которые ответственны за отклики организмов на низкодозовые стрессовые воздействия, является актуальным.

В качестве тестовых объектов выбраны две ферментативные реакции, катализируемые бактериальными ферментами: НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза или люцифераза. В работе проводятся сопоставления эффектов трития на указанные моноферментные системы с его эффектами на сопряженную систему ферментативных реакций люцифераза-НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза и на люминесцентные бактерии. Для сопоставления используются данные работ [1-2], где представлены результаты, исследования низкодозовых воздействий трития ($< 0,1$ Грей) на биолюминесценцию морских бактерии и систему ферментативных сопряженных реакций а также выявлена связь между продукцией активных форм кислорода и интенсивностью биолюминесценции морских бактерий.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1. Литературный обзор	6
1.1 Люминесцентные бактерии и их использование в качестве биотеста токсичности	6
1.2 Бактериальные ферментативные реакции и их использование для мониторинга токсичности	8
1.3 Реакция, катализируемая бактериальной люциферазой	10
1.4 Воздействие трития на люминесцентные бактерии и их ферментативные системы	17
1.5 Активные формы кислорода и их роль в биологических процессах.....	21
2. Материалы и методы	24
2.1 Методы изучения активностей ферментативных систем	24
2.1.1 Изучение активности фермента люциферазы с помощью метода остановленной струи	24
2.1.2 Изучение активности фермента NADH:FMN-оксидоредуктазы спектрофотометрическим методом.....	27
2.2 Определение содержания активных форм кислорода хемилюминесцентным люминольным методом в ферментативных системах	29
3. Результаты и обсуждения.....	31
3.1 Влияние трития на активность бактериальной люциферазы	Ошибка! Закладка не определена.
3.2 Влияние трития на активность NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы	Ошибка! Закладка не определена.
3.3 Выявление роли активных форм кислорода в процессах воздействия трития на реакцию, катализируемую NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазой	Ошибка! Закладка не определена.
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	32
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	33
ПРИЛОЖЕНИЕ	39

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в результате техногенного загрязнения наблюдается увеличение содержания некоторых радионуклидов, которые в свою очередь оказывают воздействие на организмы. Радионуклид тритий встречается в природе в основном в виде тритиевой воды (НТО) и обладает высокой проникающей способностью. Известно, что энергия бета-частиц трития мала, поэтому он является удобным модельным радионуклидом при изучении защитных функций организма в условиях низких доз облучения. В связи с этим, выявление молекулярных механизмов, которые ответственны за отклики организмов на низкодозовые стрессовые воздействия, является актуальным.

Морские люминесцентные бактерии и их ферментативные системы являются универсальными биотестами, т.к. их свечение чрезвычайно чувствительно к присутствию токсичных соединений. Они характеризуются высокой чувствительностью, высокой скоростью анализа (1-5 мин) и воспроизводимостью результатов, а также всеми преимуществами приборной регистрации люминесценции и количественной оценки токсичности.

В предыдущих работах проведено исследование воздействий трития на интенсивность биолюминесценции морских бактерий и сопряженной системы реакций, катализируемых ферментами этих бактерий, в условиях низких доз облучения ($< 0,1$ Грей) [1]. Показано, что воздействия трития на эти системы соответствуют модели радиационного гормезиса, то есть тритий может как увеличивать, так и подавлять интенсивность биолюминесценции этих систем. Однако возникает вопрос, соответствует ли модели гормезиса влияние трития на ещё более простые биологические системы – отдельные несопряженные ферментативные реакции.

В работе [2] выявлена связь между продукцией активных форм кислорода (АФК) и интенсивностью биолюминесценции морских бактерий. Предполагалось, что АФК участвуют в активации биолюминесценции бактерий

в условиях низко- и средне- дозовой нагрузки, выполняя сигнальную роль межклеточных мессенджеров. Представляет интерес выявление роли АФК в отдельных несопряжённых реакциях, катализируемых бактериальными ферментами.

Цель исследования – оценка низкодозового воздействия трития на активность ферментов люминесцентных бактерий.

В работе поставлены следующие **задачи**:

1. Измерить активность бактериальных ферментов – бактериальная люцифераза и NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза;
2. Измерить содержание активных форм кислорода (АФК) в этих реакциях;
3. Сравнить полученные результаты с более сложными биолюминесцентными системами - бактериями и сопряженными ферментативными системами.

1. Литературный обзор

1.1 Люминесцентные бактерии и их использование в качестве биотеста токсичности

Основа биолюминесценции, т.е. свечения организмов, – хемилюминесцентные реакции, с участием биологических катализаторов – ферментов, которые принято называть люциферазами [3,4]. В настоящее время известно несколько способов перевода вещества в возбужденное состояние, когда один из электронов атома или молекулы переходит со своей невозбужденной орбитали на другую орбиталь, характеризующуюся большей энергией. Возвращаясь на исходную орбиталь, электрон испускает избыток энергии в виде фотона (или светового кванта) – мельчайшей частицы света. Длительность люминесценции может варьироваться от 10^{-10} с до нескольких часов. Также она может наблюдаться в ультрафиолетовой, видимой, инфракрасной областях [5]. Люминесценцию можно классифицировать двумя путями: по способу получения электронно-возбужденных состояний и по природе излучения.

Наибольшее значение и интерес для исследователей представляет фотолюминесценция – когда возбужденные состояния получаются в результате поглощения энергии кванта света. Для фотолюминесценции характерны следующие параметры: спектры люминесценции, поляризация, квантовый выход (отношение количества испущенных квантов к количеству поглощенных). Из закона Стокса известно, что максимум спектра фотолюминесценции сдвинут в длинноволновую область по сравнению с максимумом спектра поглощенного излучения. А если спектры приведены в энергетической шкале (в шкале частот), то спектры флуоресценции и спектры поглощения приблизительно зеркально симметричны [5].

Поглощение и испускание света удобно иллюстрировать с помощью диаграмм уровней энергии электронных состояний, которые предложены

Яблонским. Основное, первое и второе состояния обозначают соответственно как S_0 , S_1 и S_2 , соответственно (рисунок 1.1) [6]. Переходы между разными электронными уровнями обозначены на этих диаграммах вертикальными стрелками. Например, на рисунке приведены стрелки, соответствующие поглощению кванта света. Этот процесс происходит практически мгновенно, примерно за 10^{-15} с, т.е. за время, слишком короткое, чтобы произошло заметное смещение ядер (принцип Франка-Кондона) [6].

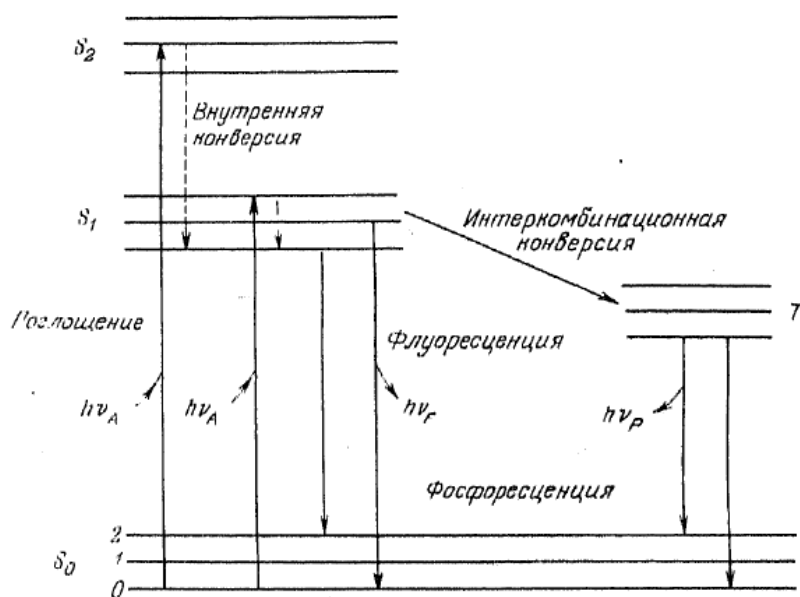


Рисунок 1.1 – Диаграмма Яблонского

Образование видимого света в результате химической реакции, протекающей у некоторых организмов (морских бактерий, светляков, органов глубоководных рыб) объясняется таким явлением, как **биолюминесценция**. Этот частный случай хемилюминесценции представляет собой реакцию, катализируемую биокатализаторами – ферментами. В последние годы в качестве биотестовых систем начали использовать ферменты, выделенные из светящихся организмов, точнее, биолюминесцентные реакции, катализируемые этими ферментами. Ферменты этих реакций называются люциферазами (в переводе с латинского "люцифер" означает «неживой свет»). Люциферазы катализируют реакцию, которая завершается образованием электронно-возбужденных

состояний и испусканием кванта света [5]. Обычно биолюминесцентные реакции – реакции окислительного типа с участием молекулярного кислорода.

