

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр
Сибирского отделения Российской академии наук»

На правах рукописи



Колесник Ольга Владиславовна

**МОДИФИКАЦИЯ ЭФФЕКТОВ РАДИОНУКЛИДОВ ГУМИНОВЫМИ
ВЕЩЕСТВАМИ И ФУЛЛЕРЕНОЛОМ. БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ
МОНИТОРИНГ**

1.5.2. Биофизика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор физико-математических наук, профессор,
Кудряшева Надежда Степановна

Красноярск – 2026

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Глава 1 Обзор литературы.....	12
1.1 Радиоактивное излучение и его источники.....	12
1.1.1 Типы источников ионизирующего излучения.....	12
1.1.2 Торий.....	15
1.1.3 Тритий.....	16
1.1.4 Биологические эффекты ионизирующего излучения. Радиолиз воды	17
1.1.5 Радиационный гормезис.....	22
1.2 Радиопротекторы. Свойства и применение	24
1.2.1 Гуминовые вещества	26
1.2.2 Производные фуллеренов – фуллеренолы.....	29
1.3 Хемилюминесцентные процессы и их использование	32
1.4 Способы оценки токсичности сред. Биотестирование и экологический мониторинг	35
1.5 Использование билюминесцентных систем для биотестирования	37
1.5.1 Люминесцентные бактерии <i>Photobacterium phosphoreum</i>	39
1.5.2 Билюминесцентная система сопряженных ферментативных реакций.....	41
Глава 2 Материалы и методы исследования	43
2.1 Реактивы и материалы.....	43
2.1.1 Используемые реактивы	43
2.1.2 Используемое оборудование	44
2.2 Регистрация билюминесценции	45
2.2.1 Интактные бактерии	45

2.2.2 Лиофилизированные бактерии	46
2.2.3 Биолюминесцентная биферментная система.....	48
2.3 Хемилюминесцентный люминольный метод	50
2.4 Измерение скорости окисления НАДН в растворах различного состава в присутствии и в отсутствие Th-232.....	53
2.5 Исследование воздействия трития в отсутствие и в присутствии гуминовых веществ на клетки крови кроликов	54
2.6 Статистическая обработка результатов.....	55
Глава 3 Результаты и их обсуждение.....	56
3.1 Воздействие нитрата тория-232 на интенсивность биолюминесценции морских бактерий в отсутствие и в присутствии потенциальных радиопротекторов.....	56
3.1.1 Воздействие нитрата тория-232 на люминесцентные морские бактерии	56
3.1.2 Воздействие нитрата тория-232 на бактериальные ферменты	59
3.1.3 Изучение радиопротекторной активности гуминовых веществ и фуллеренола в растворах нитрата тория-232	60
3.1.3 Изучение радиопротекторной активности фуллеренола в растворах нитрата тория-232	63
3.2 Влияние радионуклида трития на интенсивность биолюминесценции морских бактерий в отсутствие и в присутствии потенциальных радиопротекторов.....	64
3.2.1 Воздействие трития на интенсивность биолюминесценции и содержание активных форм кислорода	64
3.2.2 Радиопротекторная активность гуминовых веществ в тритиевой воде	66
3.2.3 Радиопротекторная активность фуллеренола в тритиевой воде	69

3.3	Возможность прогнозирования низкодозовых воздействий трития на клеточные процессы высших организмов на основе бактериального биотеста .	72
3.3.1	Сравнение эффектов трития на интенсивность биолюминесценции бактерий и фагоцитарную активность лейкоцитов кроликов	72
3.3.2	Сравнение радиопротекторной активности гуминовых веществ в отношении клеток бактерий и лейкоцитов кроликов	74
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	76
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	78
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	79
	ПРИЛОЖЕНИЕ А	105
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ к приложению А	108

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Широкое распространение низкоактивных радиоактивных загрязнений стало серьезным вызовом современности. Радиоактивное излучение характеризуется как продолжительностью воздействия радионуклидов, так и их концентрацией (или удельной радиоактивностью) в случае излучения альфа- и бета-типа или мощностью дозы гамма-излучения.

Чувствительность организмов к низкоинтенсивному радиационному воздействию недостаточно изучена, поэтому представляет в настоящее время особый интерес.

Известно, что присутствие некоторых веществ в окружающей среде может оказывать радиомодифицирующее действие на организмы: они могут как снижать, так и интенсифицировать отклики организмов на радиационное воздействие, т.е. оказывать радиопротекторное или радиосенсибилизирующее действие. Радиопротекторы и радиосенсибилизаторы могут иметь как искусственное, так и естественное происхождение, и их использование чрезвычайно перспективно для медицины и экологии.

Молекулярные механизмы биологических откликов на низкодозовое облучение в присутствии радиомодификаторов представляют практический интерес; выявленные закономерности воздействий позволяют прогнозировать реакцию живых организмов на низкоинтенсивное излучение на больших территориях после ядерных аварий, сбросов атомных станций или подземных горных работ. К молекулярным механизмам низкодозовых эффектов относятся процессы, связанные с активными формами кислорода (АФК), которые могут возникать в результате радиолиза воды в присутствии растворенного молекулярного кислорода, а также являться продуктом более сложных процессов, связанных с жизнедеятельностью организмов в условиях радиационного воздействия.

Для мониторинга радиационной токсичности в сложных многокомпонентных средах оптимальным является биотест, основанный на люминесцентных морских бактериях. В качестве тестируемого параметра используется интенсивность биолюминесценции. Преимуществами биотеста являются высокая чувствительность, простота, высокая скорость проведения анализа (1–3 мин), доступность приборов для регистрации токсичности. Эти преимущества обеспечивают возможность проведения многочисленных анализов и оптимальной статистической обработки, что важно для изучения эффектов низких доз, которые, как известно, характеризуются стохастичностью.

Степень разработанности темы исследования. Биолюминесцентный бактериальный биотест уже более 50 лет используется для мониторинга токсичности различных сред. Первое описание биотеста с использованием люминесцентных бактерий появилось в 1969 году в работе Косслера. Интенсивно ведутся исследования механизмов биолюминесценции и её применения; большая группа ученых работает в Красноярске с середины 70-х. Проводятся исследования закономерностей воздействия экзогенных соединений на биолюминесценцию бактерий и выделенные из них ферментативные системы (В. А. Кратасюк и коллеги; Е. Н. Есимбекова и коллеги, Н. С. Кудряшева и коллеги).

Изучение радиобиологических низкодозовых эффектов особенно активно началось с 70-х годов. Так, воздействие низкодозового излучения исследуется в России в таких организациях, как Институт биохимической физики им. Эмануэля (Е. Б. Бурлакова и коллеги), Федеральный научный центр гигиены имени Ф. Ф. Эрисмана (Л. С. Бондарева и коллеги), Уральский научно-практический центр радиационной медицины (Е. А. Блинова и коллеги; Ю. Р. Ахмадулина и коллеги), Красноярский государственный аграрный университет (А. С. Федотова и коллеги). Из зарубежных центров можно выделить Дюссельдорфский университет имени Генриха Гейне, Германия (Л. Е. Файнендеген и коллеги), Университет Мак-Мастер, Канада (К. Мазерсилл и коллеги), включая работы по воздействию на микроорганизмы (Дж. Г. Пол и коллеги, А. Томак и коллеги, Е.-Р. Джо и коллеги, Н. Мескита и коллеги, М. Ксавье и коллеги). Радиобиологические эффекты принято

связывать с включением активных форм кислорода и азота в сложные физико-химические и биохимические циклы (Э. Аззам и коллеги, В. И. Брусков и коллеги).

Ведутся исследования радиомодифицирующих свойств веществ природного и искусственного происхождения; выявляются вещества, способные эффективно предотвращать или снижать повреждения на клеточном уровне. В ряде исследований показана перспективность использования гуминовых веществ в качестве радиопротекторных агентов природного происхождения (И. В. Перминова и коллеги, Е. Липчинская-Кочаны и коллеги, Р. Клекинг и коллеги). Представляет интерес изучение и сравнение радиомодифицирующих свойств перспективных нанообъектов искусственного происхождения – фуллеренолов. Продемонстрированы их радиопротекторные свойства (Я. Грабовский и коллеги, С. В. Гудков и коллеги, В. А. Шилин и коллеги), а также выявлены и детально изучены антиоксидантные характеристики рядов фуллеренолов (Е. С. Сушко и коллеги, А. С. Сачкова и коллеги).

К настоящему времени сформировалась возможность характеристики радиопротекторной активности соединений с помощью клеточного бактериального биотеста, а также анализа молекулярных механизмов радиопротекции, связанных с активностью АФК и скоростями ферментативных процессов. Кроме того, чрезвычайно важна возможность использования результатов экспрессного клеточного биотеста для прогнозирования отклика высших организмов на воздействие радионуклидов в присутствии радиопротекторов.

В данной работе в качестве радиопротектора природного происхождения выбраны гуминовые вещества, а искусственного происхождения – фуллеренол. Оба соединения являются биологически активными углеродными наноструктурами. Исследования проводились в растворах альфа- и бета-излучающих радионуклидов (тория-232 и трития) низкой удельной радиоактивности. В качестве клеточного биотеста использованы люминесцентные морские бактерии, а высшего организма – кролики.

Цель работы: выявить и охарактеризовать радиопротекторные свойства гуминовых веществ и фуллеренола с помощью бактериальной биолюминесцентной тест-системы в условиях низкоинтенсивного радиационного воздействия.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Охарактеризовать радиомодифицирующие свойства гуминовых веществ и фуллеренола в растворах альфа- и бета-излучающих радионуклидов (тория-232 и трития) с помощью бактериального биолюминесцентного биотеста;
2. Выявить связь интенсивности биолюминесценции и содержания АФК в бактериальных суспензиях в присутствии трития и гуминовых веществ;
3. Продемонстрировать возможность использования бактериального биотеста в целях прогнозирования низкодозовых эффектов трития и радиопротекторной активности гуминовых веществ для клеточных процессов в высших организмах (на примере кроликов).

Научная новизна. Исследование направлено на выявление молекулярных механизмов низкоинтенсивных радиационных воздействий в условиях варьирования молекулярного окружения клеточного организма, что чрезвычайно актуально для экологических мероприятий и медицины. С помощью биолюминесцентного клеточного биотеста изучены радиопротекторные свойства нанообъектов природного (гуминовые вещества) и искусственного (фуллеренол) происхождения. Продемонстрирована роль активных форм кислорода и ферментативных процессов в биоэффектах тория-232 и трития в отсутствие и в присутствии потенциальных радиопротекторов. Показана принципиальная возможность использования модельного клеточного организма (люминесцентных бактерий) для прогнозирования результатов воздействий низкодозовой радиации и выявления радиомодифицирующей активности биологически-активных соединений для высших организмов.

Теоретическая и практическая значимость работы. С теоретической точки зрения, изучение роли АФК и ферментативных процессов способствует пониманию молекулярных механизмов воздействия радиации на биологические системы, а также формирует основу для прогнозирования результатов таких

воздействий. Особо значимым является понимание молекулярных механизмов воздействия радиации при варьировании молекулярного окружения живых клеток. С практической стороны, эти данные служат базой для разработки эффективных методов радиомодификации и управления последствиями радиационных воздействий, что особенно актуально в условиях роста низкоинтенсивных радиоактивных загрязнений окружающей среды. Практическую значимость имеет также продемонстрированная возможность использования результатов экспрессного бактериального биотеста для прогнозирования воздействия субклинических доз радиации на высшие организмы.

Положения, выносимые на защиту:

1. Активация и ингибирование биолюминесценции бактерий при низкодозовом воздействии тория-232 и трития сопровождаются изменением содержания АФК как в присутствии, так и в отсутствие радиомодификаторов;
2. Гуминовые вещества и фуллеренол нейтрализуют как активирующее, так и ингибирующее действие трития на бактерии;
3. Отклики клеток бактерий и высшего организма (т.е. интенсивность биолюминесценции и фагоцитарная активность клеток крови кроликов) на низкодозовое воздействие трития и гуминовых веществ аналогичны.

Достоверность полученных результатов подтверждена достаточным объемом данных, их воспроизводимостью, а также использованием современных методов исследования и статистического анализа при проведении научной работы.

Апробация работы. Основные результаты работы представлены на российских и международных конференциях: 10-ой встрече молодых ученых-экологов SETAC Europe (онлайн, 2021); Междисциплинарной конференции молодых учёных ФИЦ КНЦ СО РАН (КМУ-XXIV) (Красноярск, Россия, 2021); Международной сателлитной конференции «Экологический мониторинг. Методы и подходы» (Красноярск, Россия, 2021); Междисциплинарной конференции молодых учёных ФИЦ КНЦ СО РАН (КМУ-XXV) (Красноярск, Россия, 2022); Междисциплинарной конференции молодых учёных ФИЦ КНЦ СО РАН (КМУ-XXVI) (Красноярск, Россия, 2023); XIX Международной конференции студентов,

аспирантов и молодых учёных «Перспектив Свободный – 2023» (Красноярск, Россия, 2023); Международной научно-практической конференции «Радиобиология и экологическая безопасность – 2023» (Гомель, Республика Беларусь, 2023); Международной научно-практической конференции «Здоровье и окружающая среда» (Минск, Республика Беларусь, 2024); VIII Международной научно-практической конференции «Хроническое радиационное воздействие: медико-биологические эффекты малых доз» (Челябинск, Россия, 2025); XI Российской конференции «Радиохимия-2025 (Красноярск, Россия, 2025)».

Работа была выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда №23-26-10018 «Прогнозирование реакции сельскохозяйственных животных на низкоинтенсивную радиацию и применение радиопротекторов. Экспрессный биолюминесцентный скрининг радиобиологических эффектов» (2023–2024, исполнитель).

Работа удостоена диплома II степени за победу на Всероссийском Конкурсе научно-исследовательских проектов «Шаг в будущее : результаты научных исследований» в номинации «Результаты научных исследований в области экологии» (Елец, Россия, 2021), премии Фонда Осаму Шимомуры за успешное исследование в области биолюминесценции (Красноярск, Россия, 2023 г.), победы III Всероссийского Конкурса «К вершинам науки» по направлению «Результаты научных исследований в области химии и фармакологии» (Елец, Россия, 2024).

Публикации. По результатам исследований опубликовано 26 работ, из них 5 статей, входящих в базы Scopus и Web of Science, ВАК, Белый список, 21 публикация в сборниках докладов научных конференций.

Личный вклад автора заключается в планировании экспериментов, обработке и интерпретации полученных результатов, их обсуждении, сопоставлении полученных данных с литературными. Все экспериментальные исследования, включенные в диссертационную работу, выполнены лично либо при непосредственном участии автора. Результаты исследования были представлены лично автором в виде устных и стендовых докладов на международных конференциях, автор также принимал основное участие в подготовке статей и

тезисов к публикации. Часть экспериментальных результатов была получена совместно с Федотовой А. С., Жигаревым А. А., Лапиной М. А., Соловьёвым В. С. и Грабовым А. С. В обсуждении результатов участвовали Бадун Г. А. и Стом Д. И. Вклад соавторов отражен в публикациях. Автор благодарит всех коллег за участие в совместных исследованиях и в обсуждении результатов.

Структура и объем работы. Диссертационная работа включает введение, обзор литературы, описание методов исследования, главу с изложением результатов работы, заключение, список сокращений и условных обозначений, список литературы и приложение. Работа изложена на 108 страницах машинописного текста, проиллюстрирована 1 таблицей и 25 рисунками. Библиография включает 251 источник.

Глава 1 Обзор литературы

1.1 Радиоактивное излучение и его источники

1.1.1 Типы источников ионизирующего излучения

Ионизирующее излучение является одним из внешних факторов воздействия окружающей среды, который сопровождает Землю с самого ее зарождения. Ионизирующее излучение представляет собой результат ядерных превращений, проявляющийся в виде потока частиц и электромагнитных волн. Эти потоки характеризуются энергией, достаточной для возбуждения электрона и его выхода из атома с образованием ионов. Ионизирующее излучение, являясь внешним фактором, воздействует на окружающую среду, изменяя свойства организмов [1–5].

По физической природе различают два основных типа ионизирующего излучения: корпускулярное излучение, состоящее из заряженных частиц, таких как альфа- и бета-частицы, нейтроны и электроны, и электромагнитное излучение, включающее рентгеновское и гамма-излучение. Их обнаружение возможно только через их взаимодействие с веществом, вызывающего изменения в этом веществе [6].

Альфа-излучение – это поток положительно заряженных альфа-частиц, состоящих из двух протонов и двух нейтронов. Масса альфа-частиц на 4 порядка превышает массу электрона, из-за чего они достаточно легко взаимодействуют со средами, с которыми сталкиваются. В природе альфа-частицы образуются в результате распада атомов тяжелых элементов, таких как уран, торий и радий, называемых «родительским рядом». Численное значение проникающей способности альфа-частицы соответствует ионизационному следу заряженной частицы – длине ее трека с момента испускания до полной стабилизации [7–9].

Альфа-частицы имеют сравнительно небольшой пробег: в воздушной среде он может достигать 10 см, в биологических тканях – порядка 0,1–1 мм [10; 11], в связи с чем внешнее облучение альфа-частицами не представляет существенной угрозы для живых организмов. В качестве примера можно рассмотреть пробег

альфа-частиц, испускаемых радионуклидом ^{241}Am с энергией 5,5 МэВ, представленный на Рисунке 1.1. В диапазоне 4 см не наблюдается резкого снижения количества альфа-частиц в сухом воздухе при нормальных условиях.

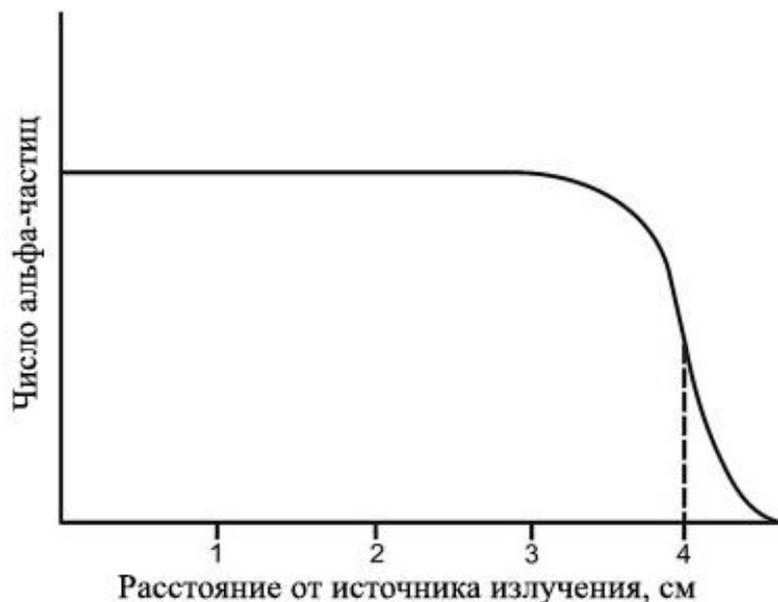


Рисунок 1.1 – Пробег альфа-частиц с энергией 5,5 МэВ в воздухе.

Адаптировано из [12]

Альфа-частицы не могут проникнуть через внешний слой омертвевшей кожи и, следовательно, представляют небольшую радиологическую опасность. Однако при вдыхании или проглатывании альфа-излучатели могут нанести серьезный вред внутренним тканям – высокая плотность ионизации вдоль трека заряженной частицы приводит к сильным повреждениям молекул живых клеток. Так, на одном миллиметре пути альфа-частицы в воздушной среде образуется свыше 5000 ионных пар [11; 12].

Бета излучение – это поток бета-частиц – электронов или позитронов, возникающих в результате радиоактивного распада ядер атомов и распространяющихся со скоростью, близкой к скорости света. Испускаемые частицы обладают более высокой проникающей способностью (в воздухе радиус действия бета-частицы составляет $\sim 3,6$ м при энергии 1 МэВ), однако по сравнению с альфа-излучением, оно обычно обладает более низкой ионизирующей

способностью [13; 14]. Бета-излучение представляет опасность как при внешнем, так и при внутреннем облучении [15; 16].

Нейтронное излучение представляет собой форму ионизирующего излучения, состоящего из свободных нейтронов [17]. Нейтронное излучение редко возникает при естественном распаде атомных ядер – обычно его производят искусственно. Основными источниками нейтронного излучения являются ядерные реакторы, ускорители частиц и радиоизотопные источники. В природе оно возникает главным образом при спонтанном делении тяжёлых ядер или под действием космических лучей. По причине отсутствия заряда, для нейтронов характерна высокая проникающая способность и слабое взаимодействие с окружающим веществом. Свободное состояние нейтрона всегда очень быстро заканчивается его захватом или другой ядерной реакцией. Для защиты от него используют материалы, содержащие лёгкие элементы – воду, парафин или полиэтилен, которые эффективно замедляют нейтроны [18; 19].

Рентгеновское излучение – электромагнитное излучение с низкой длиной волны (10^{-2} – 10^{-3} нм), которое возникает при воздействии на вещество потоком электронов. Оно характеризуется большой проникающей способностью. Рентгеновские лучи могут возникать в рентгеновских трубках, электронных микроскопах, мощных генераторах, выпрямительных лампах, электронно-лучевых трубках и других [20–22].

Гамма-излучение – коротковолновое (10^{-3} – 10^{-6} нм) электромагнитное излучение, возникающее при переходах между возбуждёнными состояниями атомных ядер, при ядерных реакциях, при взаимодействиях и распадах элементарных частиц. Гамма-лучи характеризуются очень высокой проникающей способностью: помимо того, что они могут пройти через слой воздуха толщиной несколько сотен метров, они также способны пройти насквозь человеческое тело без заметных потерь энергии. Гамма-излучение имеет малое ионизирующее действие (в среднем на один сантиметр пробега образуется несколько пар ионов) [22].

1.1.2 Торий

Торий-232 – природный альфа-излучатель и один из наиболее распространенных радиоактивных элементов в природных экосистемах [23]. В природе торий встречается в виде мягкого серебристо-белого металла; присутствует в следовых количествах в природных фосфатах, полиоксидах и силикатах. Торий широко используется в различных производствах: от топлива для городских тепловых электростанций до линз для камер и телескопов. В настоящее время торий привлекает к себе внимание из-за перспектив его применения в качестве относительно чистого, безопасного и широко распространенного ядерного топлива [24; 25].

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 источник альфа-излучения (период полураспада – $1,4 \cdot 10^{10}$ лет); родоначальник радиоактивного семейства тория; второй изотоп – торий-228, находящийся в равновесии с торием-232, также является альфа-излучателем с периодом полураспада 1,91 года [26].

Радиоактивный ряд тория-232, представленный на Рисунке 1.2, включает 10 основных стадий распада – 6 стадий альфа-распада (α) и 4 стадии бета-распада (β). Массовое число каждого образуемого нуклида всегда кратно 4.

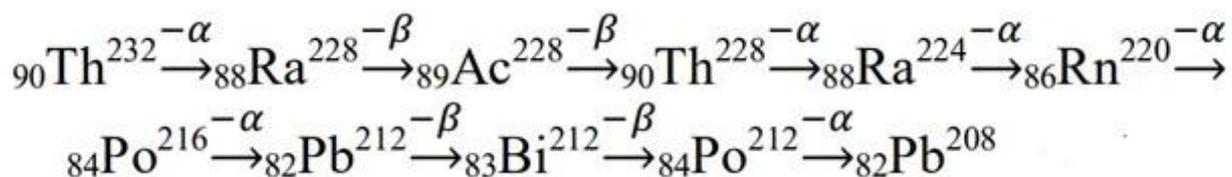


Рисунок 1.2 – Радиоактивный ряд тория-232 [25]

Поскольку торий присутствует в воде и почве, живые организмы постоянно подвергаются воздействию малых доз тория, попадающего в организм путем

проглатывания, проникновения через кожные покровы. Радионуклид имеет тенденцию к накоплению в живых объектах [27]. Уже сейчас существуют большие площади, загрязненные торием, который может оказывать пагубное воздействие в течение многих десятилетий. Поэтому актуальным является изучение низкодозовых воздействий тория на живые объекты и их модификация в различных условиях окружающей среды.

1.1.3 Тритий

Тритий (^3H) представляет собой низкоэнергетический (средняя энергия распада – 5,7 кэВ, максимальная – 18,6 кэВ) радиоактивный изотоп водорода с периодом полураспада 12,26 лет [28; 29]. Он достаточно распространён в окружающей среде в основном в виде тритиевой воды (НТО) [30]. Существует три основных источника трития: естественное образование в верхних слоях атмосферы в результате расщепления нуклидов космическими лучами и реакций захвата частиц азота и кислорода [31]; остаточная активность после испытаний ядерного оружия [32]; распад в ядерном топливном цикле [30]. В настоящее время повышенное внимание вызывает увеличение концентрации трития в водных экосистемах, прилегающих к предприятиям. Это обуславливает необходимость в проведении мониторинга результатов его воздействия, в том числе и низкодозового [28; 29; 33–35].

Высокоэнергетическая хроническая токсичность трития связана с его способностью замещать протий, природный изотоп водорода, в органических соединениях. В процессе радиоактивного распада (1.1) ^3H превращается в ионизированный изотоп гелия (^3He) с испусканием электрона и антинейтрино:



Максимальный пробег β -частиц трития в воздухе составляет 4,5–6 мм при 20°C, а в биологической ткани ~ 1 мкм, поэтому его β -частицы полностью поглощаются роговыми слоями кожи, так что внешнее облучение организма не представляет опасности [36]. Однако наиболее опасно попадание трития в организм через лёгкие или при приеме пищи и воды. Независимо от путей поступления в организм через 2–3 часа наблюдается равномерное распределение НТО в жидкой фазе организма (кровь, моча, выдыхаемые пары воды) [37–39].

Биологическое воздействие трития обуславливается тем, что распад трития запускает цепь переноса заряда за счет образования электрона и чрезвычайно активного иона гелия, который жестко акцептирует электрон из окружающей среды, дополняя свою внешнюю оболочку до устойчивой оболочки инертного газа – гелия. При замещении тритием в организме и последующем его распаде происходит разрыв водородных связей в живых клетках, что приводит к нарушению синтеза органических структур [36; 40; 41]. В результате превращения трития и иона гелия нарушается химическая структура молекул ДНК, белков, ферментов и других жизненно важных компонентов, ответственных за жизнедеятельность живого организма [42; 43]. Ионизация водной среды в присутствии трития часто является определяющим фактором низкодозового воздействия трития.

1.1.4 Биологические эффекты ионизирующего излучения. Радиоллиз воды

Все живые организмы ежедневно подвергаются радиационному облучению. Кроме медицинского облучения, связанного с диагностикой и лечением, человек постоянно подвергается хроническому воздействию фонового излучения – от космических лучей, радиоактивных выбросов предприятий ядерной промышленности, распада радона, а также последствий ядерных испытаний и аварий. Ионизирующее излучение часто обладает достаточной мощностью, чтобы вытеснить электроны из атомов и вызвать разрывы химических связей.

Радиобиологический эффект определяется общей дозой, поэтому реакция организмов на облучение различается в тканях и органах [44; 45].

Воздействие радиации высокой мощности может приводить к частичной или полной утрате функциональности макромолекул. Инактивация макромолекул ионизирующей радиацией может произойти как в результате прямого, так и косвенного воздействия [44].

При прямом воздействии повреждению подвергаются те молекулы, которые непосредственно поглотили энергию излучения [46; 47]. При воздействии радиации на ДНК вызываются повреждения оснований и сахаров в структуре, влияя на биологические функции [48–50]. Митохондриальная ДНК характеризуется менее эффективной репарацией по сравнению с ядерной ДНК и подвергается более серьёзным мутациям от воздействия радиации, что приводит к усугублению окислительного стресса. Помимо этого, митохондриальные мутации могут влиять на кинетику повреждения ДНК, что приводит к долгосрочным последствиям в отношении способности восстанавливать гомеостаз [51].

В случае косвенного воздействия молекула повреждается активными реакционноспособными продуктами, образовавшимися в результате облучения [46; 47]. В случае, если биомолекула находится в водном окружении, как например, в клетках, большая часть энергии будет поглощаться молекулами воды. В таком случае, может быть запущен процесс радиолиза – разложения молекул воды под действием ионизирующего излучения. Вследствие радиолиза в клетке будут образовываться свободные радикалы – высокореакционные молекулы, содержащие неспаренные электроны на внешней электронной оболочке [46; 52]. Часть свободных радикалов рекомбинирует с образованием молекулярных продуктов H_2O_2 , H_2O и H_2 ; некоторые радикалы взаимодействуют с растворёнными органическими молекулами, в результате чего возникают свободные органические радикалы. Возникшие радикалы органических молекул претерпевают внутримолекулярные перестройки, взаимодействуют друг с другом и с окружающими молекулами, в результате чего формируется стабильное

структурное поражение, приводящее к изменению биологических свойств макромолекул [53].

В присутствии молекулярного кислорода в водной среде образуются кислородсодержащие радикалы – активные формы кислорода (АФК) – класс взаимопревращающихся химически-активных, неустойчивых молекул, имеющих в одном из атомов кислорода неспаренный электрон. К группе АФК относятся супероксид-анион ($O_2^{\cdot-}$), пероксид водорода (H_2O_2), гидроксильный радикал (HO^{\cdot}), гидроксид-ион (HO^-), синглетный кислород (O_2^{\cdot}), пероксид-ион (O_2^{2-}) и другие структуры. Они могут реагировать с органическими субстратами и приводить к образованию промежуточных соединений, способных в дальнейшем продуцировать другие формы АФК [54–57].

Согласно современным исследованиям, АФК участвуют в процессах передачи сигналов [58–62]; пионером в этом подходе является Проктор [63]. АФК могут служить в качестве межклеточных и внутриклеточных мессенджеров [64–66]. Активные формы кислорода или азота [67], выделяемые клетками, могут служить сигналами, которые вызывают вызванной радиацией «эффект свидетеля» [68; 69]. Помимо вышеперечисленного, АФК ответственны за пролиферацию, миграцию, дифференцировку и метаболизм [70; 71], а также рассматриваются как стимуляторы клеточного деления [63; 72].

Молекулярный кислород является родоначальником вышеперечисленной группы АФК. Они образуются в ходе последовательных стадий одноэлектронного восстановления, представленного на Рисунке 1.3.

В первой реакции происходит образование супероксид-аниона ($O_2^{\cdot-}$) в ходе захвата молекулой кислорода дополнительного электрона. Супероксид-анион образуется в клетке в процессе жизнедеятельности клетки, а также под действием ферментов (например, НАДФН-оксидазы).

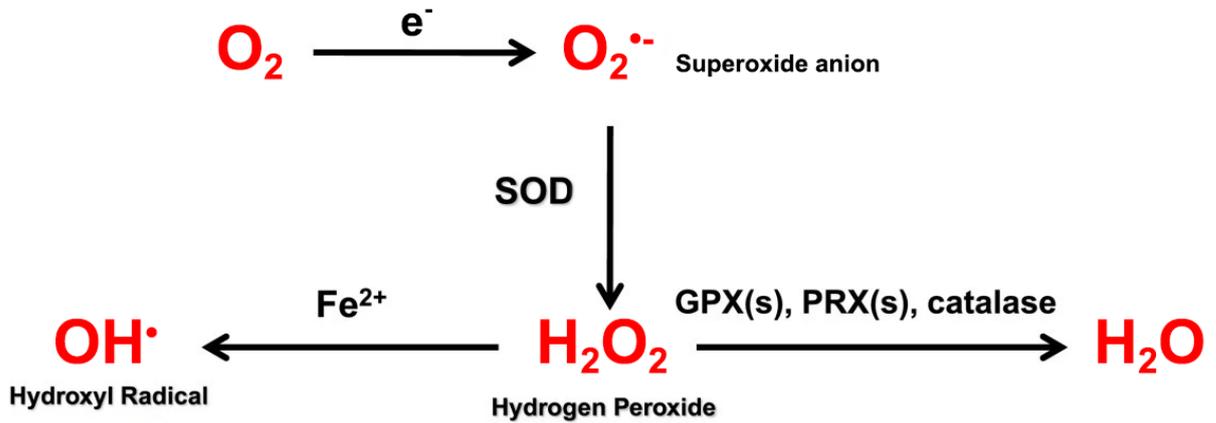


Рисунок 1.3 – Производство и взаимопревращение активных форм кислорода.

SOD – супероксиддисмутаза, GPX(s) – глутатионпероксидазы,

PRX(s) – пероксиредоксины [73]

Затем, фермент супероксиддисмутаза (SOD) преобразует супероксид в молекулу пероксида водорода (H_2O_2). Далее, перекись водорода может быть восстановлена до воды (H_2O) с помощью глутатионпероксидаз (GPXs), пероксиредоксинов (PRXs) или каталазы [73].

Перекись водорода также может реагировать с ионами железа (II) (реакция Фентона) с образованием гидроксильного радикала, который в свою очередь обладает чрезвычайно высокой реакционной способностью. Помимо этого, ионы металла катализируют реакцию синтеза гидроксильного радикала из перекиси водорода и супероксид-аниона (реакция Габера-Вейса). Реакция проходит в клетке с низкой скоростью, однако может вызывать окислительный стресс [54; 73–76].

Все реакции протекают, в частности, в митохондриальной дыхательной цепи, где метаболизируется 85% кислорода и где в небольшом количестве образуются его частично восстановленные интермедиаты [54; 77].

АФК производятся в ходе жизнедеятельности организмов. В качестве примера производства АФК организмами можно рассмотреть биолуминесцентный процесс. На Рисунке 1.4 представлена схема реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, предложенная Гастингсом и Джибсоном в 1963 году [78].

соединениями, свободные радикалы вступают в реакции с молекулами различной химической природы, и избыток АФК вызывает деградацию структурных белков, липидов клеточных мембран и нуклеиновых кислот, ингибирование ферментов, изменение структуры и функциональных свойств гормонов и их рецепторов [79–81].

Таким образом, АФК регулируют функции организма, однако любая система обладает пределом защитного потенциала. При длительном воздействии компенсаторные механизмы становятся недостаточными для противостояния свободным радикалам – в результате возникают серьёзные повреждения, способные приводить к канцерогенезу, некторозу, апоптозу, тератогенезу [82–85].

1.1.5 Радиационный гормезис

Результат воздействия малых доз радиации принципиально отличается от воздействия больших доз, поэтому методологии их изучения в радиобиологии отличаются. Для низкодозовых воздействий описаны и обсуждаются нелинейные зависимости доза-эффект, которые принято обозначать термином «гормезис». Этот термин введен в 1943 году [86]. Этим термином обозначают положительный биологический отклик на низкодозовое воздействие токсикантов или других стресс-факторов, включая ионизирующее излучение. Предполагается, что явление гормезиса свойственно всем биологическим системам, независимо от уровня биологической организации (клетка, орган, организм), способов регистрации и др. В целом, существует три модели биологической реакции на низкодозовое облучение. Первая модель, гормезис, представлена на Рисунке 1.5 кривой 1. Предполагается, что гормезис – наиболее сложная зависимость, она является базовой моделью. Гормезис включает в себя 3 стадии: умеренное ингибирование при низких дозах (стадия распознавания стресса), активацию при повышении дозы (адаптивный отклик в результате активизации компенсаторных процессов в организме, перекомпенсация) и ингибирование в области высоких доз (стадия токсичности). Две другие зависимости, пороговая (Рисунок 1.5, кривая 2) и

линейная (Рисунок 1.5, кривая 3) модели, могут рассматриваться как частные случаи гормезиса [87; 88].

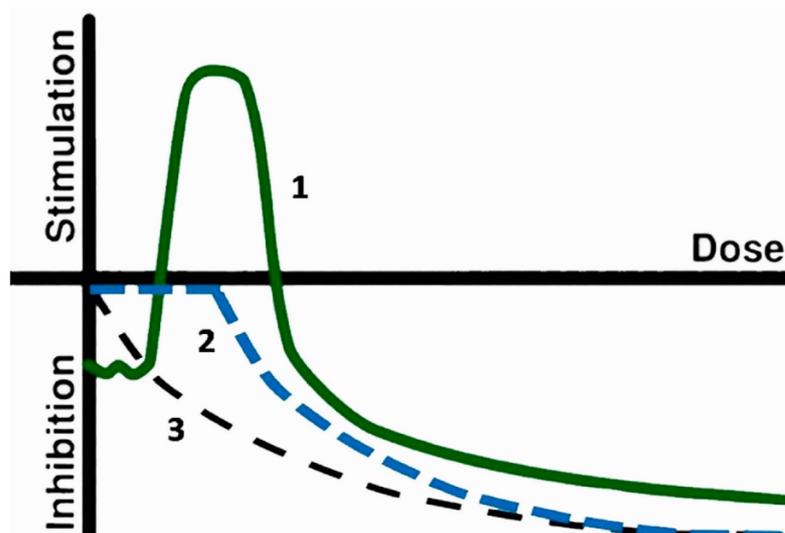


Рисунок 1.5 – Схема модели доза-эффект; (1) – гормезис; (2) – пороговая зависимость; (3) – линейная зависимость [89]

Первый учебник по радиационному гормезису был написан Лакки [90]. Интенсивность изучения радиобиологических низкодозовых эффектов растет с 70-х годов [91–96], включая работы по воздействию на микроорганизмы [97–100]. К настоящему времени достаточно подробно изучено две модели, описывающие механизм радиационного гормезиса: это явление связывают либо с повреждением ДНК, либо с мембранными процессами [91; 94; 97; 101–105].