В последнее десятилетие наблюдается применение светящихся бактерий для мониторинга биологических эффектов малых доз ионизирующего излучения.

Морские люминесцентные бактерии и их ферментативные системы являются универсальными биотестами, т.к. их свечение чрезвычайно чувствительно к присутствию токсичных соединений. Они характеризуются высокой скоростью анализа (1-5 мин), чувствительностью, воспроизводимостью результатов, а также возможностью приборной регистрации и количественной оценки токсичности [7].

Ранее были получены данные исследования низкодозового ($< 0,1$ Грей) воздействия трития (в составе тритиевой воды, НТО) на биолюминесценцию морских бактерии и сопряженной системы реакций, катализируемых бактериальными ферментами [1]. Выяснилось, что воздействие трития на эти системы согласуется с моделью радиационного гормезиса, т.е. тритий может как активировать, так и ингибировать эти системы.

1.2 Бактериальные ферментативные реакции и их использование для мониторинга токсичности

Для того, чтобы оценить токсичность различных водных растворов принято использовать такие биотесты, как, например, бактерии, рачки, водоросли и т.д. Термин «токсичность» определяется как подавление физиологических функций организмов. Для определения «меры токсичности» обычно используют концентрации токсичных веществ, подавляющие физиологические функции на 50%.

В ходе биотестирования проводится мониторинг физиологических функций организма, таких как подвижность, время жизни, дыхание и т.д. Результаты биотестирования характеризуются неспецифичностью и

интегральностью. Интегральность означает, что воздействие нескольких химических соединений, присутствующих в тестируемом образце, учитывается (чаще неаддитивно) в изменении одной физиологической функции тестового организма. Предполагается, что результаты мониторинга токсичности, полученные с помощью простейших организмов, можно экстраполировать на более сложные многоклеточные организмы [8 – 11].

Среди преимуществ биолюминесцентных методов анализа, по сравнению с другими биотестами, – возможность количественной оценки токсичности, быстрое действие, точность, чувствительность и простота анализа [12, 13].

Кроме того, существует возможность использования биолюминесцентных систем различной сложности - биолюминесцентные бактерии или выделенные ферменты, что позволяет сравнивать эффекты соответственно на клеточном и биохимическом уровнях.

В классическом случае в экологическом мониторинге использовался только интегральный тест, основанный на люминесцентных бактериях [14 – 16]. Вместе с тем, в последние годы появляется большое количество данных, которые демонстрируют чувствительность к токсикантам реакции бактериальной люциферазы. Это послужило основой для создания концепции нового направления в биотестировании - люциферазных биотестов для определения токсичности [12]. Это направление отличается тем, что вместо светящихся бактерий, как тестовых объектов, используются тест-реакции, катализируемые бактериальной люциферазой, или биферментная система: НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза – люцифераза, а также полиферментные системы на основе биферментной системы [17 – 18].

Наиболее широко исследована и описана биолюминесцентная биферментная система НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза–люцифераза, которая включает в себя НАДН-зависимую реакцию, катализируемую НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазой, в результате которой происходит восстановление ФМН.

Известно, что ферментативные биотесты могут быть классифицированы по специфичности как промежуточные между биотестами, основанными на

живых организмах (т.е. интегральными тестами), и специфическими химическими тестами. Это связано с тем, что они характеризуются специфичностью к некоторым группам соединений. Так, в присутствии окислителей в биферментной системе может появляться период задержки свечения [17, 19 – 20]. В настоящее время известны ферментативные тесты, чувствительные к протеазам [22], Специфичность действия протеаз связана с их воздействием на бактериальные ферменты, что приводит к изменению константы спада биолюминесценции. На этом основан способ определения активности протеазы.

Особый интерес в настоящее время представляет разработка люминесцентных биотестов для анализа радиационной токсичности сред. Такие разработки должны базироваться на изучении механизмов воздействия радионуклидов на биотестовые системы.

1.3 Реакция, катализируемая бактериальной люциферазой

Бактериальная люцифераза - это флавинзависимая монооксигеназа, уникальной функциональной особенностью которой является катализ биолюминесцентной реакции в светящихся бактериях. Этот фермент представляет собой гетеродимер, состоящий из двух различных полипептидов, α - и β -субъединиц (рис. 1.2). Молекулярная масса разных видов люцифераз варьируется в пределах 77-80 кДа [22].

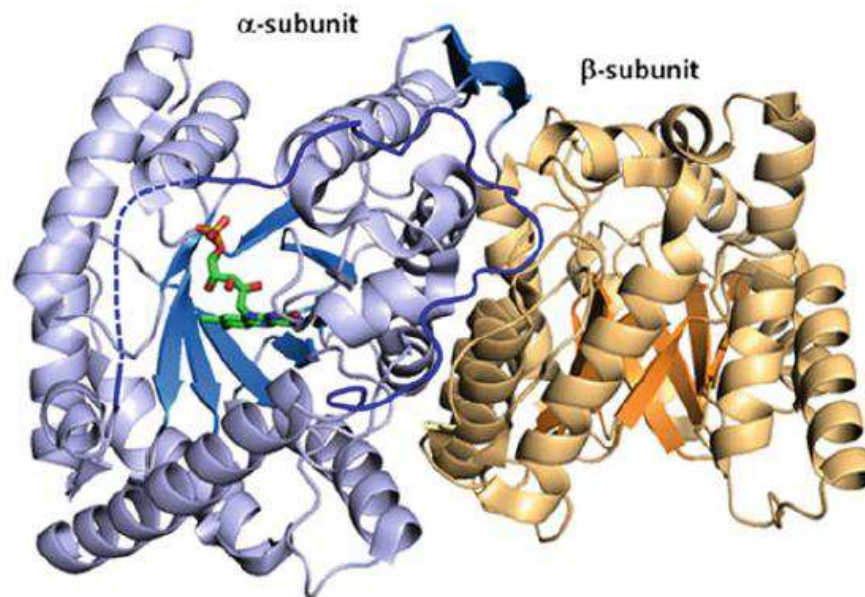
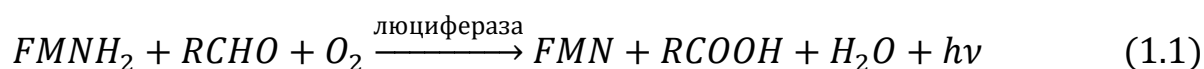


Рисунок 1.2 – Структура бактериальной люциферазы.