Естественный радиационный фон можно выделить как одно из необходимых условий существования биологических объектов. Имеется физиологический уровень воздействия излучений, благоприятный для жизнедеятельности. Например, при изоляции культуры парameций [106; 107] от радиационных воздействий в свинцовом контейнере наблюдается замедление процесса деления клеток. После помещения в контейнер с культурой радиоактивного источника, воспроизводящего фоновый уровень радиации, митотическая активность

нормализуется. Экранирование от естественного радиационного фона приводило к увеличению скорости старения и отмирания штаммов дрожжевых клеток [108].

Также некоторые исследования показывают, что умеренные дозы ионизирующего излучения могут оказывать положительный эффект на организмы. В [109] показано, что при радиационном воздействии до 0,5 Гр у растений увеличивалась скорость роста вегетативных органов, интенсифицировалось ветвление и повысилось развитие генеративных органов; у млекопитающих и рыб увеличивалась плодовитость, выживаемость и скорость роста. Было показано, что малые дозы радиации стимулируют иммунную систему животных и человека, оказывают антиканцерогенное действие [109].

Вайсерман и коллеги [110] исследовали воздействие радиации на мух *Drosophila melanogaster*. В ходе эксперимента было выявлено, что облучение при высоких дозах приводило к снижению выживаемости мух на преимагинальных стадиях. Однако низкие дозы облучения привели к увеличению продолжительности жизни мух.

Сторонники идеи радиационного гормезиса не без оснований считают, что радиация является естественным фактором, без которого нормальное существование организмов не предоставляется возможным.

Интересным и неисследованным вопросом является возможность модификации адаптивного отклика организмов биологически активными соединениями как природного, так и искусственного происхождения.

1.2 Радиопротекторы. Свойства и применение

При интенсивном воздействии ионизирующего излучения на клетку образуются в избытке АФК и свободные радикалы, которые приводят к функциональным нарушениям и окислительному стрессу со всеми вытекающими последствиями для клетки. Антиоксидантная защита клеток способствует выведению клетки из патологического состояния, она связана с радиопротекторной активностью некоторых веществ – радиопротекторов [111].

Радиопротекторы – это соединения, которые используются для защиты или предотвращения гибели здоровых клеток организма от воздействия радиации. Эти соединения часто являются антиоксидантами и должны присутствовать в достаточной концентрации. Радиопротекторы могут быть как внешними веществами относительно организма, так и внутренними, т. е. стимулирующими адаптивный отклик организмов за счет интенсификации метаболических процессов [112; 113].

Внешние радиопротекторы, которые используются для защиты организма, можно разделить на две категории по их происхождению: природные (соединения, полученные из растений, почв и пр.) и химические (искусственно полученные соединения) [114].

Радиопротекторы могут инициировать процессы, которые направлены на предотвращение повреждений биологических мембран, белков, ДНК активными формами кислорода, при этом они часто защищают организм от образования раковых клеток [115].

Среди механизмов защиты от облучения природными радиопротекторами можно выделить:

1. Восстановление ДНК (задержка клеточного деления и предоставление достаточного времени для восстановления повреждений ДНК, сульфгидрильные фрагменты радиозащитных агентов связываются с ДНК, подавляют ее репликацию и обеспечивают репарацию поврежденной ДНК);

2. Снижение содержания активных форм кислорода в организме;

3. Антиоксидантная активность (фенольные соединения с антиоксидантными свойствами могут индуцировать остановку клеточного цикла за счет поглощения H_2O_2) [115].

Было обнаружено, что среди природных радиопротекторов, противолучевой эффективностью обладают экстракты некоторых видов лекарственных трав, сине-зелёная водоросль *Spirulina platensis*, а также спиртовой экстракт из биомассы низших микоризных грибов [116]. Предполагается, что радиозащитная активность

проявляется за счёт содержания флавоноидов и фенольных кислот, стильбенов, ликопина, алкалоидов, пептидов, полисахаридов и фитогормонов [114; 115].

Среди химических радиопротекторов выделяют амифостин, нитроксиды, генистеин, метотрексат, фторурацил и прочие [117–119]. Их детоксифицирующее действие заключается в удалении свободных радикалов.

Помимо вышеперечисленного, детоксифицирующие агенты можно классифицировать в зависимости от времени использования по отношению к радиации: смягчающие радиопротекторы; радиопротекторы, поставляющиеся до или во время облучения с целью предотвращения повреждений; радиопротекторы, используемые во время или после облучения для облегчения восстановления после радиационного поражения [120; 121].

Известно, что широко распространенные в природе гуминовые вещества также обладают радиопротекторными свойствами.

1.2.1 Гуминовые вещества

Гуминовые вещества (ГВ) представляют собой высокомолекулярные соединения, образующиеся в результате разложения растительных и животных остатков под воздействием микроорганизмов и абиотических факторов окружающей среды [122].

ГВ встречаются в почве, реках, озёрах [123]. Также ГВ можно найти в осадочных породах, торфе, угле и твёрдых горючих ископаемых. Их содержание в почве, воде и донных отложениях составляет 50–80% от общего количества органического вещества, а в торфе и угле – от 20 до 90% [124–126]. ГВ играют исключительно важную роль в изоляции, трансформации и переносе органических ксенобиотиков и минеральных примесей [125; 127–129].

Несмотря на длительную историю изучения ГВ, методологические подходы к их анализу и количественному описанию структуры продолжают развиваться. Сложность описания структуры ГВ объясняется отсутствием повторяющихся последовательностей и разнообразием химических и биологических реакций,

участвующих в их генезисе. Вышеперечисленное делает ГВ очень сложными и многогранными молекулами, способными выполнять разнообразные сигнальные и питательные функции в системе почва-растение [130]. Аналогично биологическим полимерам, эффекты ГВ являются корпоративными.

В зависимости от растворимости при различных значениях рН, гуминовые вещества подразделяются на три группы [131; 132]:

1. Фульвокислоты – наиболее активная фракция гуминовых веществ, растворимая в воде, щелочах и кислотах;

2. Гуминовые кислоты – группа тёмноокрашенных гумусовых кислот, растворимых в щелочах и нерастворимых в кислотах;

3. Гумин – не извлекаемый остаток, нерастворимый ни в щелочах, ни в кислотах.

Растворимость этих фракций тесно связана с молекулярной массой, сложностью структурного разветвления, молекулярной полярностью и химическим составом.

Существует две основные концепции о молекулярной организации ГВ. В данной главе вкратце будет рассмотрена каждая из них.

Согласно первому представлению, спецификой ГВ является стохастический характер, обусловленный особенностью их образования в результате естественного отбора устойчивых структур. В отличие от обычных биологических макромолекул, которые синтезируются живым организмом на основе информации, закодированной в ДНК (нуклеиновые кислоты, белки, ферменты, антитела и т. д.), ГВ являются продуктами стохастического синтеза. Они характеризуются как полидисперсные материалы, имеющие нестехиометрический элементный состав и нерегулярную и неоднородную структуру, приведённую на Рисунке 1.6. Указанные особенности затрудняют использование общепринятых биологических подходов для изучения биологической активности ГВ [133; 134].

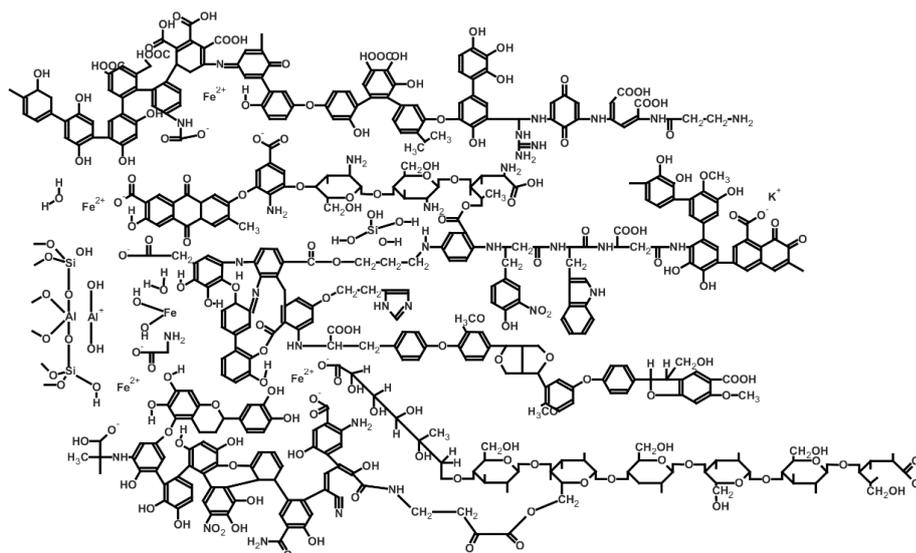


Рисунок 1.6 – Гипотетический структурный фрагмент гуминовых веществ [124]

Вторая концепция молекулярной организации ГВ основывается на представлении о их супрамолекулярном строении. В данном случае исследователи предполагают, что ГВ состоят из относительно небольших молекул, которые соединены между собой водородными, гидрофобными связями, которые легко разрушаются; простые органические молекулы проникают в большие гидрофобно связанные ассоциации и разделяют их на более мелкие ассоциации с более высокой энергией водородных связей [135–137].

В настоящее время наблюдается резкое повышение интереса к применению ГВ в медицине, животноводстве, растениеводстве и в охране природных сред от загрязнения [128; 138–140]. Это связано с тем, что гуматы являются определяющим фактором плодородия почв, обладают пролонгированным действием и ослабляют воздействие некоторых неблагоприятных факторов [134]. ГВ способны снижать токсичность как тяжелых металлов, так и некоторых органических соединений [141–143]. Так, в исследованиях Тарасовой [144; 145] было показано, что ГВ способны снижать токсичность солей металлов, таких как $Pb(NO_3)_2$, $CoCl_2$, $CuSO_4$, $Eu(NO_3)_3$, $CrCl_3$, $K_3[Fe(CN)_6]$. Аналогичный детоксицирующий эффект ГВ наблюдается и в отношении хинонов [146].

Помимо этого, рассматривается радиопротекторная активность ГВ. В исследовании Муслимовой [147] изучалось влияние растворов гумата калия на проростки кукурузы, полученных из облученных семян в дозах 50 и 100 Гр. Было установлено, что обработка семян 0,1%-ым гуматом калия перед облучением снижает воздействие ионизирующего излучения на всходы посредством уменьшения количества малонового диальдегида (продукт перекисного окисления липидов).

Шкарупа и коллеги исследовали культивируемые лимфоциты периферической крови 10 человек с раком щитовидной железы после облучения лимфоцитов *in vitro* в дозе 1 Гр. Гумат натрия добавляли в культуру клеток в концентрациях 10 и 100 мкг/мл. В результате, гумат натрия снижал среднюю частоту радиационно-индуцированных хромосомных aberrаций на 51,9% при концентрации 10 мкг/мл и на 38,8% при концентрации 100 мкг/мл [148].

Также изучалось влияние ГВ на люминесцентные морские бактерии *Photobacterium phosphoreum*, подвергшихся воздействию Am-241 (3000 МБк/л) [149]. Было обнаружено, что ГВ снижают воздействие Am-241 на люминесценцию бактерий. Помимо этого, в присутствии ГВ наблюдалось изменение содержания Am-241 в клеточной фракции и снижение повреждения клеток.

Вместе с тем, представляют интерес радиомодифицирующие свойства ГВ в тритиевой воде и растворах тория, а также механизмы этих радиомодификаций, связанные с ролью АФК в клеточных и ферментативных процессах.

1.2.2 Производные фуллеренов – фуллеренолы

Фуллеренолы – водорастворимые производные фуллеренов. Синтез фуллеренолов связан с добавлением гидроксильных групп к гидрофобному ядру фуллерена. Фуллеренолы являются перспективными соединениями с точки зрения их применений в физике, химии, нанобиотехнологии, фармакологии и биомедицине. Структура фуллеренола представлена на Рисунке 1.7. Большинство методов, использующихся для получения фуллеренолов, основаны на прямом

взаимодействии фуллеренов со щелочью в присутствии катализатора или на получении производных фуллеренов с последующей обработкой щелочью или водой [150; 151].

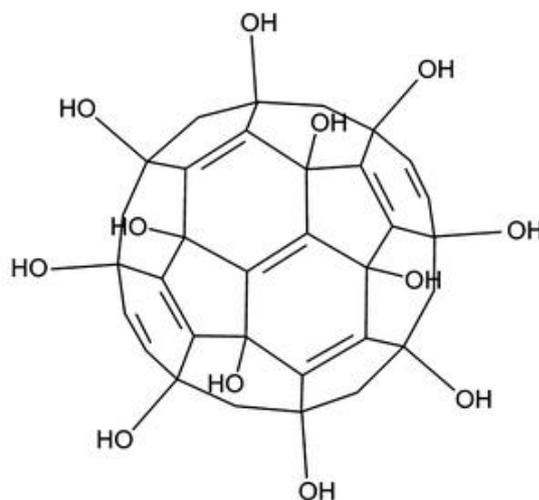


Рисунок 1.7 – Модель молекулы фуллеренола $C_{60}(OH)_{24}$ [152]

Подобно фуллеренам, фуллеренолы являются электронно-дефицитными структурами, и это свойство делает их эффективными катализаторами в химических и биохимических реакциях. Кроме того, они представляют собой амфифильные структуры: гидроксильные группы обеспечивают их растворимость в воде, а фрагменты каркаса фуллеренов – сродством к гидрофобным ферментативным фрагментам и липидным структурам клеточных мембран [153–155].

Значительное внимание уделяется свойствам биоактивных водорастворимых производных фуллеренов, особенно их способности генерировать и улавливать активные формы кислорода и азота [156; 157]. Помимо этого, фуллеренол способен влиять на образование продуктов радиолиза воды, таких как H_2O_2 и гидроксильные радикалы, а также способен предотвращать повреждение ДНК и белков [158]. Идея использования фуллеренов для защиты клеток связана с химическими и биологическими свойствами фуллеренов и их производных [159; 160]. Считается, что фуллерены являются эффективными поглотителями свободных радикалов на

основании того факта, что они имеют большое количество сопряженных π -связей и низшую вакантную молекулярную орбиталь с низкой энергией, которая может легко принять электрон [161]. На Рисунке 1.8 представлен гипотетический механизм антиоксидантного действия фуллеренолов.

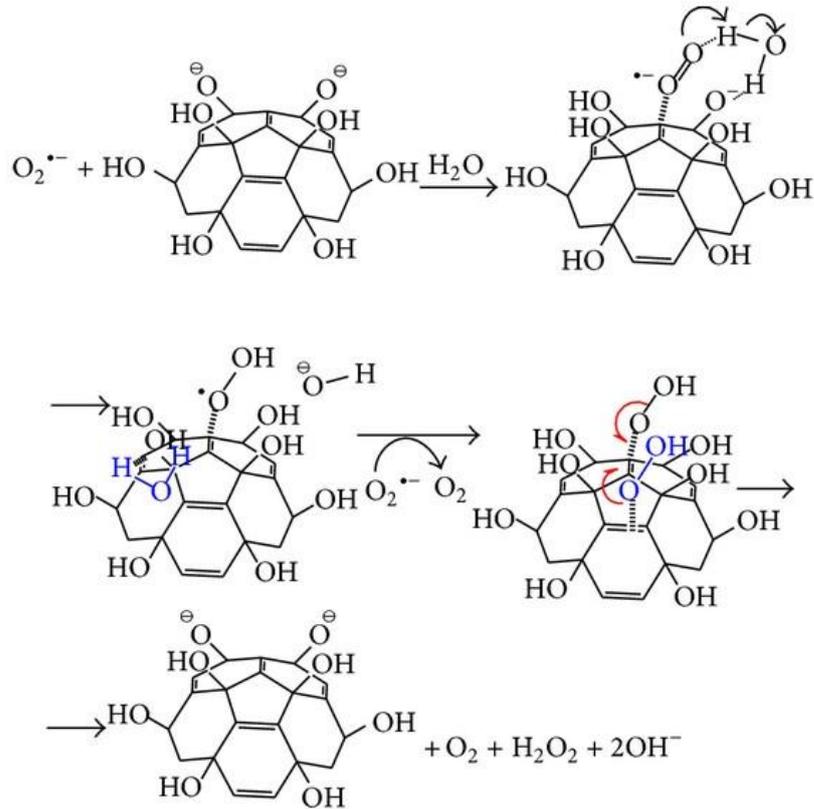


Рисунок 1.8 – Гипотетический механизм антиоксидантного действия фуллеренолов [162]

Концентрация радикалов в организме имеет важную роль: при низких концентрациях свободные радикалы не имеют возможности соединиться друг с другом и образовать безвредный продукт. В этом случае, фуллеренол выступает в качестве катализатора рекомбинации радикалов – собирает на своей поверхности свободные радикалы, где они, встречаясь друг с другом, рекомбинируют. При этом фуллеренол остается в неизменном виде. На этом и основан механизм антиоксидантной активности фуллеренолов [163; 164].

Так, было обнаружено, что токсические и антиоксидантные свойства фуллеренолов зависят от количества кислородных заместителей [153; 165]. Наименьшая токсичность и более высокая антиоксидантная активность были продемонстрированы у фуллеренолов, в структуре которых в 2 раза меньше кислородосодержащих групп, по сравнению с количеством атомов углерода.

Способность фуллеренола $C_{60}(OH)_x$ проявлять свойства ловушек для свободных радикалов была продемонстрирована в опытах *in vitro* и *in vivo*. Согласно работе Пиотровского [150], фуллеренол не проявлял токсического действия, и было предложено использовать его в качестве компонента композиционных биоматериалов, в составе антибактериальных, противогрибковых, противовирусных, противораковых средств.

В настоящее время рассматривается способность фуллеренолов снижать содержание АФК как радиопротекторное свойство. Так, в исследовании группы Трайкович [166; 167], в котором изучалась общая радиозащитная эффективность фуллеренола и амифостина на половозрелых самцах крыс, было показано, что фуллеренол имел большую радиопротекторную активность по сравнению с амифостином, а также, большее количество фуллеренола (100 мг/кг) обеспечивало лучшую защиту, чем меньшее (10 мг/кг).

Радиопротекторные свойства фуллеренолов были исследованы на клетках реснитчатых простейших *Stylonychia mytilus*, содержащихся в растворах фуллеренолов различной концентрации и подвергающихся облучению γ -квантами ^{60}Co в различных дозах. Выживающая фракция *Stylonychia mytilus* уменьшалась с увеличением дозы γ -облучения от 100 до 2000 Гр, в то время, как фуллеренолы увеличивали выживающую фракцию, за исключением самого высокого уровня дозы γ -излучения [168].