Биолюминесцентная реакция, которая является основой свечения бактерий, представляет собой окисление восстановленного флавинмононуклеотида ($FMNH_2$), длинноцепочечного альдегида ($RCHO$) молекулярным кислородом (O_2), до окисленного флавина (FMN), карбоновой кислоты ($RCOOH$) и воды (H_2O) с сопутствующим испусканием света ($h\nu$) [22]:



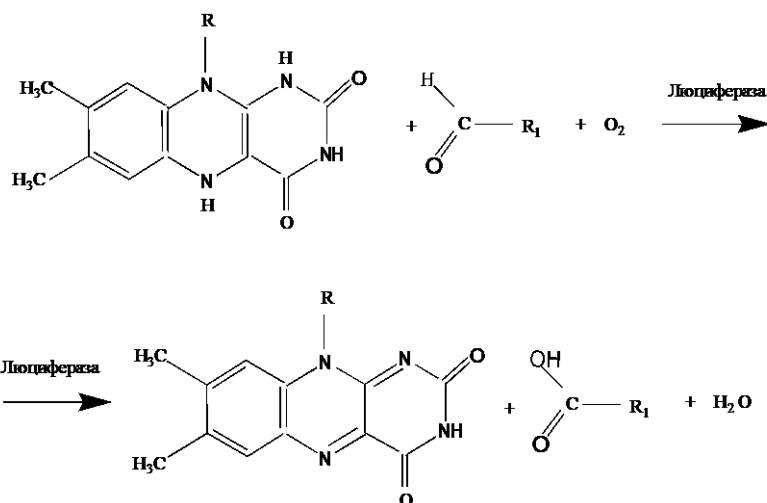


Рисунок 1.3 – Билюминесцентная реакция и ее компоненты

На Рисунках 1.3 и 1.5 билюминесцентная реакция представлена в сокращенном и развернутом виде. На Рисунке 1.4 представлены химические структуры FMNH₂ и FMN.

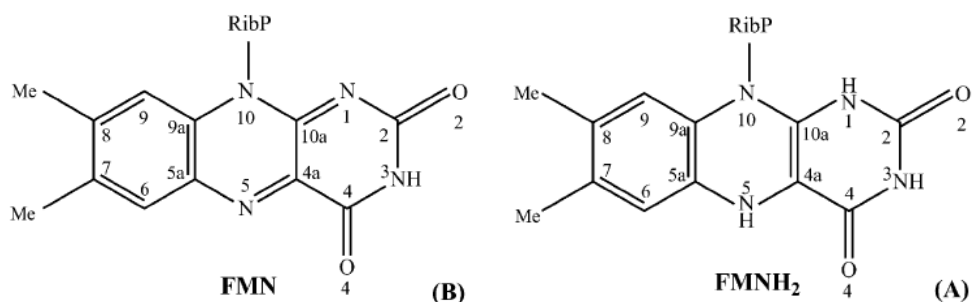


Рисунок 1.4 – Молекулярная структура FMNH₂ и FMN

Некоторые светящиеся бактерии несут флуоресцентные белки для модуляции цвета излучения. Так, в *Photobacterium leiognathi* взаимодействие люмазина с соответствующими люциферазами дает излучения, сдвинутое гипсохромо на 15 нм. Люциферазы хорошо функционируют с длинноцепочечными альдегидами из восьми атомов углерода или более, причем, тетрадеканаль считается природным альдегидом, используемым *in vivo* в люминесцентных бактериях. Но данный реагент подвергается медленному неферментативному окислению, и скорость данной реакции зависит от начальной концентрации и температуры. Люминесцентная реакция, активированная введением раствора FMNH₂, может длиться от 10 до 100 секунд

в зависимости от длины цепи используемого альдегида и вида бактерий, из которых выделена люцифераза [22].

Биолюминесцентная реакция бактерий – многостадийный процесс (рис. 4), который включает в себя:

- связывание люциферазы с флавином;
- реакцию фермент-субстратного комплекса с молекулярным кислородом (образование C_{4a} -пероксифлавина);
- связывание альдегида C_{4a} -пероксифлавином с образованием аддукта – флавин- C_{4a} -пероксиполуацеталь;
- диссоциация аддукта на карбоновую кислоту и возбужденный эмиттер (C_{4a} -гидроксифлавин);
- испускание C_{4a} -гидроксифлавином кванта света (с энергией около 490 нм);
- распад C_{4a} -гидроксифлавина на воду и окисленный флавин.

В отсутствие альдегида C_{4a} -пероксифлавин распадается на пероксид водорода и FMN без излучения света через темновой путь [22].

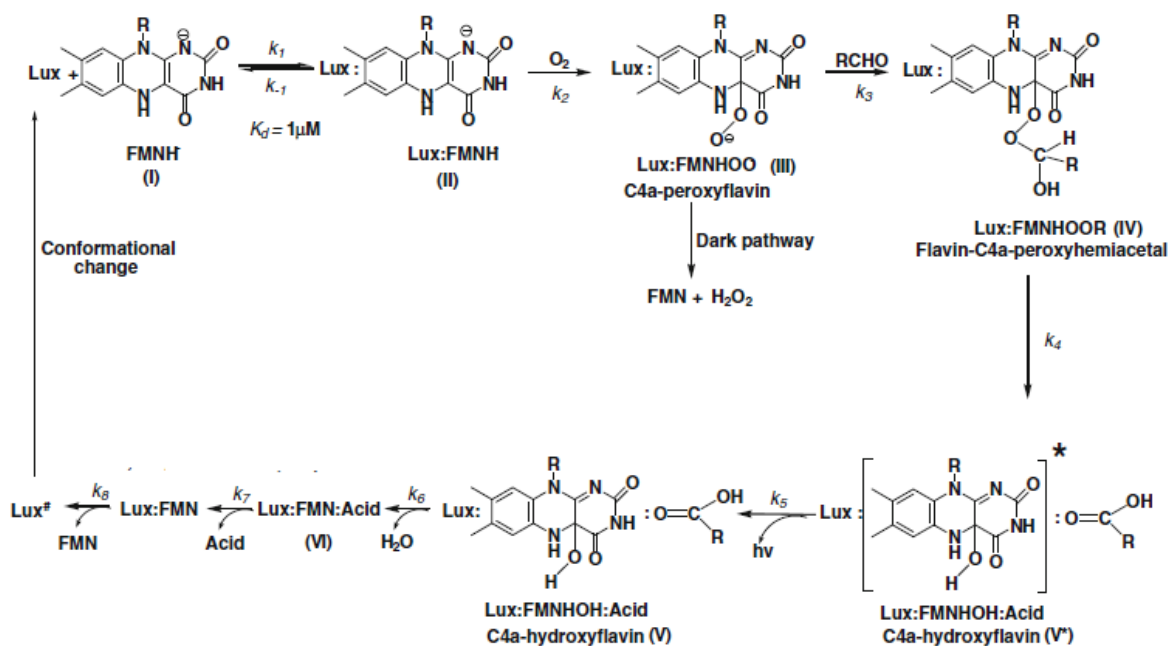


Рисунок 1.5 – Подробная схема реакции, катализируемой бактериальной люциферазой

Ни один из субстратов биолюминесцентной реакции не может существовать в бактериальных клетках в свободном виде ($FMNH_2$ – по причине быстрого автоокисления кислородом воздуха, а альдегид – из-за того, что он, являясь ядом, не производится организмами). Люминесцентные бактерии имеют специальные ферментативные системы, ответственные за восстановление флавина и карбоновой кислоты и для дальнейшего использования в биолюминесцентной реакции. Считается, что восстановление окисленного флавина в бактериях происходит в реакции, катализируемой NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазой. В экспериментальных исследованиях применяют несколько способов получения $FMNH_2$, один из них описан ниже [22]

Фотовосстановление флавина с этилендиаминтетрауксусной кислотой [22]

Фотовосстановление FMN в присутствии этилендиаминтетрауксусной кислоты (далее EDTA) описывается реакцией:



Считается, что EDTA предоставляет 2 необходимых атома водорода. Подробный механизм реакции описан в статьях [23-26]. В ходе необратимой реакции EDTA гидролизуется до гликоксилата с высвобождением CO_2 (обозначено как фотопродукты).

В присутствии EDTA после выключения света не наблюдается окисления $FMNH_2$ до FMN. Барботирование воздухом (3 см^3 в течение 30 с) после 20 минут экспозиции без света также не приводит к окислению. Считается, что кислород, поступающий в процессе барботирования, поглощается фотопродуктами, формируемыми при взаимодействии FMN и EDTA.

Было установлено, что в присутствии EDTA при аэробных условиях в течение первых 30 секунд фотовосстановление незначительное. Вероятно, вклад автоокисления изначально значителен до тех пор, пока не будет использован кислород. После выключения света поглощение восстанавливается, сначала медленно, с последующим ускорением. За 40 минут FMN восстанавливается практически полностью. Окисление, скорее всего, вызвано диффузией кислорода. Медленное начало окисления, вероятно, вызвано поглощением кислорода фотопродуктами EDTA.