1.3 Хемилюминесцентные процессы и их использование

Хемилюминесценция представляет собой излучение света, возникающее в ходе химических реакций, обусловленное образованием электронно-

возбужденных молекул; при их переходе в основное состояние испускается видимый свет. Установлено, что живые организмы в ходе жизнедеятельности производят очень слабое излучение, которое называют сверхслабым свечением или собственным излучением клеток и тканей. Это явление имеет ключевое значение для изучения физиологических и патологических процессов, происходящих в клетке [169; 170].

Эффективность процессов свободнорадикального окисления, протекающих с образованием радикалов кислорода, можно оценивать посредством хемилюминесцентных методов [169; 171; 172].

Хемилюминесценция является широко используемым аналитическим методом благодаря высокой чувствительности, широкому линейному диапазону хемилюминесцентного отклика, простому оборудованию [169; 173]. Хемилюминесцентный метод основан на использовании окислительно-восстановительных реакций, протекающих с излучением света: в процессе реакции образуются нестабильные короткоживущие продукты, в том числе, в фазе возбуждения; при переходе из возбужденного в основное состояние происходит излучение видимого света [169; 174].

Анализ, основанный на хемилюминесценции, широко используется в исследованиях. Например, в пищевой отрасли с его помощью обнаруживают остатки антибиотиков в пищевой продукции [175], оценивают уровень содержания глюкозы и лактозы в напитках [176; 177], наличие консервантов пищевых продуктах. [178; 179]. В медицинской практике хемилюминесцентный анализ применяется как скрининговый тест для оценки состояния гомеостаза по показателям биологических жидкостей (крови, мочи, слюны) [180–183]. Также оценивается изменение содержания активных форм кислорода. Так, Динг и коллеги обнаружили, что опухолевые клетки увеличивают хемилюминесценцию из-за повышения содержания синглетного кислорода [184].

Для повышения чувствительности хемилюминесцентного метода широко используются методы усиленной хемилюминесценции [185]. Усиленная хемилюминесценция – метод, в котором хемилюминесцентная реакция

усиливается добавлением специальных веществ, называемых зондами, которые повышают интенсивность и/или продолжительность светового сигнала. Наиболее распространенными хемилюминесцентными зондами являются люминол и люцигенин.

Люминол (аминофталгидразид, 5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндион) – органическое соединение с формулой $C_8H_7N_3O_2$, и представляет собой белые или светло-желтые кристаллы, хорошо растворимые в большинстве полярных органических растворителях, например, этаноле, относительно растворимые в щелочных условиях и мало растворимые в воде при нейтральных рН [186; 187]. Растворы люминола высокочувствительны к свету и несовместимы с сильными окислителями, сильными кислотами, сильными основаниями и сильными восстановителями [188]. Люминол реагирует с широким спектром АФК: супероксид, гидроксильные радикалы, перекись водорода и в том числе синглетный кислород. Благодаря этому хемилюминесцентный метод на основе люминола отражает суммарное содержания АФК в клетках или суспензиях, позволяя оценить общий уровень оксидативного стресса или антиоксидантной защиты системы.

В качестве катализатора окисления люминола обычно используют соли трехвалентного иона железа (например, феррицианид калия – $K_3[Fe(CN)_6]$). Хемилюминесцентная реакция люминола с феррицианидом в щелочной среде – классическая реакция хемилюминесценции [189; 190]. Механизм взаимодействия люминола с феррицианидом представлен на Рисунке 1.9.

Общепринятый механизм окисления люминола предложен Шевлином и Нойфельдом [189] и состоит из трех основных этапов: сначала происходит окисление люминола (LH) в присутствии феррицианида ($Fe(CN)_6^{3-}$) до образования оксильного радикала (L^{\cdot}) и ферроцианида ($Fe(CN)_6^{4-}$) (Рисунок 1.9, реакция 1).

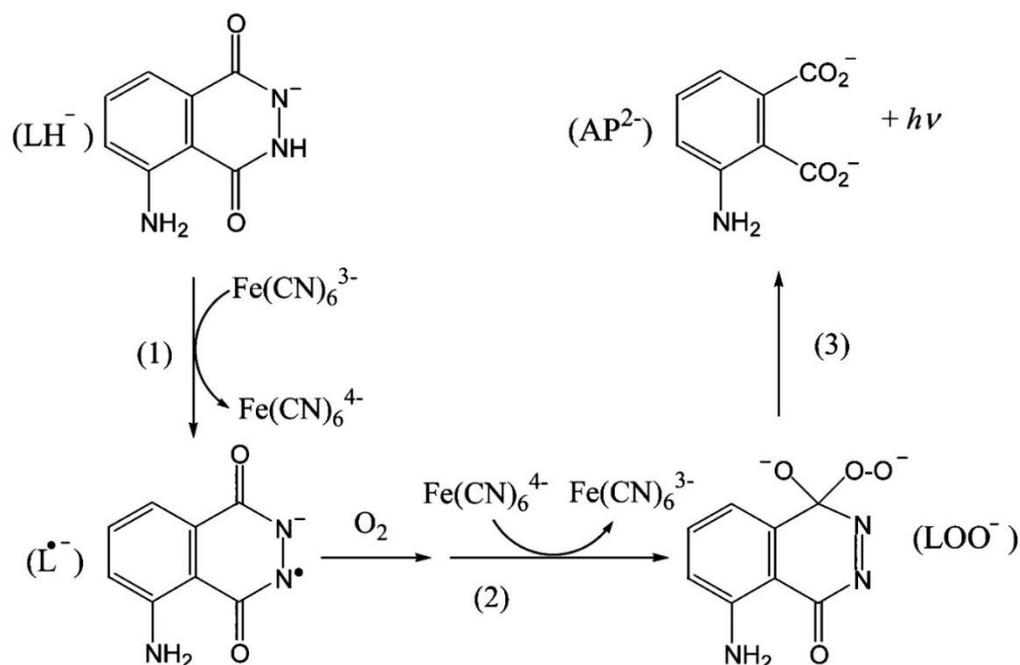


Рисунок 1.9 – Схема хемилюминесцентной люминольной реакции в присутствии феррицианида [191]

Затем происходит окисление оксильного радикала до гидропероксида (LOO^-), ключевого промежуточного продукта (Рисунок 1.9, реакция 2). Третий этап – разложение гидропероксида с испусканием света (Рисунок 1.9, реакция 3).

Помимо люминола и его производных, также используется люцигенин. Однако его применение ограничено, поскольку он используется преимущественно для определения содержания супероксид-аниона [192; 193].

Таким образом, хемилюминесцентный метод является высокочувствительным инструментом обнаружения АФК, поскольку он отвечает всем требованиям, которые предъявляются к экспресс-анализу [172; 194; 195].

1.4 Способы оценки токсичности сред. Биотестирование и экологический мониторинг

В настоящее время для обеспечения безопасности среды обитания человека, при диагностике различных заболеваний, контроля воздуха используются химические и биологические методы, каждый из которых имеет свои особенности

и области использования [196].

Биологический анализ (биотестирование) основан на использовании живых организмов, таких как растения, животные или микроорганизмы, для оценки воздействия любого соединения [197–202]. Основной характеристикой всех биотестов является интегральность. Биологические тесты регистрируют изменение какой-либо физиологической функции или поведения живых организмов, находящихся в состоянии стресса, вызванного биологическими или химическими токсичными соединениями. Биотестирование позволяет оценить воздействие антропогенных активностей на экосистемы и обеспечивает информацию для разработки и внедрения мер по охране окружающей среды и биоразнообразия. Основываясь на данных биотестирования, определяются предельно допустимые концентрации веществ, которые используются для последующих исследований с применением других методов, таких как химический анализ [203; 204].

Важно отметить, что выбор конкретных организмов для использования в экологическом мониторинге зависит от целей исследования, характеристик исследуемой местности и доступности данных о биологических организмах. Различные виды животных, растений и микроорганизмов имеют разные чувствительности к загрязнителям и могут выполнять разные функции в экосистемах.

Для иллюстрации применения живых организмов в экологическом мониторинге рассмотрим несколько конкретных примеров.

Было изучено воздействие 14 пищевых красителей на *Paramecium caudatum*. Оказалось, что красители ксантенового ряда, содержащие атомы галогена, проявили более высокую токсичность по сравнению с другими группами пищевых красителей. Особенно токсичными оказались флоксин и розовый бенгал, содержащие хлор. Для понимания механизма токсичности было проанализировано воздействие этих красителей на активность лейцинаминопептидазы, кислой фосфатазы и γ -глутамилтранспептидазы в *Paramecium caudatum*. Флоксин и розовый бенгал значительно снизили активность лейцинаминопептидазы. Ингибирующий эффект пищевых красителей на лейцинаминопептидазу *in vitro*

согласуется с их токсическим воздействием на продолжительность жизни *Paramecium caudatum*. Рассматривается возможная связь между токсичностью и ингибированием активности ферментов, участвующих в процессе пищеварения [205].

Были проведены краткосрочные токсикологические исследования с применением *Escherichia coli* для оценки воздействия различных стрессовых агентов, таких как ионы металлов – Cd(II), Cu(II) и Hg(II), осадки и антибиотик (Bactrin). Ингибирование дыхания микроорганизмов отслеживалось с использованием анализа методом проточной инъекции с кондуктометрическим детектором. Обнаружено, что дыхание в суспензиях *Escherichia coli* было подавлено в течение 20 минут в присутствии ионов Hg(II) и антибиотика, в то время как образцы осадков из эвтрофных водоемов стимулировали выделение CO₂ [206].

Исследования на основе биотестирования имеют прямое отношение к экологическому мониторингу, поскольку они позволяют оценить воздействие различных загрязнителей на микроорганизмы в окружающей среде. Изменения в микробном дыхании, отраженные в результатах этих токсикологических тестов, могут служить индикаторами качества водных и почвенных систем, а также показателями степени загрязнения атмосферы [207; 208]. Такие данные могут быть использованы для разработки и мониторинга эффективности экологических стратегий и мер по охране окружающей среды.

1.5 Использование биолюминесцентных систем для биотестирования

Процесс видимого свечения живых организмов называется биолюминесценцией. Этот процесс можно обнаружить в бактериях, грибах, насекомых, рыбах, кальмарах. Само свечение образуется благодаря ферментативной хемилюминесцентной реакции, в результате которой образуется продукт в электронно-возбужденном состоянии и происходит эмиссия фотона.

Как было указано выше, большинство биолюминесцентных организмов являются морскими обитателями. Такие организмы космополитны: можно

встретить по всему Мировому океану на разных уровнях – от поверхностных слоев до глубин в несколько тысяч метров [209]. Морские животные могут быть колонизированы светящимися бактериями как сапрофитами, кишечными симбионтами или паразитами. Также существуют и такие виды светящихся бактерий, которые живут в симбиозе с рыбами и кальмарами [210].

С 1875 года, когда Пфлюгер связал наличие бактерий в поверхностной слизи рыб с люминесценцией, началась история изучения бактериальной билюминесценции [211]. Однако существовали записи наблюдений люминесценции и в 1700 и 1800-х годах. Возможно, это было связано с наличием соответствующих бактерий в мясе, рыбе, яйце, в разлагавшихся телах любых животных [211; 212].

Свечение имеет значение в жизни живых организмов. Выделяли следующие функции билюминесценции: защиту [82], использование в охоте [213], внутривидовую коммуникацию [214], контриллюминацию (билюминесцентное освещение) [215]. Помимо этого, билюминесцентный процесс, как ферментативный редокс-процесс, используется бактериями в качестве механизма поддержания АФК в окружающей среде [216].

Из-за влияния различных токсичных веществ на биосферу и на водные экосистемы имеется повышенный интерес к мониторингу окружающей среды. Микроорганизмы являются одним из основных компонентов экосистем, что позволяет использовать их физиологические показатели как индикаторы состояния биосферы. Следовательно, микроорганизмы могут быть использованы в мониторинге токсичности, включая радиотоксичность.

Для мониторинга токсичности экосистем используются биотесты на основе светящихся морских бактерий. Данные биотесты позволяют изучать как хронические влияния, так и резкие, моментальные воздействия. Из-за большой чувствительности билюминесценции морских микроорганизмов к токсичным воздействиям, данные биотесты используются уже несколько десятков лет [43].

Можно рассматривать морские бактерии как упрощенную 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. Выявленные закономерности влияния ионизирующего излучения на микроорганизмы могут быть использованы для анализа радиоактивного воздействия на более сложные организмы [217].

1.5.1 Люминесцентные бактерии *Photobacterium phosphoreum*

Современные биотесты, использующие светящиеся бактерии, отличаются от существующих в настоящее время тестовых систем с использованием инфузорий и водорослей: в качестве интегрального параметра жизнедеятельности в них используется биолюминесценция. Светящиеся бактерии используют в биотестах в различных видах: клеточная суспензия (интактные бактерии), твердая среда, лиофилизированный препарат. Значительными преимуществами обладают лиофилизированные светящиеся бактерии, так как в этом случае исключается необходимость непрерывного культивирования и поддержания бактериальных культур. Восстановленные в 3%-ом растворе NaCl бактерии имеют постоянный уровень свечения.

Лиюфилизированные люминесцентные бактерии широко используются в экспрессных анализах в различных областях. Широко используются для этих целей бактерии двух родов: *Photobacterium* (*P. phosphoreum*, *P. leiognathi*) и *Vibrio* (*V. fischeri*, *V. harveyi*), а также рекомбинантный штамм *Escherichia coli* [218].

Мониторинг токсичности окружающей среды является перспективной областью применения люминесцентных бактерий [43; 198; 217; 219]. Преимуществами биолюминесцентных биотестов на основе люминесцентных бактерий является быстрое действие, точность, чувствительность и простота. Метод основан на изменении интенсивности люминесценции при воздействии того или иного анализируемого образца. С помощью биолюминесцентных биотестов возможно выявлять состояния экосистем, как при мгновенном, так и при хроническом воздействии токсичного вещества на организм. Возможность

использования билюминесцентных систем различной сложности позволяет сравнивать токсические эффекты на клеточном и биохимическом (уровне биомолекул и физико-химических процессов) уровнях и выявить закономерности воздействия токсикантов.

Изучено влияние ртути на *P. phosphoreum* [220]. Было показано, что ртуть образует комплексы с хлоридами в 3%-ом NaCl – около 95% в виде HgCl_4^{2-} , HgCl_3^- и HgCl_2 при pH 5–9. Увеличение pH снижает токсичность ртути, вероятно, из-за конкуренции между гидроксильными группами и отрицательно заряженными хлоро-комплексами. Катионы Ca^{2+} , Mg^{2+} и K^+ не влияют на токсичность ртути, но фосфат усиливает её посредством образования растворимых ртуть-хлоридных комплексов.

Также изучена токсичность металлоорганического каркаса ZIF-67 с частицами размером 100–1200 нм для светящихся бактерий *P. phosphoreum* T3 [221]. При 5 мг/л ингибирование люминесценции достигало 40%. Проведенные клеточные тесты и анализ экспрессии генов подтвердили, что высокая цитотоксичность и окислительный стресс вызваны ZIF-67, а не высвобождением Co^{2+} из него. Это исследование цитотоксичности ZIF-67 способствует более глубокому пониманию механизма токсичности металлоорганического каркаса и предоставляет рекомендации по созданию настраиваемых наночастиц с меньшей токсичностью для будущих практических применений.

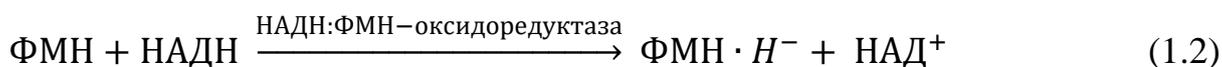
Активно изучаются низкодозовые воздействия растворов альфа- и бета-излучающих радионуклидов на бактериальные люминесцентные системы [37; 38; 43; 215; 217; 222], а также эффекты низкоинтенсивного гамма-излучения [223]. Показано, что эффекты ионизирующего излучения альфа- и бета-излучающих радионуклидов описываются моделью гормезиса (Рисунок 1.5, кривая 1), а гамма-излучения – пороговой моделью (Рисунок 1.5, кривая 2). Установлено, что изменения интенсивности свечения бактерий в этих условиях не связаны с мутациями в последовательности 16S рибосомального гена РНК, ответственного за физиологические функции бактерий [224].

1.5.2 Билюминесцентная система сопряженных ферментативных реакций

В настоящее время, в связи с развитием методов генной инженерии и получением рекомбинантных организмов, появилась возможность широкого использования в билюминесцентном анализе люцифераз из различных светящихся организмов. По простоте и числу анализируемых веществ билюминесцентные тесты сходны со спектрофотометрическими, но по чувствительности превосходят их на два-три порядка [202].

Система, состоящая из смеси двух ферментов: бактериальной люциферазы и НАДН:ФМН-оксидоредуктазы получила наиболее широкое применение в биохимических и клинических лабораторных анализах. Билюминесцентная биферментная система включает две ферментативные реакции.

В результате первой реакции (1.2), катализируемой НАДН:ФМН-оксидоредуктазой, происходит восстановление флавинмононуклеотида (ФМН) с помощью восстанавливающего реагента – восстановленной формы никотинамидадениндинуклеотида (НАДН). При этом НАДН переходит в окисленную форму никотинамидадениндинуклеотида (НАД⁺), передавая молекуле ФМН протон и два электрона, с образованием депротонированной формы восстановленного флавина (ФМН·Н⁻).



Вторая реакция (1.3), катализируемая бактериальной люциферазой, является билюминесцентной. В этой реакции восстановленный флавин (ФМН·Н⁻) и алифатический альдегид (RCHO) окисляются кислородом воздуха. В результате реакции образуется окисленная форма флавина (ФМН), жирная кислота (RCOOH) и испускается квант света. При проведении билюминесцентной реакции с использованием химически восстановленного ФМН·Н⁻ наблюдается длительное свечение, обусловленное множественными оборотами ферментов.



Вмешательство в любую часть метаболизма бактериальной клетки, которое влияет на выделение любого компонента бактериологической биолюминесценции, будет отмечено уменьшением светового излучения. Токсины или тестируемое вещество, влияющие на биолюминесцентную реакцию, катализаторами для которых служат ферменты, будут обнаружены [218].

Сопряженная ферментативная система применяется для оценки радиационной токсичности на биохимическом уровне. Ранее был разработан биолюминесцентный метод мониторинга радиационной токсичности в растворах, содержащих альфа- и бета-излучающие радионуклиды [225].

Показана возможность использования биолюминесцентных методов для оценки безопасности пищевых продуктов. Предложен метод обнаружения пестицидов на основе биотеста с использованием связанной ферментной системы: НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза [226–228].

Таким образом, биолюминесцентные биотесты представляют собой высокочувствительный и удобный инструмент для экологического контроля, позволяющий оперативно выявлять влияние токсических веществ на живые организмы. Их широкое применение способствует эффективному мониторингу и предупреждению экологических рисков. Внедрение таких биотестов в практику является ключевым фактором для расширения инструментария мониторинга, комплексной оценки радиационного риска и, как следствие, разработки новых эффективных стратегий защиты в медицинской и экологической сферах.