1.5 Радионуклид тритий. Распространение в природе и воздействие на организмы

Радионуклид тритий представляет собой бета-излучающий изотоп водорода, является одним из самых распространенных продуктов распада радиоизотопов в ядерной промышленности. Находясь в окружающей среде главным образом в виде тритиевой воды (НТО), тритий обладает высокой проникающей способностью. Содержание трития в организмах пропорционально его концентрации в окружающей среде. Тритий и его стабильный изотоп протий аналогичны по химическим свойствам, поэтому тритий способен замещать протий в органических соединениях. Энергия бета-частиц трития мала, и поэтому он считается одним из самых безопасных радиоизотопов. Но при этом, попадая в ткани, тритий создает значительную плотность ионизации среды.

Таким образом, тритий представляет собой удобный модельный объект для изучения защитной реакции организмов при воздействии малых доз радиации из-за его низкой энергии бета-распада, что чрезвычайно актуально в настоящее время.

Установлено, что тритий увеличивает рост бактерий при малых концентрациях и подавляет его при больших. При этом, он обычно стимулирует их люминесценцию: увеличивается интенсивность люминесценции, квантовый выход и время светоизлучения [1].

В работе [1] показаны три последовательных стадии биолюминесцентного отклика воздействие ионизирующего излучения на примере трития и америция-241: продемонстрированы стадии (1) отсутствия эффекта, (2) активации и (3) ингибирования биолюминесценции, что можно интерпретировать, соответственно, как (1) распознавание стресс-фактора, (2) адаптивный отклик на стрессовое воздействие и (3) подавление физиологической функции.

1.4 Воздействие трития на люминесцентные бактерии и их ферментативные системы

1.4.1. Влияние трития на свечение люминесцентных бактерий [1,27]

Изучено воздействие тритиевой воды различных радиоактивностей на люминесценцию интактных и лиофилизированных бактерий [1,27]. Интенсивность люминесценции использовалась в качестве параметра физиологической активности бактерий [28 – 30].

На Рисунке 1.6.1 в качестве примера приведены результаты измерения люминесценции бактерий, выращенных в НТО с удельной радиоактивностью 2 МБк/л.

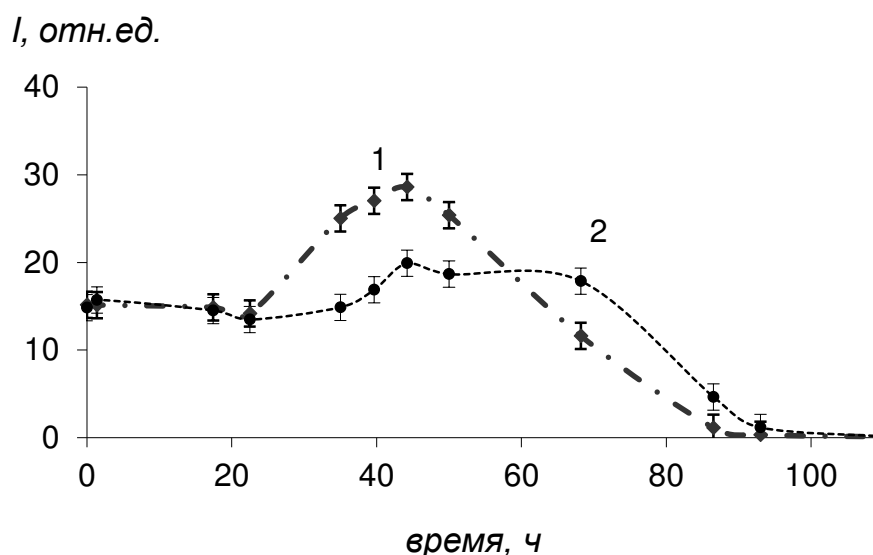


Рисунок 1.6.1 – Зависимость интенсивности билюминесценции интактных бактерий, I , от времени воздействия трития. Бактерии выращены в питательной среде с НТО (2 МБк/л) – кривая 1, и в среде без НТО – кривая 2 (контроль) [1,27].

Выходы квантов, рассчитанные по площади под кривыми люминесценции в течение всего времени свечения интактных бактерий, практически не отличались от контроля при всех радиоактивностях трития (0,01 - 10^3 МБк/л).

На Рисунке 1.6.2 приведена кинетика биолюминесценции лиофилизированных бактерий, отобранных на экспоненциальной стадии их роста. Кинетика биолюминесценции продемонстрирована для раствора активностью 2 МБк/л.

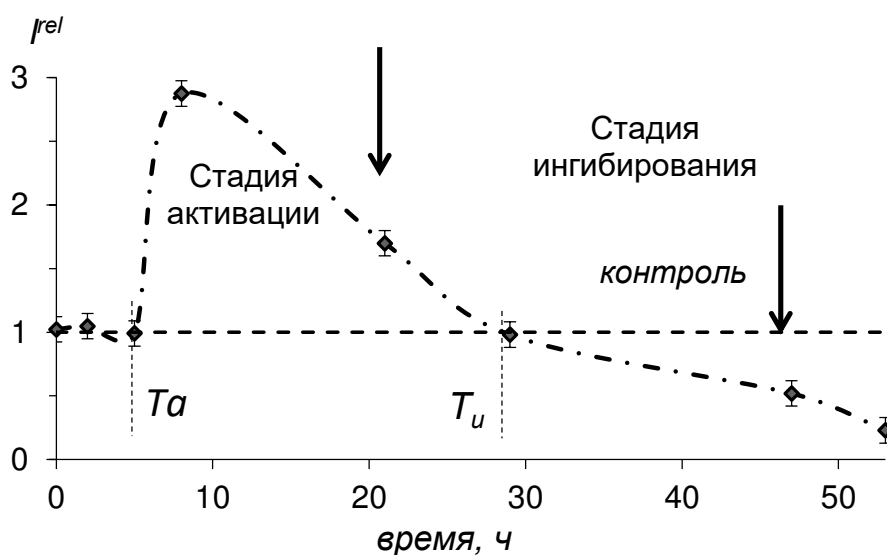


Рисунок 1.6.2 – Зависимость относительной интенсивности свечения, I^{rel} , лиофилизированных бактерий от времени в НТО, $A = 2$ МБк/л [1,27].

Стоит отметить, что на данном рисунке наблюдаются те же три последовательные стадии: отсутствие эффекта, активация биолюминесценции, и ингибирование биолюминесценции. Продолжительность первой стадии составляла примерно 5 часов, вторая стадия заканчивалась к 59 часам. Изменение активности НТО существенно не влияло на длительность стадий [31].

Также стоит отметить, что активация биолюминесценции (рис. 1.6.2) не превышала 300 % по сравнению с контрольным образцом.

В работах [32 – 34] данный эффект на стадии активации свечения объясняют явлением радиационного гормезиса. Его связывают с защитной реакцией клеток на низкоконцентрационное воздействие токсических веществ, низких доз радиации и т.д. [32, 35]. Примером гормезиса является неспецифический адаптивный синдром растений [36], а также стрессовая

реакция животных [37]. Молекулярные механизмы радиационного гормезиса в настоящее время привлекают повышенный интерес исследователей.

Молекулы тритиевой воды (НТО) способны легко проникать через клеточную мембрану, аналогично молекулам H_2O ; поэтому продукты радиоактивного распада трития (свободный электрон и положительно заряженный ион гелия-3) способны воздействовать на бактериальные структуры - от внешней клеточной мембраны до ферментов и их субстратов внутри клеток. Активирующий эффект трития может быть связан с увеличением эффективности переноса заряда в клетках [38 – 39], приводящим к ускорению ферментативных реакций и других внутриклеточных процессов. Эти же процессы, но при более длительном воздействии способны ингибировать люминесцентную функцию бактерий и другие внутриклеточные процессы.

1.4.2. Влияние трития на биолюминесцентную ферментативной системы [1, 27]

В работе [1, 27] показано воздействие тритиевой воды (НТО) на люминесценцию ферментативной системы двух сопряженных реакций: НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза – люцифераза. На рисунке 1.6.3 приведены кинетические кривые для биолюминесценции ферментативной системы в НТО. Из этого рисунка видно, что удельные радиоактивности 0,0002; 0,002; 0,02; 0,2; 2 МБк/л активируют свечение; а 10; 20; 50; 100 МБк/л – ингибируют его. Время наблюдения за образцами было в этом эксперименте было ограничено 40 минутами из-за падения интенсивности свечения ферментативной системы, (рис. 1.6.3), что гораздо меньше, чем для бактериальных систем (рис. 1.6.1 – 1.6.2).

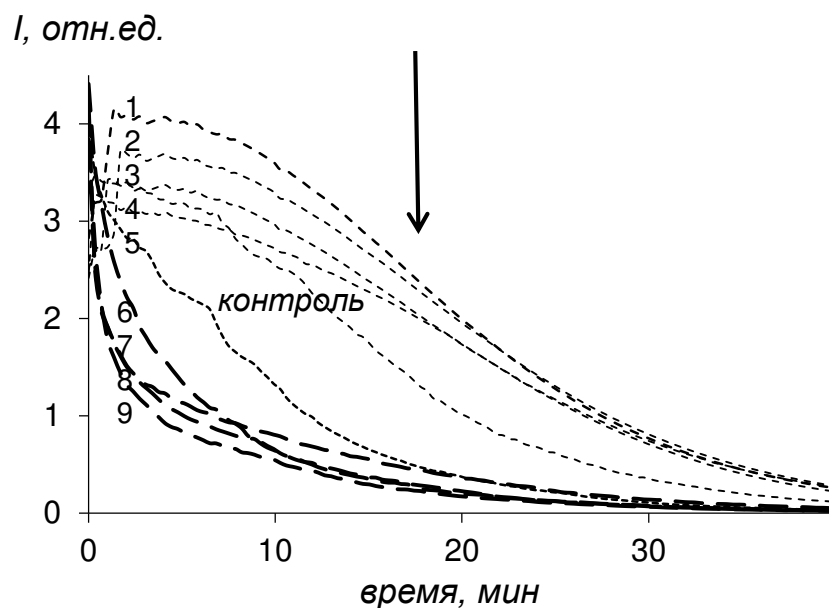


Рисунок 1.6.3 – Кинетика свечения биферментной системы в НТО. Удельная радиоактивность растворов: 1 - 0,0002; 2 - 0,002; 3 - 0,02; 4 - 0,2; 5 – 2; 6 - 10; 7 - 20; 8 - 50; 9 - 100 МБк/л [1, 27]

На Рисунке 1.6.4 результаты представлены в виде зависимости относительной интенсивности свечения, I^{rel} , от времени, для двух удельных радиоактивностей - 2 и 50 МБк/л. В первом случае наблюдали активацию, а во втором - ингибирование биолюминесценции.

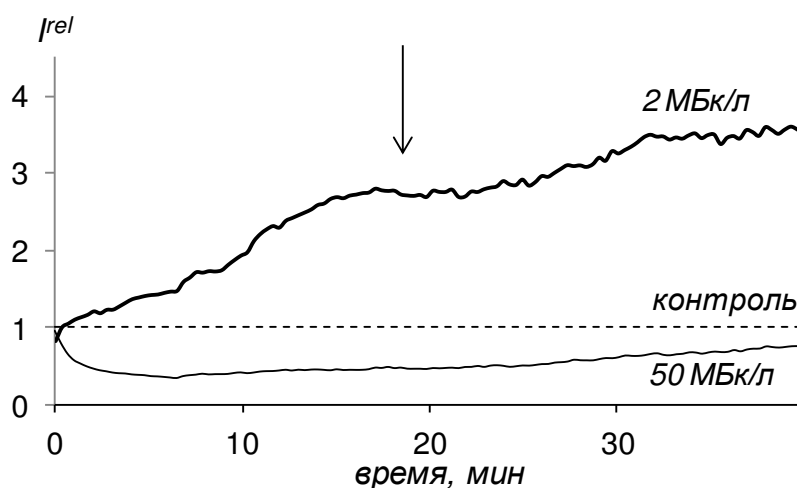


Рисунок 1.6.4 – Зависимость относительной интенсивности свечения, I^{rel} , от времени воздействия НТО. Ферментативная система [1, 27]

На рисунке 1.6.5 представлена зависимость интенсивности биолюминесценции биферментной системы от удельной радиоактивности тритиевой воды, НТО. Время отбора проб, равное 18 мин, указано стрелками на рисунках 1.6.3 и 1.6.4.

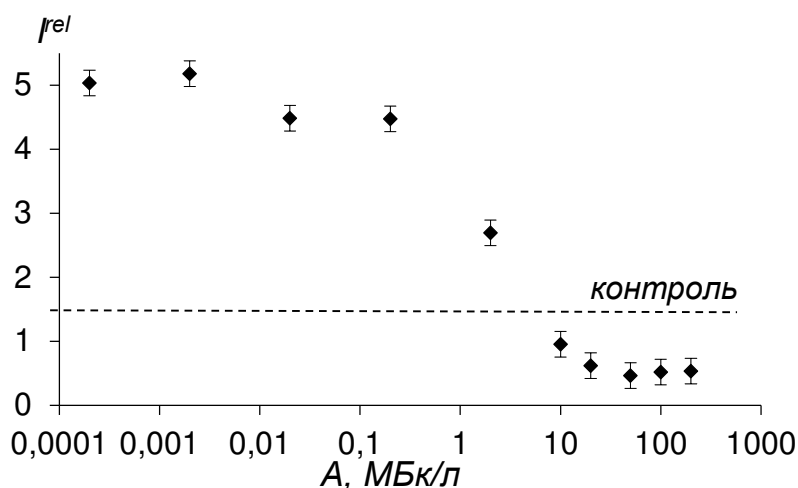


Рисунок 1.6.5 – Зависимость относительной интенсивности свечения ферментативной системы, I^{rel} , от удельной радиоактивности НТО. Время отбора проб – 18 мин [1, 27]

Радиоактивность НТО, равная 10 МБк/л, является переходной между активацией и ингибированием биолюминесценции. В работе отмечалось, что эта величина активности варьируется в интервале 2 - 10 МБк/л.

1.5 Активные формы кислорода и их роль в биологических процессах [40]

Кислород является одним из важнейших химических элементов для биоэнергетики большинства живых организмов. Молекулярный кислород проявляет себя в роли окислителя органических веществ, что является основой дыхания животных, растений, грибов и бактерий. Кроме окислительного фосфорилирования 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 обычно относят: перекисные соединения, включая перекись водорода (H_2O_2), супероксид анион-радикал (O_2^-), гидроксильный радикал (ОН), синглетный кислород (1O_2), гипохлорит (НОСl), гидропероксильный радикал (НОО), а также окись азота (NO) и пероксинитрит ($ONOO^-$), обладающие высокой окислительной активностью [41].

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 физиологию. 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 [42].

Существует два типа радикалов, которые формируются в организме: природные радикалы, которые образуются в живых клетках; и чужеродные, которые появляются в результате воздействия ионизирующего излучения, ультрафиолетового облучения или под действием интенсивного видимого света,

например, лазерного. В свою очередь, свободные радикалы классифицируются как первичные, вторичные и третичные.

Первичные радикалы выполняют «полезные» для организма функции. Это эндогенные молекулы, которые постоянно образуются в клетках и межклеточном пространстве как естественный продукт метаболизма кислорода. Так, из первичного радикала – супероксида - в организме могут образовываться активные молекулярные соединения, такие как перекись водорода, гипохлорит и гидроперекиси липидов [43].