Глава 2 Материалы и методы исследования

2.1 Реактивы и материалы

2.1.1 Используемые реактивы

В работе использовали следующие биолюминесцентные тестовые системы:

1. Интактные бактерии *Photobacterium phosphoreum* 1883 IBSO из коллекции Института Биофизики СО РАН (Красноярск). Бактерии выращивали в течение 24 часов (стационарная фаза роста, соответствующая максимальной биолюминесценции) при +25°C на твердой полусинтетической питательной среде и смывали 3%-ым водным раствором NaCl.

2. Препарат лиофильно высушенных бактерий «Микробиосенсор–677Ф», изготовленный на основе лиофильно высушенных люминесцентных бактерий *P.phosphoreum* 1883 IBSO, производимый в Институте Биофизики СО РАН (Красноярск). Для приготовления бактериальных суспензий в пенициллиновый флакон с «Микробиосенсором–677Ф» добавляли 2 мл 3%-го водного раствора NaCl. Для имитации морской среды и для баланса осмотических процессов использовали 3% водный раствор NaCl (ЗАО Химреактивснаб, Россия). Готовые бактериальные суспензии выдерживали при +4°C в холодильнике в течение 30 мин до начала эксперимента для стабилизации биолюминесценции. Суспензии бактерий во время эксперимента также хранили в холодильнике при +4°C.

3. Комплект реактивов аналитической биолюминесценции (КРАБ), который включает лиофилизированные препараты люциферазы *Photobacterium leiognathi* (0,5 г/л) и НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазы из *Vibrio fischeri* (0,15 ед. активности) [229]. Для приготовления раствора препарата ферментов КРАБ, во флакон вносили 1 мл калий-фосфатного буфера (pH 6,8). Для приготовления реакционной смеси использовали никотинамидаденидинуклеотид восстановленный (НАДН) (LLC, США), флавинмононуклеотид (ФМН), тетрадеканаль (RCHO) (Serva, Германия). Как и в случае с бактериальными суспензиями, готовые растворы КРАБа выдерживали при +4°C в холодильнике в течение 30 мин до начала эксперимента для стабилизации биолюминесценции, а во время эксперимента хранили при +4°C.

Для проведения хемилюминесцентного анализа использовали люминол, гидроксид калия (KOH) (ЗАО Химреактивснаб, Россия), гексацианоферрат (III) калия ($K_3[Fe(CN)_6]$) (Химреактив, Россия).

Источником альфа-излучения служил азотнокислый торий-232 ($Th(NO_3)_4 \cdot 4H_2O$). Паспортные данные тория азотнокислого $Th(NO_3)_4 \cdot 4H_2O$: содержание основного вещества (не менее) – 98,6%, сульфаты SO_4^{2-} – 0,005%, хлориды Cl^- – 0,002%, железо (Fe), церий (Ce) – 0,05%, оксид фосфора (P_2O_5) – 0,005%, Al, Ca, Mg – 0,05%.

В качестве источника бета-излучения использовали радионуклид тритий в составе тритиевой воды (НТО). Данный радионуклид был предоставлен кафедрой радиохимии МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва.

В качестве источника гуминовых веществ использовали препарат Гумат-80 (ООО «Гумат», Иркутск, Россия). Препарат получен механохимической реакцией бурого окисленного угля (Черемховское месторождение, Россия) со щелочью (KOH, NaOH) [230]. Характеристики препарата: гуминовые кислоты ~ 85%, растворимый калий (K_2O) – 9%, Fe – 1%, вода – 5%, pH 8-9 в 1%-ом водном растворе. Элементный состав используемого препарата: C – 64,5%, H_2 – 4,2%, N_2 – 2,3%, O_2 – 29,0%.

Фуллеренол $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x = 22-24$, $y = 2-4$) был получен в Институте Физики им. Л.В. Киренского СО РАН (Красноярск, Россия). Растворы фуллеренола готовили в дистиллированной воде.

2.1.2 Используемое оборудование

Для регистрации кинетики биолюминесцентного и хемилюминесцентного сигналов был использован планшетный люминометр Luminoskan Ascent (Thermo Electron Corporation, США). Люминометр Luminoskan Ascent измеряет световой поток автоматически при помощи программного обеспечения, при этом регистрация кинетики биолюминесцентного или хемилюминесцентного сигналов

начинается сразу же после запуска реакции, что обеспечивает точность измерений и возможность сравнивать данные.

Скорости окисления НАДН определяли, используя изменение оптической плотности раствора, D , на длине волны 340 нм (соответствующей максимуму поглощения НАДН) на спектрофотометре UVIKON-943 (KONTRON Instruments, Italy).

Анализ образцов проводили при комнатной температуре (+25°C). Для проведения экспериментов использовали 96-луночные микропланшеты для люминометра, микропипетки емкостью от 5 до 5000 мкл, флаконы и пробирки емкостью 5–10 мл и другое лабораторное оборудование и посуду.

2.2 Регистрация биолюминесценции

Для исследования хронического воздействия низкоинтенсивного излучения на биолюминесцентные системы использовали стандартные процедуры измерения биолюминесценции и хемилюминесценции [43; 231].

Относительную интенсивность биолюминесценции, I^{rel} , рассчитывали по формуле 2.1:

$$I^{rel} = \frac{I}{I_K}, \quad (2.1)$$

где I – интенсивность биолюминесценции в радиоактивных суспензиях;

I_K – интенсивность биолюминесценции в контрольных образцах.

2.2.1 Интактные бактерии

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

30 мкл суспензии интактных бактерий;

18 мкл дистиллированной H_2O ;

132 мкл 3%-го водного раствора $NaCl$.

Общий объём смеси – 180 мкл.

Интенсивность биолюминесценции бактерий *P. phosphoreum* в растворе с добавлением азотнокислого тория-232 измеряли в реакционной смеси следующего состава:

30 мкл суспензии интактных бактерий;

18 мкл раствора нитрата тория-232 различных концентраций (10^{-10} – 10^{-2} М);

132 мкл 3%-го водного раствора $NaCl$.

Общий объём смеси – 180 мкл.

Измерения проводились при комнатной температуре; каждое измерение проводилось в четырёх повторностях.

2.2.2 Лиофилизированные бактерии

Лиофилизированные бактерии использовались для исследования хронического низкодозового эффекта трития на бактериальную биолюминесценцию.

Для регистрации биолюминесценции в тритиевой воде и в присутствии гуминовых веществ (НТО + ГВ) готовили смеси следующего состава:

1) контрольные образцы (бактериальная суспензия):

400 мкл суспензии лиофилизированных бактерий;

1600 мкл 3%-го водного раствора $NaCl$.

2) контрольный образец с добавлением гуминовых веществ:

400 мкл суспензии лиофилизированных бактерий;

200 мкл гуминовых веществ ($C = 10^{-2}$ г/л);

1400 мкл 3%-го водного раствора $NaCl$.

3) радиоактивные образцы:

400 мкл суспензии лиофилизированных бактерий;

50 мкл раствора НТО;

1500 мкл 3%-го водного раствора NaCl.

4) радиоактивные образцы с добавлением гуминовых веществ:

400 мкл суспензии лиофилизированных бактерий;

200 мкл гуминовых веществ ($C = 10^{-2}$ г/л)

50 мкл раствора НТО;

1350 мкл 3%-го водного раствора NaCl.

Общий объём смеси – 2000 мкл.

Для исследования хронического эффекта трития на бактериальную люминесценцию, контрольные и радиоактивные образцы бактериальных суспензий выдерживали при +4°C в пенициллиновых флаконах. Перед измерением в лунки микропланшета вносили 100 мкл каждой смеси. Измерения биолюминесценции продолжались в течение 35 часов, пока интенсивность биолюминесценции не снизилась до 20% от максимальной.

Также лиофилизированные бактерии использовали для регистрации биолюминесценции в тритиевой воде с добавлением фуллеренола C_{60,70}. Для этого готовили смеси следующего состава:

1) контрольные образцы:

20 мкл суспензии лиофилизированных бактерий;

40 мкл дистиллированной H₂O;

146 мкл 3%-го водного раствора NaCl.

2) бактериальная суспензия+третий:

20 мкл суспензии лиофилизированных бактерий;

20 мкл раствора НТО;

20 мкл дистиллированной H₂O;

146 мкл 3%-го водного раствора NaCl.

3) бактериальная суспензия+третий+фуллеренол:

20 мкл суспензии лиофилизированных бактерий;

20 мкл раствора НТО;

20 мкл водного раствора фуллеренола;

146 мкл 3%-го водного раствора NaCl.

Общий объём смеси – 206 мкл.

Для исследования хронического эффекта трития на бактериальную люминесценцию, контрольные и радиоактивные образцы бактериальных суспензий выдерживали при +4°C. Измерения биолюминесценции продолжались в течение 30 часов, пока интенсивность биолюминесценции не снизилась до 20% от максимальной.

2.2.3 Биолюминесцентная биферментная система

Биолюминесцентную систему двух сопряженных ферментативных реакций, катализируемых НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазой и люциферазой, подвергали воздействию тория или трития. Доза не превышала 0,1 Гр, что предполагается верхним порогом низкодозовых воздействий для высших организмов [232].

Для исследования хронического эффекта тория контрольные (нерадиоактивные) и опытные образцы готовили следующим образом:

1) контрольный (нерадиоактивный) образец:

6 мкл препарата ферментов «КРАБ»;

25 мкл 0,0025%-го раствора РСНО;

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

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

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

2) радиоактивные образцы:

6 мкл препарата ферментов «КРАБ» в растворе тория-232 ($C_{Th} = 10^{-9}, 10^{-7}, 10^{-5}$ и 10^{-3} М);

25 мкл 0,0025%-го раствора РСНО;

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

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

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

3) радиоактивные образцы в присутствии гуминовых веществ:

6 мкл препарата ферментов «КРАБ» в растворе тория-232 ($C_{\text{Тн}} = 10^{-9}$, 10^{-7} , 10^{-5} и 10^{-3} М) в присутствии ГВ ($C_{\text{ГВ}} = 10^{-4}$ г/л);

25 мкл 0,0025%-го раствора РСНО;

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

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

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

Общий объём смеси – 200 мкл.

Биолюминесцентная система использовалась также для мониторинга воздействия трития:

1) контрольные (нерадиоактивные) образцы:

10 мкл препарата ферментов «КРАБ»;

25 мкл 0,0025%-го раствора РСНО;

40 мкл дистиллированной H_2O ;

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

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

2) радиоактивные образцы:

10 мкл препарата ферментов «КРАБ»;

25 мкл 0,0025%-го раствора РСНО;

20 мкл раствора НТО;

20 мкл дистиллированной H_2O ;

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

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

3) радиоактивные образцы в присутствии фуллеренола:

10 мкл препарата ферментов «КРАБ»;

25 мкл 0,0025%-го раствора РСНО;

20 мкл раствора НТО;

20 мкл водного раствора фуллеренола;

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

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

Общий объём смеси – 200 мкл.

2.3 Хемилюминесцентный люминольный метод

Содержание АФК определяли в дистиллированной воде, 3% водном растворе NaCl и во всех исследуемых биологических образцах.

Для определения содержания АФК в растворах разного состава, предварительно были построены калибровочные кривые с использованием пероксида водорода (H_2O_2) различных концентраций, как одного из представителей группы АФК. Растворы H_2O_2 готовили из 3%-го раствора H_2O_2 (ООО «Тулская фармацевтическая фабрика», Россия) непосредственно перед закапыванием в лунки микропланшета люминометра. Регистрировали сигнал хемилюминесценции.

Для определения содержания АФК в растворах ферментов, мы получали зависимости интенсивности хемилюминесценции от концентрации H_2O_2 в дистиллированной воде; для определения содержания АФК в бактериальных суспензиях, эти зависимости определяли в водном 3%-ом растворе NaCl.

Калибровочная кривая для водных растворов пероксида водорода представлена на Рисунке 2.1.

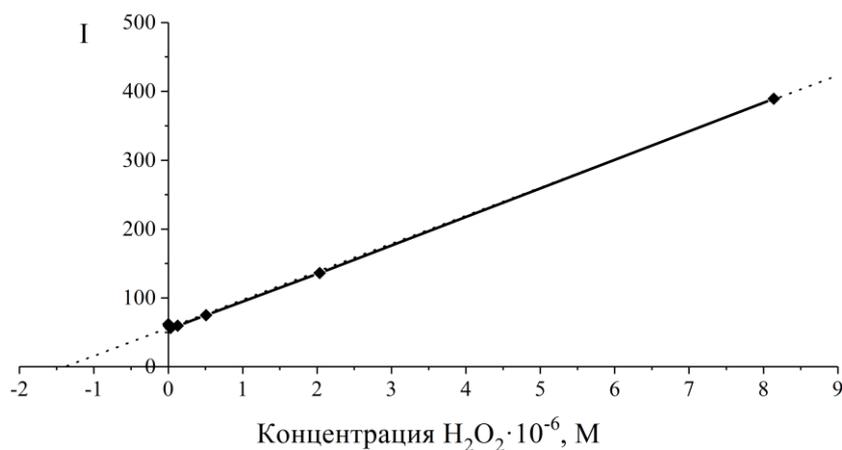


Рисунок 2.1 – Зависимость интенсивности хемилюминесценции люминола от концентрации водных растворов H_2O_2

Для получения калибровочной кривой в водных растворах в лунку микропланшета люминометра вносили:

37,5 мкл водного раствора H_2O_2 ;

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

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

Общий объём реакционной смеси – 247,5 мкл

Калибровочная кривая была аппроксимирована линейной зависимостью с коэффициентом аппроксимации $R^2=0,99$. Уравнение данной зависимости (2.2) имеет вид:

$$I_{\max} = 56,5 \cdot C + 40,8, \quad (2.2)$$

где I_{\max} – максимальная интенсивность хемилюминесценции люминола;

C – концентрация H_2O_2 .

Для определения содержания АФК в водном 3%-ом растворе NaCl , контрольных нерадиоактивных образцах, в бактериальных суспензиях+Th-232, в бактериальных суспензиях+НТО, НТО+ГВ, НТО+ $\text{C}_{60,70}$ использовали калибровочную зависимость интенсивности хемилюминесценции люминола от концентрации H_2O_2 , которая представлена на Рисунке 2.2.

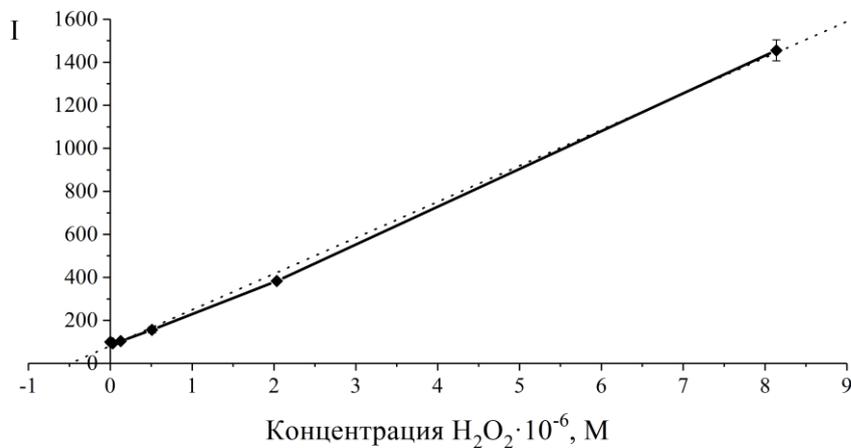


Рисунок 2.2 – Зависимость интенсивности хемилюминесценции люминола от концентрации H_2O_2 в 3%-ом растворе NaCl

Для получения калибровочной кривой в водных 3% растворах NaCl в лунку микропланшета люминометра вносили:

37,5 мкл раствора H_2O_2 в водном 3%-ом растворе NaCl;

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

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

Общий объём реакционной смеси – 247,5 мкл

Калибровочная кривая была аппроксимирована линейной зависимостью с коэффициентом аппроксимации $R^2=0,99$. Уравнение данной зависимости (2.3) имеет вид:

$$I_{\max} = 81,8 \cdot C + 167,5, \quad (2.3)$$

где I_{\max} – максимальная интенсивность хемилюминесценции люминола;

C – концентрация H_2O_2 .

Измерение хемилюминесцентного сигнала в бактериальных суспензиях и бактериальных суспензиях в присутствии радиоактивного образца и радиопротекторов проводилось сразу же после регистрации интенсивности биолюминесценции бактериальных суспензий. Для инициации хемилюминесцентного процесса в те же ячейки добавляли 27 мкл водно-щелочного раствора люминола ($C = 5 \cdot 10^{-4}$ М) и 75 мкл раствора $K_3[Fe(CN)_6]$ ($C = 10^{-3}$ М).

Содержание активных форм кислорода, $AФК^{rel}$, рассчитывали по формуле 2.4:

$$AФК^{rel} = \frac{[AФК]}{[AФК_K]}, \quad (2.4)$$

где $[AФК]$ – содержание АФК в радиоактивных суспензиях;

$[AФК_K]$ – содержание АФК в контрольных образцах.

2.4 Измерение скорости окисления НАДН в растворах различного состава в присутствии и в отсутствие Th-232

Влияние Th-232 на скорость окисления НАДН изучалось в растворах различного состава:

1) НАДН: 200 мкл $4 \cdot 10^{-4}$ М НАДН; 255 мкл 0,05 М калий-фосфатного буфера (рН 6,8); 55 мкл дистиллированной воды;

2) НАДН + КРАБ: 200 мкл $4 \cdot 10^{-4}$ М НАДН; 5 мкл КРАБ; 250 мкл 0,05 М калий-фосфатного буфера (рН 6,8); 55 мкл дистиллированной воды;

3) НАДН + ФМН: 200 мкл $4 \cdot 10^{-4}$ М НАДН; 50 мкл $5 \cdot 10^{-4}$ М ФМН; 255 мкл 0,05 М калий-фосфатного буфера (рН 6,8); 5 мкл дистиллированной воды;

4) НАДН + ФМН + КРАБ: 200 мкл $4 \cdot 10^{-4}$ М НАДН; 5 мкл КРАБ; 250 мкл 0,05 М калий-фосфатного буфера (рН 6,8); 50 мкл $5 \cdot 10^{-4}$ М ФМН; 5 мкл дистиллированной воды;

5) НАДН + Th-232: 200 мкл $4 \cdot 10^{-4}$ М НАДН; 50 мкл 10^{-6} М Th-232; 205 мкл 0,05 М калий-фосфатного буфера (рН 6,8); 55 мкл дистиллированной воды;

6) НАДН + КРАБ + Th-232: 200 мкл $4 \cdot 10^{-4}$ М НАДН; 5 мкл КРАБ; 50 мкл 10^{-6} М Th-232; 200 мкл 0,05 М калий-фосфатного буфера (рН 6,8); 55 мкл дистиллированной воды;

7) НАДН + ФМН + Th-232: 200 мкл $4 \cdot 10^{-4}$ М НАДН; 50 мкл 10^{-6} М Th-232; 50 мкл $5 \cdot 10^{-4}$ М ФМН; 205 мкл 0,05 М калий-фосфатного буфера (рН 6,8); 5 мкл дистиллированной воды;

8) НАДН + ФМН + КРАБ + Th-232: 200 мкл $4 \cdot 10^{-4}$ М НАДН; 5 мкл КРАБ; 50 мкл 10^{-6} М Th-232; 200 мкл 0,05 М калий-фосфатного буфера (рН 6,8); 50 мкл $5 \cdot 10^{-4}$ М ФМН; 5 мкл дистиллированной воды.