Под действием ионов металлов переменной валентности, в первую очередь – ионов Fe^{2+} , из этих веществ могут образовываться вторичные радикалы (такие как радикал гидроксида и радикалы липидов), которые оказывают разрушительное воздействие на клеточные структуры. Вторичные свободные радикалы не выполняют полезных физиологически функций и оказывают разрушительное воздействие на клеточные структуры. Например, они отбирают электроны у «полноценных» молекул, благодаря чему «пострадавшая» молекула сама становится свободным радикалом – третичным, но в основном слабым, не способным 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 полураспада 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, что отвечает требованиям, предъявляемым к экспресс-анализу [44].

2. Материалы и методы

2.1 Методы изучения активностей ферментативных систем

2.1.1 Изучение активности фермента люциферазы с помощью метода остановленной струи

Используемые растворы:

1. Флавинмоноклеотид (Sigma); концентрацию определяли спектрофотометрически по коэффициенту молярной экстинкции при длине волны 445 нм ($\epsilon_{445} = 12200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$);
2. EDTA (ROTH); в качестве стабилизатора при фотовосстановлении FMN использовали раствор EDTA 0,03 М в фосфатном буфере;
3. Рекомбинантная люцифераза бактерий *Photobacterium phosphoreum* (Институт биофизики СО РАН); раствор готовили добавлением в лиофилизированный препарат люциферазы калий-фосфатного буфера (0,05 М, pH 6.8);
4. Деканаль (Sigma), спиртовой раствор содержал 20 мкМ альдегида;
5. Образцы тритиевой воды с радиоактивностями 0 - 100 МБк/л

Измерения проводились на спектрофотометре Stopped-Flow. Фотография прибора представлена в Приложении А.1.

Приготовление рабочих растворов:

Раствор ФМН готовили следующим образом: навеску ФМН массой 0,0014 г сначала растворяли в 10 мл 0,05 М калий-фосфатного буфера (pH 6,85).

Получение фотовосстановленного FMN

Фотовосстановление FMN проводили в присутствии 0,01 М EDTA.

Перед фотовосстановлением проводили удаление кислорода из раствора с помощью барботирования аргоном в течение 5 минут. Фотовосстановление FMN проводили во внутреннем шприце анализатора кинетики быстрых процессов

облучением светодиодом в течение 10 минут, пока раствор не становился прозрачным.

На спектрофотометре определяли оптическую плотность раствора ФМН на длине волны 445 нм. Концентрацию ФМН рассчитывали с использованием закона Бугера-Ламберта-Бера с учетом того, что ширина кюветы 0,2 см, а коэффициент молярной экстинкции ФМН на длине волны 445 нм равен 12400 л/моль·см. Полученная концентрация оказалась равной $3,02 \cdot 10^{-4}$ М. Необходимую концентрацию ФМН ($3 \cdot 10^{-5}$ М) получали путем добавления 90 мл буфера. Общий объем полученного раствора 0,1 л.

Измерение биолюминесценции:

Измерения биолюминесценции проводили для 10 активностей НТО (0.0002, 0.002, 0.02, 0.2, 2, 10, 20, 50 и 100 МБк/л) в 3-х повторностях. Непосредственно для каждого измерения было приготовлено 30 пробирок с 875 мкл люциферазы в каждой. К люциферазе добавляли 292 мкл НТО различной радиоактивности, выдерживали 5 минут, затем добавляли 40 мкл альдегида C_{14} (тетраальдегида) и отправляли на измерения.

В таблице 2.1 приведены удельные радиоактивности и объемы используемых растворов.

Таблица 2.1 – Характеристики рабочих растворов для измерений интенсивности биолюминесценции при различных активностях НТО

№ образца	$A^{(1)}$ в измерительной ячейке, МБк/л	$A^{(1)}$ в шприце, МБк/л	$V_1^{(2)}$, мкл	$V_2^{(3)}$, мкл	$V_3^{(4)}$, мкл	$V_4^{(5)}$, мкл	$V_5^{(6)}$, мкл	$V_6^{(7)}$, мкл
1	0	0	3500	2625	875	1000		
2	0,0002	0,0004	3500	2625	875	1000	400	600
3	0,002	0,004	3500	2625	875	1000	40	960
4	0,02	0,04	3500	2625	875	1000	400	600
5	0,2	0,4	3500	2625	875	1000	40	960
6	2	4	3500	2625	875	1000	400	600
7	10	20	3500	2625	875	1000	10	990
8	20	40	3500	2625	875	1000	20	980

№ образца	A ⁽¹⁾ в измерительной ячейке, МБк/л	A ⁽¹⁾ в шприце, МБк/л	V ₁ ⁽²⁾ , мкл	V ₂ ⁽³⁾ , мкл	V ₃ ⁽⁴⁾ , мкл	V ₄ ⁽⁵⁾ , мкл	V ₅ ⁽⁶⁾ , мкл	V ₆ ⁽⁷⁾ , мкл
9	50	100	3500	2625	875	1000	50	950
10	100	200	3500	2625	875	1000	100	900

⁽¹⁾ A - удельная радиоактивность раствора, МБк/л

⁽²⁾ V₁ - общий объем раствора

⁽³⁾ V₂ – объем люциферазы

⁽⁴⁾ V₃ - объем НТО, добавляемой в люциферазу

⁽⁵⁾ V₄ – общий объем НТО (V₄ = V₅ + V₆)

⁽⁶⁾ V₅ – стоковый объем

⁽⁷⁾ V₆ – объем 3 %-ого раствора NaCl

Билюминесцентную реакцию запускали раствором ФМН·Н₂ с использованием инжекторной системы.

ФМН·Н₂ получали фотовосстановлением ФМН в присутствии ЭДТА видимым светом. В качестве источника света использовали обычную настольную лампу. Через дозатор FMN·H₂ поступал в кювету с реакционной смесью, запуская билюминесцентную реакцию.

Для исследования влияния на билюминесценцию времени инкубирования люциферазы с НТО использовали раствор НТО радиоактивностью 2 МБк/л. Максимальное время инкубирования – 87,5 часов.

Для оценки влияния НТО на билюминесценцию бактериальной люциферазы оценивали выход квантов в билюминесцентной реакции в контрольных и всех радиоактивных образцах Q^{rel}. Для этого в условных единицах оценивали площадь под кинетическими кривыми билюминесценции (Глава 3, Рисунок 3.1) и рассчитывали величину Q^{rel}

$$Q^{rel} = \frac{Q^{rad}}{Q^{contr}} \quad (2.1)$$

где Q^{rad} и Q^{contr} – площади под кинетическими кривыми соответственно для радиоактивных и контрольных образцов.

Величины Q^{rel} были рассчитаны как для реакции бактериальной люциферазы (моноферментная система), так и для биферментной системы сопряженных ферментативных реакций, катализируемых бактериальной люциферазой и NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазой. Во втором случае использовали экспериментальные данные, полученные ранее Селивановой М.А. [1].

2.1.2 Изучение активности фермента NADH:FMN-оксидоредуктазы спектрофотометрическим методом

Используемые растворы:

Контрольный образец:

1. 12,5 мкл раствора NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы в буфере;
2. 100 мкл 0,02 М калий-фосфатного буфера (pH 6,8);
3. 50 мкл растворенного в воде ФМН ($C = 10^{-4}$ М);
4. 200 мкл НАДН, растворенный в буфере ($C = 10^{-4}$ М);

Радиоактивный образец:

1. 12,5 мкл раствора NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы в буфере;
2. 280 мкл НТО (10 радиоактивностей);
3. 50 мкл растворенного в воде ФМН ($C = 10^{-4}$ М);
4. 20 мкл НАДН, растворенный в буфере ($C = 10^{-3}$ М);

Измерения проводились на спектрофотометре UNIKON 943 Double Beam UV/VIS. Фотография прибора представлена в Приложении Б.1.

Приготовление рабочих растворов:

Рабочие растворы готовили следующим образом:

- Навеску ФМН массой 0,0015 г растворяли в 5 мл дистиллированной воды;
- НАДН массой 0,003 г растворяли в 10 мл буфера.