Скорость окисления НАДН, V , рассчитывали по формуле 2.5:

$$V = -\frac{\Delta C}{t}, \quad (2.5)$$

где ΔC – изменение концентрации НАДН;

t – время (10 мин).

ΔC рассчитывалось по формуле 2.6:

$$\Delta C = \frac{\Delta D}{\varepsilon l}, \quad (2.6)$$

где ΔD – изменение оптической плотности;

ε – молярный коэффициент экстинкции на длине волны 340 нм ($6250 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$);

l – оптический путь света в растворе (1 см).

2.5 Исследование воздействия трития в отсутствие и в присутствии гуминовых веществ на клетки крови кроликов

Эксперименты по исследованию воздействия трития на клетки крови кроликов проводились в 2023–2024 годах в лаборатории кафедры внутренних незаразных болезней, акушерства и физиологии сельскохозяйственных животных на зооферме Института прикладной биотехнологии и ветеринарной медицины в рамках совместного проекта РФФ №23-26-10018 Жигаревым А. А. и Федотовой А. С.

В экспериментах использовались калифорнийские кролики 7 месяцев (масса $4,45 \pm 0,35$ кг). Животные были разделены на экспериментальную (10 особей) и контрольную (15 особей) группы, содержались в одинаковых условиях с единым рационом.

Проводился клинический мониторинг физиологических параметров (температура тела, частоты дыхания и сердцебиения, состояние кожи, зубов и лимфатических узлов), а также исследовалась фагоцитарная активность лейкоцитов крови.

Экспериментальная группа получала НТО в дозе 2,5 МБк/сутки в течение 4, 10 и 20 дней. После этого вводили гуминовые вещества (10^{-3} г/л) в 1 МБк/л НТО

(НТО+ГВ) в течение 20 дней. Анализы крови проводились на 8-й, 13-й и 20-й день опыта.

Подробное описание методики и схема эксперимента представлены в Приложении А.

2.6 Статистическая обработка результатов

Каждое измерение проводили в 3–5 повторностях. Погрешность измерений интенсивности билюминесценции бактериальной, ферментативной систем и хемилюминесценции люминола не превышала соответственно 5, 10 и 15%.

Для оценки зависимости между относительной интенсивностью билюминесценции, I^{rel} , и содержанием АФК, $АФК^{rel}$, анализировали статистическую корреляционную связь между этими признаками: рассчитывали ранговые коэффициенты корреляции Спирмена – r – при помощи программы Statistica 10 (StatSoft Inc., США).

Для оценки различий между группами данных использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Уровень статистической значимости считали достоверными при $p \leq 0,05$ [233].

Статистическая обработка результатов, построение графиков и таблиц проводились с использованием пакетов прикладных программ MS Office (Microsoft, США) и Origin 2017 (OriginLab, США).

Глава 3 Результаты и их обсуждение

3.1 Воздействие нитрата тория-232 на интенсивность биолюминесценции морских бактерий в отсутствие и в присутствии потенциальных радиопротекторов

3.1.1 Воздействие нитрата тория-232 на люминесцентные морские бактерии

На Рисунке 3.1 представлены интенсивность биолюминесценции и содержание АФК в бактериальной суспензии при различных концентрациях нитрата тория-232 ($C = 10^{-15}$ – 10^{-3} М) при времени воздействия 1 час.

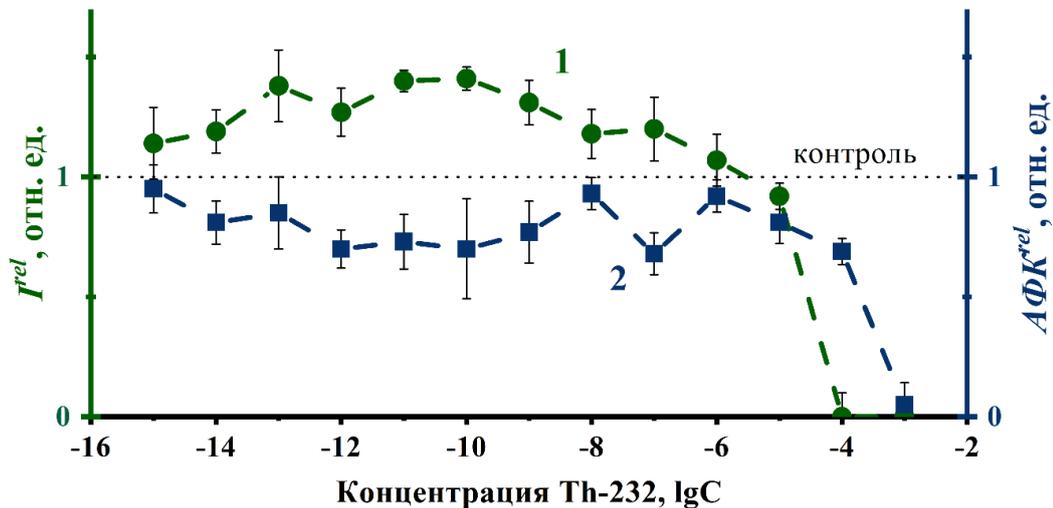


Рисунок 3.1 – Относительные значения (1) интенсивности биолюминесценции, I^{rel} , и (2) содержания активных форм кислорода, $АФК^{rel}$, в бактериальной суспензии при различных концентрациях нитрата тория-232. Время воздействия – 1 час. Содержание АФК в контрольном образце – $5,5 \cdot 10^{-6}$ М

При низких концентрациях нитрата тория (10^{-5} – 10^{-15} М) наблюдали умеренную активацию биолюминесценции ($1,0 < I^{rel} < 1,5$, Рисунок 3.1, кривая 1). Этот эффект соответствует модели гормезиса [96; 234; 235]. При высоких концентрациях ($> 10^{-5}$ М) происходило ингибирование ($I^{rel} < 1,0$) свечения.

В широком интервале концентраций тория (10^{-3} – 10^{-15} М) наблюдали снижение содержания АФК ($АФК^{rel} < 1$, Рисунок 3.1, кривая 2) по сравнению с

контрольным образцом. Наиболее выраженный спад наблюдали при высоких концентрациях тория, как и в случае биолюминесценции (Рисунок 3.1, кривая 1).

Была выявлена умеренная отрицательная корреляция ($r = -0,67$; $p \leq 0,05$) между зависимостями интенсивности биолюминесценции и содержания АФК от концентрации тория (Рисунок 3.1, кривые 1 и 2) в диапазоне его низких концентраций (10^{-15} – 10^{-6} М).

Были измерены значения pH в присутствии тория в бактериальных суспензиях (Рисунок 3.2А–Б); их величины составляли 5,4; 4,9; 4,0 и 3,4 при концентрациях 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} и 10^{-3} М соответственно. Рисунки демонстрируют, что высокие концентрации тория снижают содержание АФК и pH растворов сходным образом. Была выявлена положительная корреляция ($r = 0,74$; $p \leq 0,05$) между pH растворов и содержанием АФК в широком диапазоне концентраций тория (10^{-8} – 10^{-4} М). Следовательно, спад содержания АФК и биолюминесценции при высоких концентрациях тория-232 ($I^{rel} < 1$, Рисунок 3.1) можно объяснить повышением кислотности [236]. Известно, что интенсивность биолюминесцентных бактерий резко падает при $pH < 5$ [237].

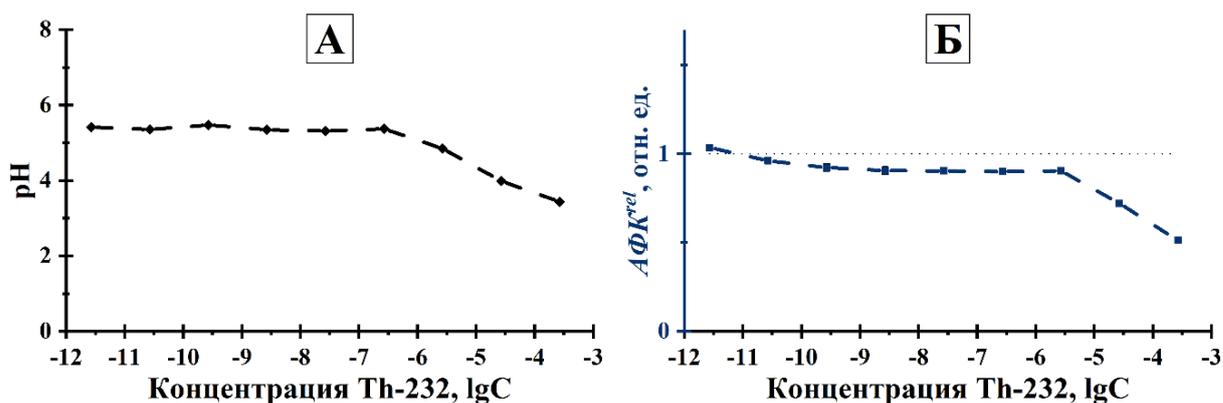


Рисунок 3.2 – pH растворов бактериальной суспензии (А) и содержание АФК, $AФК^{rel}$, (Б) и при различных концентрациях тория-232

Проанализированы кинетические кривые бактериальной биолюминесценции и содержания АФК в присутствии нитрата тория-232 при различных

концентрациях тория. В качестве примера на Рисунке 3.3 приведены кинетические кривые для I^{rel} и $A\Phi K^{rel}$ при концентрации тория-232, равной 10^{-10} М.

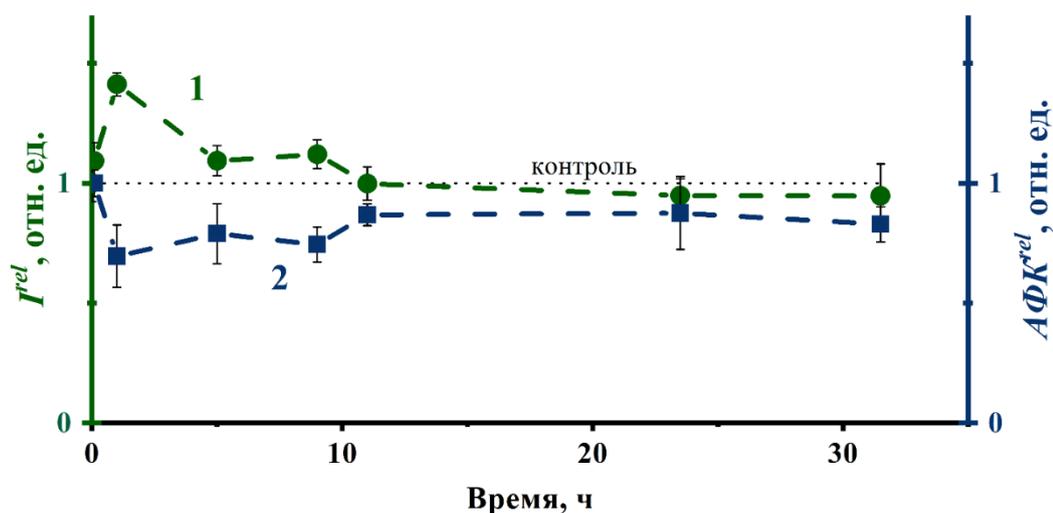


Рисунок 3.3 – Кинетика (1) бактериальной биолюминесценции, I^{rel} , и (2) содержание АФК, $A\Phi K^{rel}$, в присутствии нитрата тория-232. Концентрация нитрата тория-232 – 10^{-10} М

Эти кривые визуально подтверждают обратную взаимосвязь между интенсивностью бактериальной биолюминесценции и концентрацией АФК в растворах тория-232. Выявили умеренную обратную корреляцию ($r = -0,67$; $p \leq 0,05$) между зависимостями I^{rel} и $A\Phi K^{rel}$ от времени.

Следует отметить, что исследования проводили в условиях низкодозового облучения торием-232 ($< 10^{-5}$ Гр). Концентрационный интервал нитрата тория-232 был ограничен его низкой растворимостью при кислотности, соответствующей физиологической активности бактерий ($pH > 5,0$). Этот интервал ($C_{Th} < 10^{-6}$ М) соответствовал природным концентрациям Th(IV), растворенного в воде. Бактериальный биотест не обнаружил токсического (ингибирующего) эффекта тория-232 при физиологических значениях pH; наблюдались лишь умеренные, но достоверные активационные эффекты.

Вероятно, в нашем случае, умеренные активационные эффекты тория-232 следует приписать не его радиационной активности, а эффекту тяжелого металла.

Воздействия тяжёлых металлов на бактериальную биолюминесценцию изучено ранее [238; 239]. В работе [240] эффект нитрата уранила также был приписан не радиационным, а физико-химическим свойствам.

3.1.2 Воздействие нитрата тория-232 на бактериальные ферменты

Проанализировано влияние тория-232 на биолюминесценцию ферментативной системы и содержание АФК в этой системе (Рисунок 3.4).

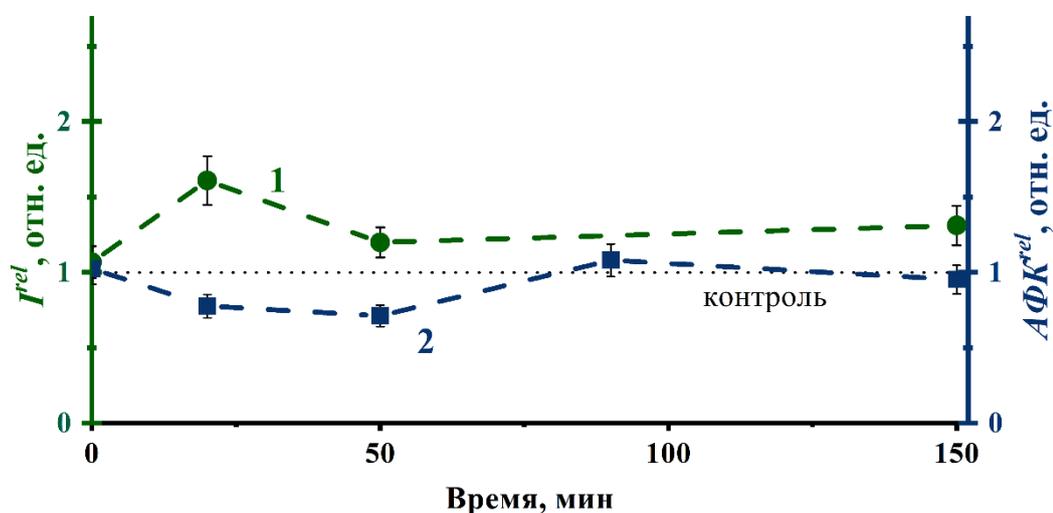


Рисунок 3.4 – Кинетика свечения (1), I^{rel} , и содержание активных форм кислорода (2), $АФК^{rel}$, в ферментативной системе в присутствии нитрата тория-232. Концентрация нитрата тория – 10^{-9} М

Из рисунка видно, что на начальном этапе воздействия тория наблюдается стадия активации биолюминесценции ($I^{rel} > 1$). Наличие активации указывает на применимость модели гормезиса [96; 241] к эффекту тория в ферментативной системе. Сравнение Рисунков 3.3 и 3.4 указывает на сходство эффектов тория в бактериальной и ферментативной системах. Вероятно, активация ферментативной системы вносит вклад в низкоконтрационные активационные эффекты тория-232 для клеточного организма.

С помощью спектрофотометрического метода определяли скорости окисления НАДН в ферментативной системе в присутствии тория-232. Результаты приведены в Таблице 3.1.

Таблица 3.1 – Скорости расходования НАДН в ферментативной системе с различным содержанием компонентов в отсутствие и присутствии тория-232. Длина волны регистрации оптической плотности = 340 нм. Концентрация тория-232 равна 10^{-7} М. Концентрация ГВ – 10^{-4} г/л [242]

№	Состав системы	$V \cdot 10^8$, М/мин		
		в отсутствие тория-232	в присутствии тория-232	в присутствии тория-232 и ГВ
1	НАДН	$2,0 \pm 0,3$	$6,1 \pm 0,5$	$8,8 \pm 0,6$
2	НАДН+ФМН	$16,2 \pm 0,4$	$26,7 \pm 0,7$	$36,8 \pm 0,8$

Из Таблицы 3.1 видно, что скорость автоокисления НАДН в среде равна 2,0 М/мин (первый столбец). Добавление эндогенного окислителя ФМН ускоряет реакцию расходования NADH в 8 раз (до 16,2 М/мин).

В растворе тория-232 (второй столбец) скорость автоокисления НАДН увеличивается в 3 раза (до 6,1 М/мин). Добавление эндогенного окислителя, ФМН, в систему не изменяет тенденцию увеличения. Этот результат указывает на то, что торий-232 повышает эффективность окислительно-восстановительных процессов с участием биологически важных молекул (НАДН и ФМН) и ферментов. Этот результат объясняет возможность активации биолюминесценции ферментативной системы в присутствии тория-232, продемонстрированной на Рисунке 3.4.

3.1.3 Изучение радиопротекторной активности гуминовых веществ и фуллеренола в растворах нитрата тория-232

В качестве потенциальных модификаторов природного происхождения были использованы гуминовые вещества (ГВ), которые представляют собой

высокомолекулярные органические соединения нерегулярного состава, образующиеся в результате разложения растительных и животных остатков под воздействием микроорганизмов и абиотических факторов окружающей среды.

Изучено влияние тория на бактериальную биолюминесценцию в отсутствие и присутствии ГВ. Полученные результаты приведены на Рисунке 3.5, где в качестве примера использована концентрация тория, равная 10^{-10} М, и концентрация ГВ, равная 10^{-4} г/л. Концентрация ГВ подобрана в предварительных экспериментах, как не влияющая на интенсивность биолюминесценции бактерий; она совпала с определенной ранее [146].

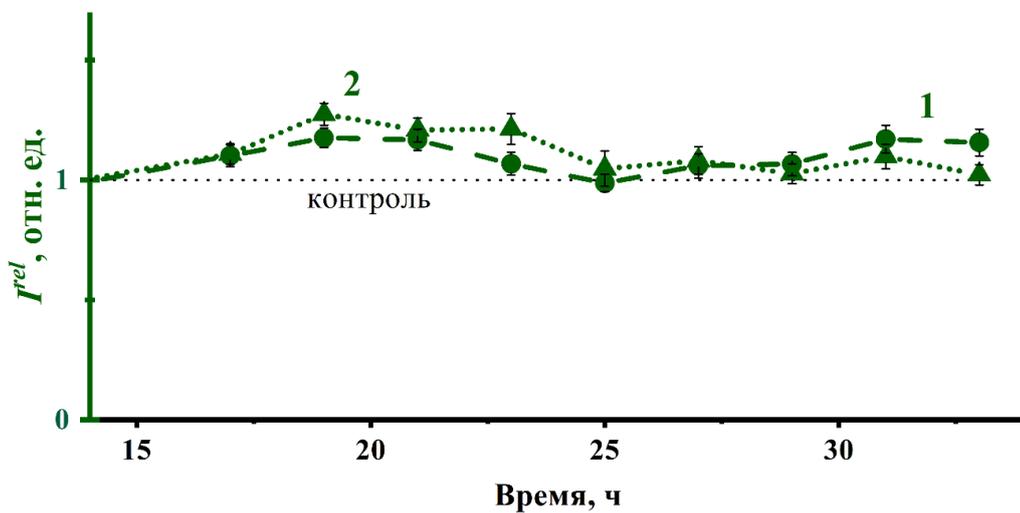


Рисунок 3.5 – Кинетика бактериальной биолюминесценции, I^{rel} , в присутствии тория-232 в отсутствие (1) и присутствии (2) гуминовых веществ. Концентрация тория-232 – 10^{-10} М. Концентрация гуминовых веществ – 10^{-4} г/л

Было обнаружено, что ГВ не изменяют кинетику биолюминесценции (Рисунок 3.5, кривая 1,2). Таким образом, модификация эффектов тория гуминовыми веществами не была обнаружена. Очевидно, что при малых концентрациях и небольших биоэффектах радионуклида модификация этих биоэффектов неэффективна. Влияния ГВ на содержание АФК также не обнаружено.

Проанализировано влияние ГВ на ферментативную систему в растворах нитрата тория-232. В качестве примера, на Рисунке 3.6А–Б приведены зависимости I^{rel} и $A\Phi K^{rel}$ от времени при концентрации тория, равной 10^{-9} М.

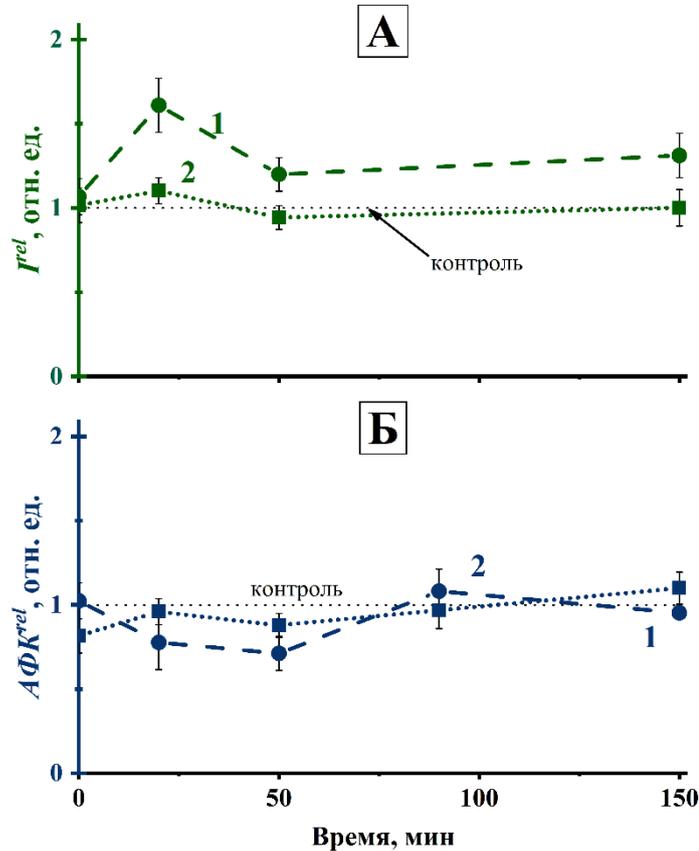


Рисунок 3.6 – Кинетика (А) свечения ферментативной системы, I^{rel} , и (Б) содержания АФК, $A\Phi K^{rel}$, в ферментативной системе при воздействии нитрата тория-232 в отсутствие (1) и присутствии (2) гуминовых веществ. Концентрация нитрата тория – 10^{-9} М. Концентрация гуминовых веществ – 10^{-4} г/л.

Концентрация АФК в контрольном образце – $9,1 \cdot 10^{-7}$ М

Как видно из Рисунка 3.6А, кривая 2, ГВ смещают кинетическую кривую к контролю ($I^{rel} \approx 1$), тем самым нейтрализуя воздействие тория на ферментативную систему. Однако такие изменения ферментативной активности под действием ГВ не проявились на клеточном уровне, как сказано выше.

Также было проанализировано влияние ГВ на изменение скорости окисления НАДН в присутствии тория-232. Как видно из сравнения двух последних столбцов

Таблицы 3.1, ГВ дополнительно увеличивают как скорость окисления НАДН, так и скорость окисления этого вещества в эндогенным окислителем ФМН (формула 1.2). Однако, Рисунок 3.6А продемонстрировал нам «смягчение» эффекта активации ферментативной билюминесценции гуминовыми веществами. Вероятно, другие процессы, не связанные с активацией ферментативных редокс процессов, ответственны за нейтрализацию эффекта тория гуматами в ферментативной билюминесцентной системе [243–245]. Это может быть комплексообразование с участием активных групп гуматов.

3.1.3 Изучение радиопротекторной активности фуллеренола в растворах нитрата тория-232

В качестве потенциального модификатора искусственного происхождения может выступать фуллеренол – водорастворимое производное фуллеренов.

Предварительно, перед проведением билюминесцентного тестирования была проанализирована интенсивность билюминесценции на интервале концентраций фуллеренола: 10^{-16} – 10^{-1} г/л. Результаты приведены на Рисунке 3.7.

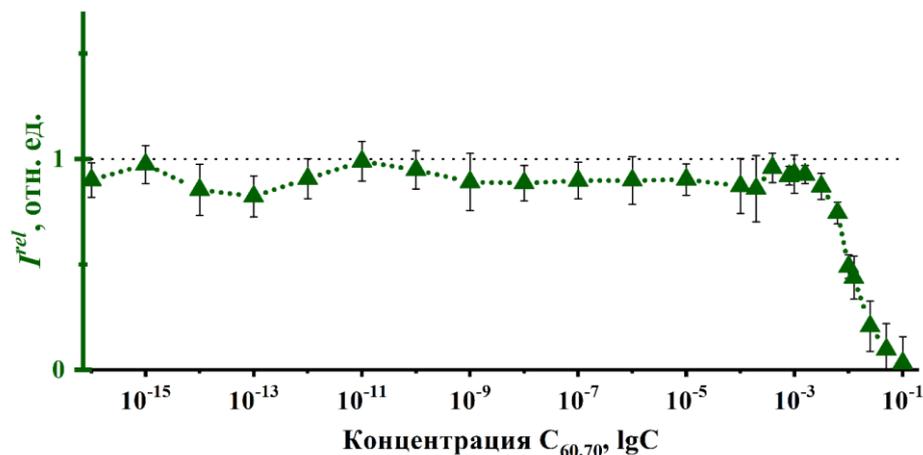


Рисунок 3.7 – Зависимость интенсивности бактериальной билюминесцентной системы от концентрации фуллеренола

Из рисунка видно, что фуллеренол на интервале концентраций 10^{-16} – $3 \cdot 10^{-3}$ г/л не изменяет интенсивность бактериальной биолюминесценции, а при концентрациях выше $3 \cdot 10^{-3}$ г/л – ингибирует свечение (Рисунок 3.7). Ингибирование свечения является свидетельством токсичности фуллеренола [153]. Для дальнейших экспериментов были выбраны такие концентрации фуллеренола: 10^{-16} – $3 \cdot 10^{-3}$ г/л.

Было исследовано влияние тория на бактериальную биолюминесценцию в отсутствие и присутствии фуллеренола. Кинетика биолюминесценции в отсутствие фуллеренола (система бактерии+торий-232) представлена на Рисунке 3.5. Добавление фуллеренола в систему бактерии+торий-232 не изменила кинетики биолюминесценции. Аналогичные результаты получены и при других концентрациях фуллеренола (10^{-11} – 10^{-7} г/л).

Таким образом, фуллеренол не модифицирует биоэффекты тория на бактерии и их ферментативную систему, что вероятно, связано с умеренными величинами этих биоэффектов (< 50%).

3.2 Влияние радионуклида трития на интенсивность биолюминесценции морских бактерий в отсутствие и в присутствии потенциальных радиопротекторов

3.2.1 Воздействие трития на интенсивность биолюминесценции и содержание активных форм кислорода

Интенсивность бактериальной биолюминесценции и содержание АФК при различных временах воздействия трития (в виде тритиевой воды, НТО) показаны на Рисунке 3.8.

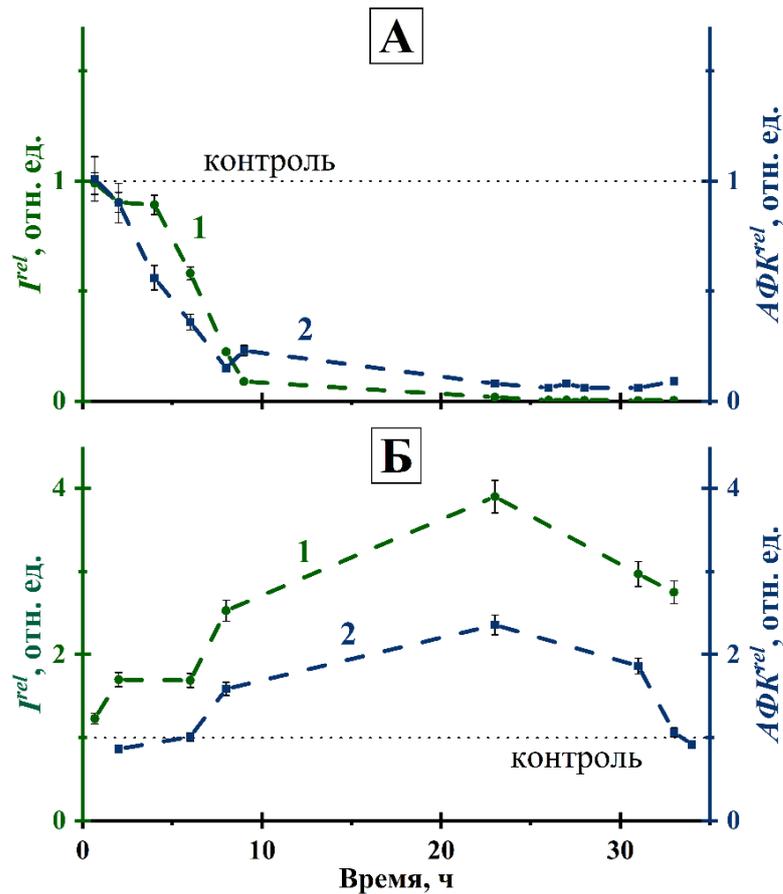


Рисунок 3.8 – Кинетика бактериальной биолюминесценции (1), I^{rel} , и содержание активных форм кислорода (2), $AФK^{rel}$, в тритиевой воде. Удельная активность НТО: (А) 2 МБк/л; (Б) 50 МБк/л

Из Рисунка 3.8 видно, что при низкой удельной активности (2 МБк/л) происходит ингибирование биолюминесцентного отклика (Рисунок 3.8А, кривая 1), а при повышении радиоактивности (50 МБк/л) – его активация (Рисунок 3.8Б, кривая 1). Данный эффект трития описывается моделью гормезиса, представленной на Рисунке 1.5. Известно, что в рамках этой модели, умеренное ингибирование физиологических функций при низких дозах соответствует стадии распознавания стресса, увеличение дозы приводит к активации (стадия адаптивного отклика с включением компенсаторных процессов), а повышение дозы – к ингибированию (стадия токсичности) [96; 233]. Мы полагаем, что эффекты на Рисунке 3.8А–Б соответствуют двум первым стадиям модели гормезиса.

Активация бактериальной биолюминесценции тритием продемонстрирована ранее в работах Селивановой и Кудряшевой [37; 217].

Как видно из Рисунка 3.8А–Б, кривые 2, тенденции изменения содержания АФК ($AФК^{rel}$) в бактериальной суспензии схожи с биолюминесцентными откликами (I^{rel}). Рассчитаны коэффициенты корреляции (r) между зависимостями I^{rel} и $AФК^{rel}$ от времени воздействия трития в бактериальной суспензии. Для удельной радиоактивности 2 МБк/л величина r составила 0,99 ($p \leq 0,05$), а для 50 МБк/л 0,70 ($p \leq 0,05$).

Так как тритий не изменяет содержание АФК в водной среде в отсутствие бактерий или ферментов [246], изменение содержания АФК в бактериальной суспензии связано, вероятно, с влиянием трития на клеточные процессы [222]. Так, известно [78], что ферментативный биолюминесцентный процесс включает световые и темновые пути генерации АФК с образованием интермедиатов биолюминесцентной реакции и H_2O_2 соответственно (Рисунок 1.4). Определяемый уровень АФК соответствует балансу между потреблением и генерацией АФК бактериями.

Также известно, что тритий в форме тритиевой воды равномерно облучает всю клетку, при этом происходит ионизация и возбуждение молекул воды и органических молекул с образованием АФК, что может приводить к активизации мембранных и внутриклеточных процессов в бактериях. Ранее в работе [222] была экспериментально показана роль ионизации среды тритием в процессах активации бактериальной биолюминесценции и сделано предположение об определяющей роли клеточной мембраны в этих процессах. Наши текущие данные подтверждают, что уровень АФК в бактериальных суспензиях в присутствии радионуклидов (в частности, трития) также связан с мембранными процессами.

3.2.2 Радиопротекторная активность гуминовых веществ в тритиевой воде

Было проанализировано влияние гуминовых веществ на кинетику биолюминесценции. Результаты представлены на Рисунке 3.9А–В.

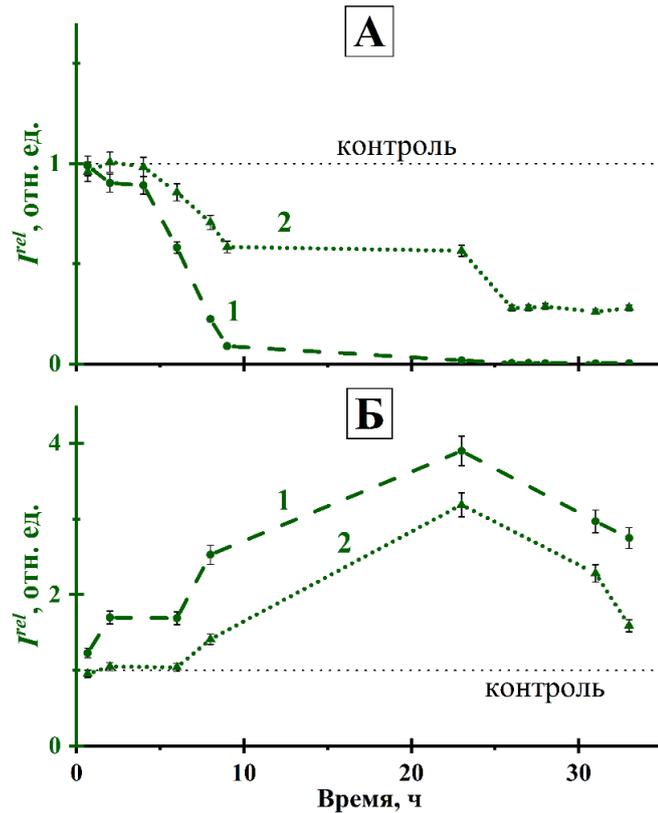


Рисунок 3.9 – Кинетика бактериальной биолюминесценции, I^{rel} , в тритиевой воде в отсутствие (1) и в присутствии (2) гуминовых веществ. Удельная активность НТО: (А) 2 МБк/л; (Б) 50 МБк/л. Концентрация гуминовых веществ – 10^{-3} г/л

Наблюдали, что ГВ смещают кинетические кривые ближе к контролю как в случае ингибирования (Рисунок 3.9А, кривая 2), так и в случае активации (Рисунок 3.9Б, кривая 2) биолюминесценции, нейтрализуя воздействие НТО.

Нейтрализующее действие ГВ может быть связано с их полифункциональностью. Поскольку ГВ содержат множество электронодонорных и электроноакцепторных групп, они могут действовать как своего рода “буфер” в процессах переноса электронов и нейтрализации радикальных процессов, в том числе и с участием АФК [38].

Проанализировано содержание АФК в бактериальных суспензиях с НТО в отсутствие и присутствии ГВ. Результаты представлены на Рисунке 3.10А–Б.

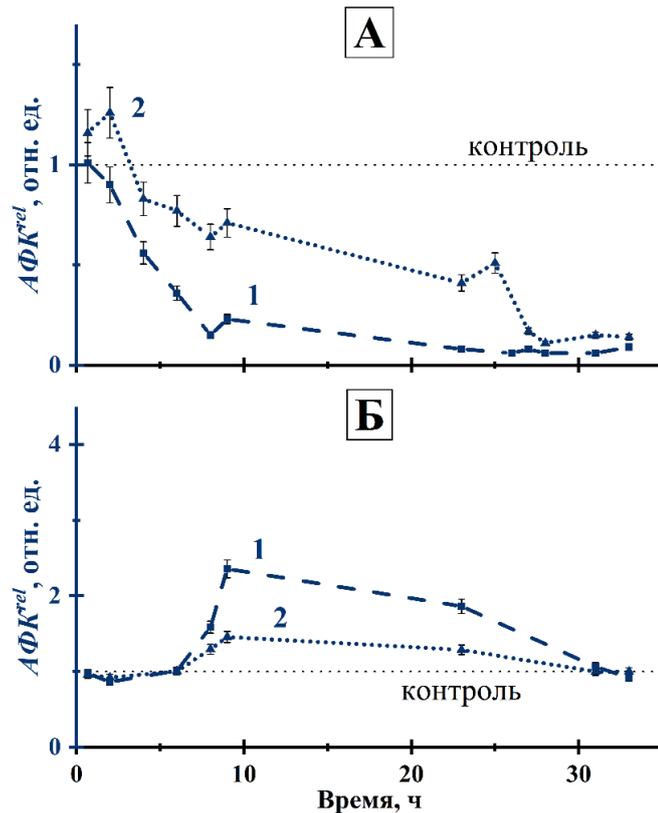


Рисунок 3.10 – Кинетика бактериальной биолюминесценции, I^{rel} , в тритиевой воде в отсутствие (1) и в присутствии (2) гуминовых веществ. Удельная активность НТО: (А) 2 МБк/л; (Б) 50 МБк/л. Концентрация гуминовых веществ – 10^{-3} г/л

Добавление ГВ приближает кинетические кривые к контролю (Рисунок 3.10А–Б, кривая 2), следовательно, «смягчает» действие НТО на АФК. Представленные данные подтверждают предположение о том, что эффект ГВ связан с их способностью к обратимому присоединению/отдаче электрона, приводящей к регулированию содержания радикальных кислородсодержащих частиц в бактериальной суспензии.