Измерение активности NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы

Измерение активности фермента проводили для контрольных и радиоактивных образцов: 10 удельных радиоактивностей НТО (0.0002, 0.002, 0.02, 0.2, 2, 10, 20, 50, 100 и 200 МБк/л) в 5 повторностях. Для каждого измерения готовилась новая реакционная смесь, и на начальном этапе воздействия трития (при времени реакции, равной 0), проводили измерение. В течение 5 мин прописывали зависимость оптической плотности реакционной смеси на длине волны 340 нм (максимум поглощения НАДН). Константа спада активности фермента определялась по встроенной программе как коэффициент в экспоненциальной зависимости оптической плотности от времени. Достоверность определения контролировалась по величине коэффициента аппроксимации (детерминации) R^2 , который находился в интервале 0,9799 - 0,9892.

Ферментативную реакцию запускали раствором ФМН.

Для исследования влияния НТО на активность фермента NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы использовали раствор НТО радиоактивностью 0.0002, 0.2, 10 и 200 МБк/л. Измерения проводили в течение 5 минут на длине волны 340 нм (пик поглощения НАДН). Максимальное время реакции – 2 часа, максимальная доза – 0,03 Гр.

Эксперимент продолжался в течение 3 дней, каждый день готовился новый раствор.

Для оценки влияния НТО на активность оксидоредуктазы оценивали выход квантов в реакции в контрольных и всех радиоактивных образцах Q^{rel} . Для этого в условных единицах оценивали площадь под кинетическими кривыми (Приложение А.2) и рассчитывали величину Q^{rel} по формуле (2.1).

Величины Q^{rel} были рассчитаны как для реакции оксидоредуктазы (моноферментная система), так и для биферментной системы сопряженных ферментативных реакций, катализируемых бактериальной люциферазой и NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазой. Во втором случае использовали экспериментальные данные, полученные ранее Селивановой М.А. [1].

2.2 Определение содержания активных форм кислорода хемилюминесцентным люминольным методом в ферментативных системах

Для определения содержания АФК в реакции, катализируемой NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазой, был использован хемилюминесцентный люминольный метод.

Измерения проводились на планшетном люминометре Thermo Scientific Luminoskan Ascent. Фотография прибора представлена в Приложении В.1. В ходе эксперимента была использована следующая реакционная смесь:

Контрольный образец:

1. 15 мкл раствора NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы в буфере;
2. 90 мкл 0,02 М калий-фосфатного буфера (рН 6,8);
3. 17 мкл растворенного в воде ФМН ($C = 10^{-4}$ М);
4. 7 мкл НАДН, растворенный в буфере ($C = 10^{-3}$ М);
5. 135 мкл растворенного в воде люминола ($C = 10^{-4}$ М);
6. 75 мкл растворенного в воде $K_3[Fe(CN)_6]$ ($C = 10^{-3}$ М).

Радиоактивный образец:

1. 15 мкл раствора NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы в буфере;
2. 90 мкл НТО (3 радиоактивности);
3. 17 мкл растворенного в воде ФМН ($C = 10^{-4}$ М);
4. 7 мкл НАДН, растворенный в буфере ($C = 10^{-3}$ М);
5. 135 мкл растворенного в воде люминола ($C = 10^{-4}$ М);

б. 75 мкл растворенного в воде $K_3[Fe(CN)_6]$ ($C = 10^{-3} M$).

Общий объем ячейки составлял 350 мкл.

На каждый ряд микропланшета были распределены 4 образца по 3 повторности: контроль и 3 радиоактивных образца ($A = 0,0002$ МБк/л; 2 МБк/л и 200 МБк/л).

Общее время эксперимента составило 2 часа, измерения проводились каждые 15 минут (1 ряд на 1 измерение).

Реакцию запускали непосредственно перед каждым измерением люминолом и феррицианидом калия (III) при помощи инъекторной системы.

3. Результаты и обсуждения

Страницы 31-40 изъяты в связи с авторскими правами

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Не выявлено значительного эффекта трития на реакцию бактериальной люциферазы; активация люминесценции не превышала 20% и не зависела от радиоактивности среды и времени воздействия. Сравнение с аналогичными воздействиями на биферментную систему и бактерии указывает на то, что бактериальная люцифераза не ответственна за изменение интенсивности билюминесценции этих тестовых систем под действием трития.
2. Показано, что тритий увеличивает (до 230%) активность редуктазы на начальной стадии реакции и уменьшает ее на конечной стадии. Это указывает на то, что именно данный фермент может быть ответственен за изменение интенсивности билюминесценции биферментной системы и бактерий под действием трития.
3. Показано, что тритий не изменяет заметным образом содержания АФК в ходе реакции редуктазы, что указывает на то, что АФК не участвуют в изменении активности этого фермента под действием трития.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

НАДН – никотинамиддинуклеотид;

НАД(Ф)Н – никотинамиддинуклеотидфосфат;

ФМН – флавинмононуклеотид;

ФМН·Н₂ – флавинмононуклеотид восстановленный;

АФК – активные формы кислорода.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. M.A. Selivanova, O.A. Mogilnaya, G.A. Badun, G.A. Vydryakova, A.M. Kuznetsov, N.S. Kudryasheva. Effect of tritium on luminous marine bacteria and enzyme reactions. *Journal of Environmental Radioactivity*, 2013, V.130. - P. 19-25.
2. T.V. Rozhko, E.I. Nogovitsyna, G.A. Badun, A.N. Lukyanchuk, N.S. Kudryasheva. Reactive Oxygen Species and low-dose effects of tritium on bacterial cells. *Journal of Environmental Radioactivity*, 2019, V.130. - P. 19-25.
3. Hastings J.W. In *Cell Physiology*. Ed. 3. New York: Academic Press, 2004. P.1115
4. Lee J., Wang Y., Gibson G. Electronic excitation transfer in the complex of lumazine protein with bacterial bioluminescence intermediates // *Biochemistry*. 1991. V.30. P.6825-6835
5. Н.С. Кудряшева, В.А. Кратасюк, Е.Н. Есимбекова. Физико-химические основы биолюминесцентного анализа. 2002.
6. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. Пер. с англ. – М.: Мир, 1986, - 496 с., ил. С. 13-14.
7. Гардт М.В. Изучение влияния трития на биолюминесцентную реакцию бактериальной люциферазы. Материалы XXV Всероссийской научной конференции студентов-физиков и молодых ученых, Севастополь, 19-26 апреля 2019, С. 448.
8. Кузнецов А.М., Родичева Э.К., Шилова Е.В. Биотест, основанный на лиофилизированных бактериях // *Биотехнология*. 1996. Т.9. С.57-61.
9. Кратасюк В.А. Люциферазное биотестирование: биофизические основы, методы и применение:...дисс. док. биол. наук. Красноярск, 1994. 377 с
10. Спитковский Д.М. О некоторых новых биофизических и биологических аспектах механизмов при воздействии «малых» и близких к ним доз ионизирующих излучений (низких ЛПЭ) на клетки эукариот // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 1999. Т.39. № 1. С.145-155.

11. Спитковский Д.М., Кузьмина И.В. Теоретические и экспериментальные подходы к проблеме индуцируемых адаптирующими дозами ионизирующей радиации изменений функциональных возможностей клеток // Радиационная биология. Радиоэкология. 2001. Т. 41. № 5. С.599.
12. Kratasyuk V.A. Principle of luciferase biotesting // World Scientific Publishing Co., Singapore. 1990. P.550-558.
13. Su L., Jia W., Hou C., Lei Y. Microbial biosensors: a review // Biosensors and Bioelectronics. 2011. V.26. N.5. P.1788-1799.
14. Кратасюк В.А., Гительзон И.И. Использование светящихся бактерий в биолюминесцентном анализе // Успехи микробиологии. 1987. №21. С.3-30.
15. Bulich A.A., Isenberg D.Z. Use of the luminescent bacterial system for the rapid assessment of aquatic toxicity // Instrum. Soc. Am. Trans. 1981. V.20. N.1. P. 29-33.
16. Stom D.I., Gill T.A., Balayn A.E., Shahova O.I. Bioluminescent method in studying the complex effect of sewage components // Arch. Environ. Toxicol. 1992. V.22. P.202-203.
17. Kudryasheva N. S., Nemtseva E.V., Sizykh A.G., Kratasyuk V.A., Visser A.J.W.G. J. Estimation of energy of the upper electron-excited states of the bacterial bioluminescent emitter // Photochem. Photobiol.: B. 2002. V.68. N.2-3. P.88-92.
18. Kudryasheva N. S., Nemtseva E.V., Visser A. J. W. G., van Hoek A. Interaction of aromatic compounds with Photobacterium leiognathi luciferase: fluorescence anisotropy study // Luminescence. 2003. V. 18. N.3 P.156-161.
19. Ветрова Е.В. Механизмы действия редокс-активных соединений на биолюминесцентную систему НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза – люцифераза. Автореф. ... дис. канд. биологических наук. Красноярск, 2002. 20с.
20. Федорова Е.С. Биолюминесцентный мониторинг процессов детоксикации растворов органических соединений: Автореф. дис.:... канд. биол. наук. Пущино, 2011. 21 с.

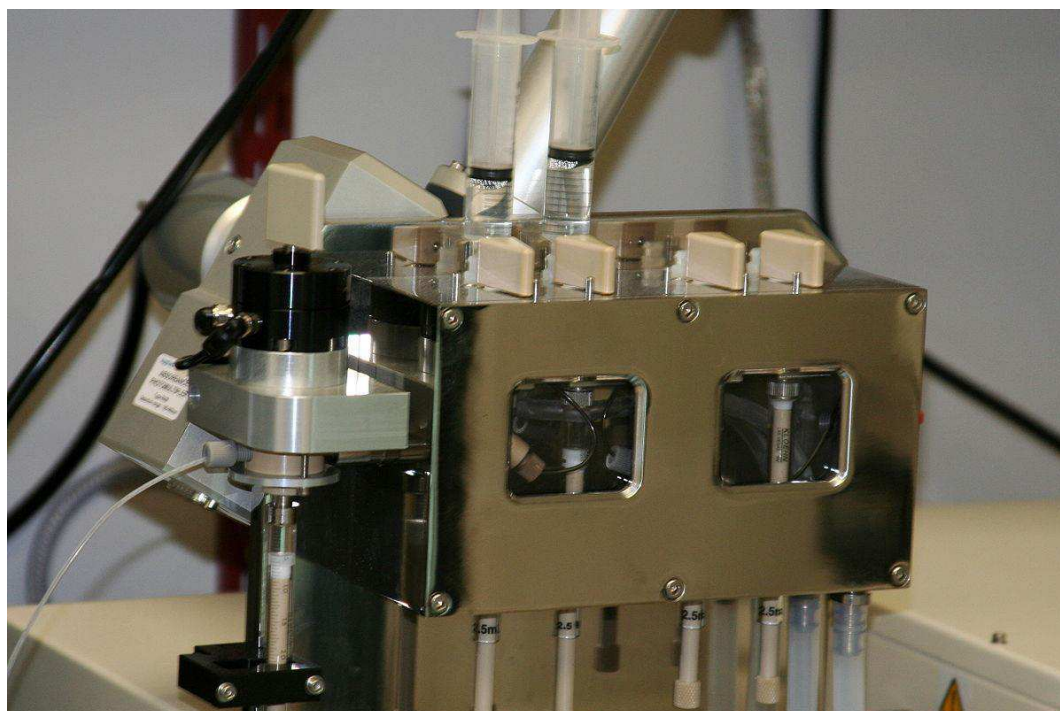
21. Петушков В.Н., Кратасюк В.А., Фиш А.М., Гительзон И.И. Способ определения активности протеаз / Авт.свид. № 1027615, опубл.07.07.83, Бюлл. № 25. С.159.
22. Прокопишко Ю.В. Моделирование нестационарной кинетики биолюминесцентной реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, в присутствии краудинг-агента фикола. – 2018. – С.6-9,18-21,23.
23. Surdhar P. S. et al. The reduction of lumiflavin by EDTA radicals and evidence for association of EDTA with flavinsemiquinone //International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part C. Radiation Physics and Chemistry. – 1988. – Т. 32. – №. 1. – С. 15-21.
24. Prasad D. R., Mandal K., Hoffman M. Z. Solution medium control of the Ru (bpy) 3 2+/methyl viologen/EDTA photochemical system //Coordination Chemistry Reviews. – 1985. – Т. 64. – С. 175-190.
25. Enns K., Burgess W. H. The Photochemical Oxidation of Ethylenediaminetetraacetic Acid and Methionine by Riboflavin1 //Journal of the American Chemical Society. – 1965. – Т. 87. – №. 24. – С. 5766-5770.
26. Flavoenzymes, 1, CRC Press, Boca Raton, FL, 1991, p. 171. (1982)
27. N.S. Kudryasheva, T.V. Rozhko Effect of low-dose ionizing radiation on luminous marine bacteria: radiation hormesis and toxicity. J. Environ. Radioact., 2015, 142, 68-77
28. Гительзон И.И., Кратасюк В.А., Лопатин В.Н., Тихомиров А.А., Щур Л.А., Филимонов В.С. Экологическая биофизика: Учебное пособие в 3 т. М.: Логос, 2002. 127с.
29. Girotti S., Ferri E. N., Fumo M. G., Maiolini E. Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria // Anal.Chim.Acta. 2008. V. 608. N. 1. P.2-29.
30. Roda A., Pasini P., Mirasoni M., Michchelini E., Guardigli M. Biotechnological application of bioluminescence and chemiluminescence // Trends Biotechnol. 2004. V.22. N.4. P.295-303.

31. 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.
32. Calabrese E.J., Baldwin L.A. The frequency of U-shaped dose responses in the toxicological literature // *Toxicol. Sci.* 2001. V.62. P. 330-338.
33. Kaiser J. Hormesis: Sipping From a Poisoned Chalice // *Science*. 2003. V. 302. P.376-379.
34. Heinz G.H., Hoffman D.J., Klimstra J.D., Stebbins K.R. Enhanced Reproduction in Mallards Fed a Low Level of Methylmercury: An Apparent Case of Hormesis // *Environ. Toxicol. Chem.* 2010. V. 29. P.650-653.
35. Yu B., Edstrom W.C., Benach J. et al. Crystal structures of catalytic complexes of the oxidative DNA/RNA repair enzyme AlkB // *Nature*. 2006. V.439. P.879–884.
36. Пахомова В.М. Основные положения современной теории стресса и неспецифический адаптационный синдром у растений // *Цитология*. 1995. Т.37. № 1. С.66-91.
37. Selye H. Changing distress into eustress: Hans Selye voices theories on stress // *Tex. Med.* 1980. V.76. P.78-80.
38. Kimizuka H., Koketsu K. Ion transport through cell membrane // *J. Theor. Biol.* 1964. V.6. N.2. P.290-305.
39. Albers R.W. Biochemical Aspects of Active Transport // *Biochemistry*. 1967. V. 36. P. 727-756.
40. Мурзова О.Е. Совместное воздействие трития и гуминовых веществ на биoluminesценцию ферментативной системы : бакалаврская работа : 03.03.02 / Мурзова Ольга Евгеньевна. – Красноярск, 2019. - 48 с.
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. 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

44. 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.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1



Приложение А.1 – Спектрофотометр Stopped-Flow

(

Р



Приложение Б.1 – Спектрофотометр UNIKON 943 Double Beam UV/VIS

Н
39

Р

Е



Приложение В.1 – Планшетный люминометр Thermo Scientific Luminoskan Ascent
(Режим доступа: http://thermoscientific-lab.ru/luminoskan_ascent)

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Страница 50 изъята в связи с авторскими правами

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/

«24» июня 2020 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

Активность ферментов люминесцентных бактерий в присутствии трития

03.03.02 Физика

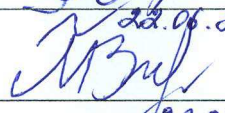
Научные руководители:  д-р физ.-мат. наук Н.С. Кудряшева

22.06.2020

 канд. биол. наук Т.В. Рожко

22.06.2020

Выпускник



М.В. Гардт

22.06.2020

Красноярск 2020