Полученные результаты свидетельствуют о вовлечении ГВ в регуляцию содержания АФК в бактериальных суспензиях и, следовательно, в изменения интенсивности бактериальной биолюминесценции. Для подтверждения этой взаимосвязи были рассчитаны коэффициенты корреляции между зависимостями интенсивности биолюминесценции и содержания АФК от времени в бактериальной суспензии в НТО + ГВ. Они составили 0,95 ($p \leq 0,05$).

Обращают на себя внимание различия между воздействиями радионуклидов тория-232 и трития на бактерии:

- эффективность активации биолюминесценции бактерий тритием была значительно выше;

- коэффициенты корреляции между зависимостями интенсивности биолюминесценции и содержания АФК от времени имели противоположные знаки.

Такие различия можно связать с различиями в радиационной и химической природе трития и тория, а также их содержания в бактериальной суспензии в условиях эксперимента. Как упоминалось ранее, тритий – бета-излучающий радионуклид с низкой энергией излучения (максимальная энергия бета-частиц 18,6 кэВ). Для бета-излучения характерна низкая линейная передача энергии (ЛПЭ) (~ 0.2–0.3 кэВ/мкм); пробег бета-частиц трития в клетках маленький – несколько мкм. Тритий в форме тритиевой воды создает равномерно распределенный окислительный стресс по всему объему клетки и стимулирует клеточный адаптационный отклик. Альфа-излучение тория характеризуется высокой ЛПЭ (~ 50–100 кэВ/мкм) и пробегом в клетке около 30 мкм, что приводит к сильным биологическим эффектам при высоких удельных активностях растворов. Однако из-за низкой удельной активности растворов в данном исследовании (~ 1 мБк/л) умеренную активацию биолюминесценции вероятно следует рассматривать как низкоконцентрационный эффект тяжелого металла в биологических системах.

3.2.3 Радиопротекторная активность фуллеренола в тритиевой воде

Изучено влияние трития на бактериальную биолюминесценцию в отсутствие и в присутствии фуллеренола. В качестве примера активности фуллеренола на Рисунке 3.11 приведены кинетические кривые биолюминесценции бактерий в НТО в отсутствие (1) и в присутствии (2) фуллеренола при активности НТО 500 МБк/л и концентрации фуллеренола 10^{-11} г/л.

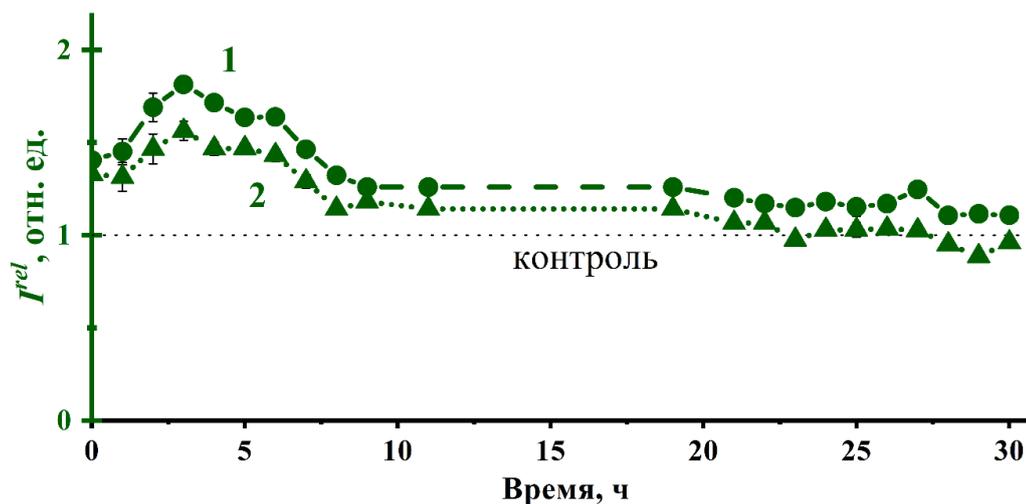


Рисунок 3.11 – Кинетика бактериальной биолюминесценции, I^{rel} , в тритиевой воде в отсутствие (1) и в присутствии (2) фуллеренола. Удельная активность НТО равна 500 МБк/л. Концентрация фуллеренола равна 10^{-11} г/л

Из рисунка видно, что в отсутствие фуллеренола происходила активация биолюминесценции (Рисунок 3.11, кривая 1) при хроническом воздействии от 0 до 9 часов. Интенсивность биолюминесценции снижалась во времени до контрольных значений. В присутствии фуллеренола (Рисунок 3.11, кривая 2) наблюдалось небольшое, но достоверное смещение кинетической кривой ближе к контролю, что соответствует нейтрализации эффектов трития. Этот результат связан с антирадикальными свойствами фуллеренола [152; 157].

Активация бактериальной биолюминесценции и ферментативных реакций тритием наблюдалась в предыдущих работах [43; 217; 222; 246; 247]. Она была связана со стимуляцией внутриклеточных и мембранных процессов и описана моделью гормезиса. Известно, что АФК способны накапливаться в радиоактивной бактериальной среде, стимулируя интенсивность биолюминесценции [43; 214].

Для выяснения механизма радиозащитного действия было проведено сравнение интенсивности биолюминесценции бактериальной и ферментативной системах в растворе НТО (500 МБк/л); изучено влияние фуллеренола (при концентрации 10^{-11} г/л) на содержание АФК в бактериальной суспензии.

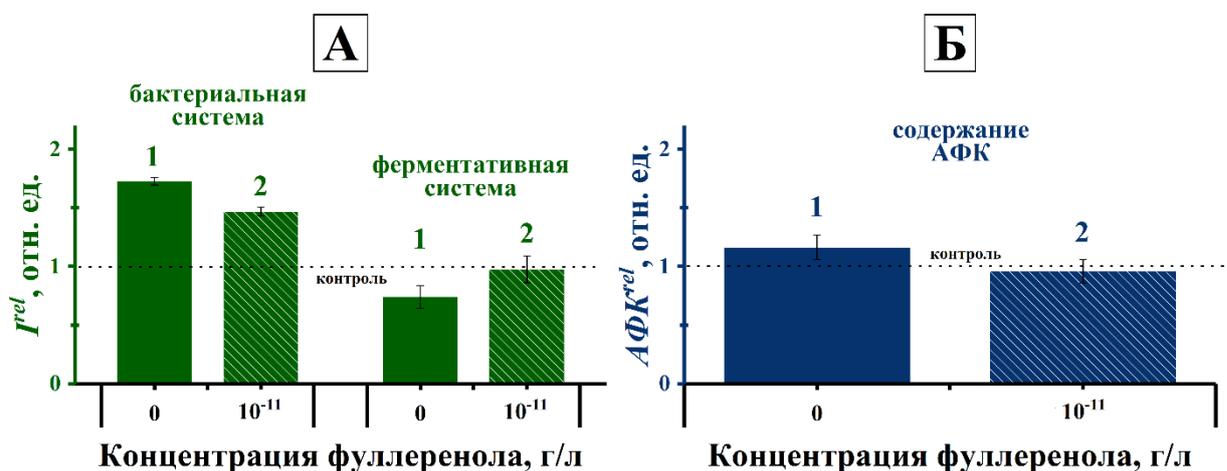


Рисунок 3.12 – Относительная интенсивность билюминесценции, I^{rel} , и содержание АФК, AFK^{rel} , в НТО в отсутствие (1) и в присутствии (2) фуллеренола ($C = 10^{-11}$ г/л). Время воздействия – 4 часа. Удельная радиоактивность НТО – 500 МБк/л. (А) бактериальная и ферментативная билюминесценция, (Б) содержание АФК в бактериальной среде в присутствии НТО. Контроль соответствует отсутствию НТО и фуллеренола

Из рисунка видно, что тритий активирует бактериальную билюминесценцию (Рисунок 3.12А, столбец 1) при воздействии до 4 часов. Добавление фуллеренола (Рисунок 3.12А, столбец 2) уменьшает активацию тритием, приближая значение I^{rel} к контролю. Нейтрализация трития фуллеренолом сохраняется и при более длительном воздействии (Рисунок 3.11, кривая 2).

Наблюдали достоверное снижение I^{rel} билюминесценции ферментативной системы до 0,75 в присутствии НТО (Рисунок 3.12Б, столбец 1), связанное вероятно с повышением ионизации среды [36; 248]. Добавление фуллеренола нейтрализовало этот эффект (Рисунок 3.12А, столбец 2), что объясняется возможностью его участия в процессах перераспределения электронной плотности в водных средах.

Таким образом, на примере клеточного и ферментативного билюминесцентных процессов показано, что фуллеренол обладает радиопротекторными свойствами, приближая интенсивность билюминесценции бактерий к контрольным значениям ($I^{rel} \approx 1$). Вероятно, это связано с

электроакцепторной (антрадикальной) активностью фуллеренола, способствующей снижению АФК.

Зарегистрировано небольшое, но достоверное увеличение содержания АФК в бактериальной суспензии при воздействии трития (до $I^{rel} = 1,2$, Рисунок 3.12Б, столбец 1). Добавление фуллеренола приблизило содержание АФК к контролю (Рисунок 3.12Б, столбец 2). Этот эффект иллюстрирует антирадикальную активность фуллеренола в бактериальной суспензии, которая была проиллюстрирована ранее [153; 165].

3.3 Возможность прогнозирования низкодозовых воздействий трития на клеточные процессы высших организмов на основе бактериального биотеста

3.3.1 Сравнение эффектов трития на интенсивность биолюминесценции бактерий и фагоцитарную активность лейкоцитов кроликов

Был проведён анализ образцов крови кроликов для оценки влияния трития на высшие организмы (детали методики приведены в приложении А). Проведено сопоставление с воздействием трития на люминесцентные бактерии. На Рисунке 3.13 представлены зависимости интенсивности биолюминесценции бактерий и фагоцитарной активности лейкоцитов крови кроликов от дозы трития (в виде тритиевой воды, НТО).

Поглощённые дозы 0,01; 0,05; 0,14; 0,19; 0,30 и 0,34 мГр соответствовали 2, 8, 21, 29, 47 и 53 часам воздействия НТО на бактерии.

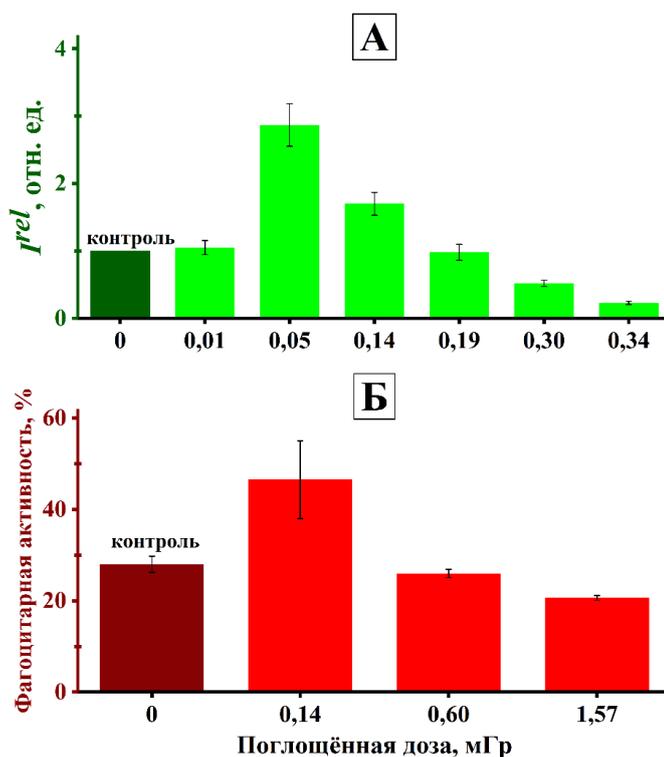


Рисунок 3.13 – Зависимости относительной интенсивности биолюминесценции бактерий, I^{rel} (А) и фагоцитарной активности лейкоцитов крови кроликов (Б) от дозы трития. Удельная активность НТО: (А) 2 МБк/л; (Б) 1 МБк/л

Из Рисунка 3.13А видно, что зависимость интенсивности биолюминесценции I^{rel} включает активацию данной физиологической функции бактерий при малых дозах (0,05 и 0,14 мГр) и ее ингибирование при более высоких дозах (0,30 и 0,34 мГр). Такой тип отклика организма соответствует модели гормезиса [96; 233].

Известно, что периферическая кровь животных чувствительна к факторам окружающей среды, включая ионизирующее излучение [249–251], поэтому именно активность клеток лейкоцитов была выбрана в качестве показателя физиологической активности высшего организма. Была оценена фагоцитарная активность лейкоцитов в 75 образцах крови кроликов. На Рисунке 3.13Б представлена зависимость фагоцитарной активности лейкоцитов от дозы трития. Поглощённые дозы 0,14; 0,6 и 1,57 мГр соответствовали 4, 10 и 20 дням воздействия НТО.

Воздействие трития при дозе 0,14 мГр увеличивало фагоцитарную активность на 70% ($p \leq 0,05$), более высокие дозы трития (0,6 и 1,57 мГр) снижали

фагоцитарную активность лейкоцитов (Рисунок 3.13Б). Снижение фагоцитарной активности рассматривается как негативный результат радиационного воздействия, указывающий на ослабление иммунобиологической активности организма животного.

Таким образом, реакции бактерий и лейкоцитов кроликов на низкодозовое облучение тритием идентичны: они включают стадии активации и ингибирования и соответствуют модели гормезиса [41; 88; 96; 241]. Однако дозовые диапазоны ответных реакций у кроликов и бактерий различаются: у бактерий реакция проявляется при более низких дозах, чем у кроликов (Рисунок 3.13А–Б).

Важно отметить, что общие физиологические показатели (температура тела, частота дыхания, частота сердечных сокращений, масса тела и др.) находились в пределах физиологической нормы в условиях низкодозового воздействия трития.

3.3.2 Сравнение радиопротекторной активности гуминовых веществ в отношении клеток бактерий и лейкоцитов кроликов

Была изучена радиопротекторная активность ГВ в отношении клеток бактерий и лейкоцитов крови кроликов. На Рисунке 3.14А–Б представлены зависимости физиологических функций клеток от времени воздействия ГВ в присутствии трития.

Радиотоксичная (ингибирующая) доза НТО (0,34 мГр, Рисунок 3.13А) была выбрана для изучения радиопротекторной активности ГВ в бактериальной суспензии.

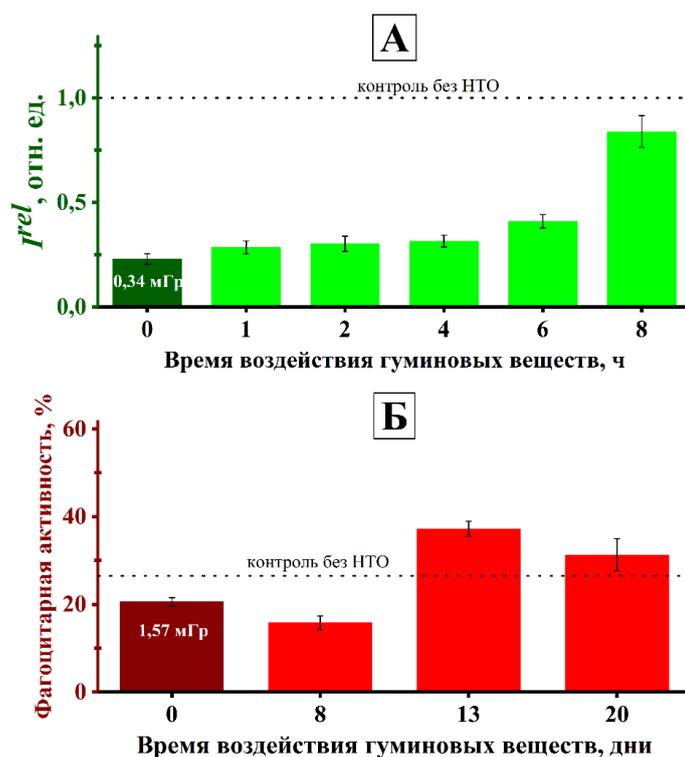


Рисунок 3.14 – Зависимости относительной интенсивности биолюминесценции бактерий, I^{rel} (А) и фагоцитарной активности лейкоцитов крови кроликов (Б) от времени воздействия гуминовых веществ в присутствии трития. Концентрация гуминовых веществ – 10^{-3} М

Добавление ГВ в суспензии бактерий в присутствии трития увеличило интенсивность биолюминесценции I^{rel} (Рисунок 3.14А), приблизив ее к контрольному значению для бактерий, не подвергавшихся воздействию трития. Таким образом, мы наблюдали компенсаторный эффект ГВ, зависящий от времени, т.е. нейтрализацию эффектов НТО в бактериальных суспензиях.

Для изучения радиопротекторной активности ГВ для организмов кроликов, подвергшихся воздействию НТО, была выбрана доза 1,57 мГр, достоверно ($p \leq 0,05$) снизившая активность лейкоцитов по отношению к контролю без НТО на 26% (Рисунок 3.14Б). Кратковременное воздействие НТО+ГВ (8 дней) дополнительно снижало фагоцитарную активность лейкоцитов (Рисунок 3.14Б) на 44% ($p \leq 0,001$). Только более длительное воздействие ГВ (13 и 20 дней) повышало фагоцитарную активность лейкоцитов (Рисунок 3.14Б), полностью нейтрализовало негативное влияние НТО, что свидетельствует о радиопротекторной активности ГВ для высшего организма.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе проанализированы биоэффекты радионуклидов альфа- и бета-типа (торий-232 и тритий) с использованием биолюминесцентных тестовых систем – клеточной и ферментативной. Биоэффекты исследованы в отсутствие и в присутствии потенциальных модификаторов природного и искусственного происхождения – гуминовых веществ и фуллеренола. Проведен анализ изменений интенсивности биолюминесценции бактерий, содержания АФК и ферментативной активности в клетках.

Полученные результаты позволили сделать следующие **выводы**:

1. Продемонстрировано, что нитрат тория-232 умеренно активизирует биолюминесценцию бактерий и их ферментативной системы при низкодозовом воздействии ($< 10^{-5}$ Гр; $C_{Th} < 10^{-6}$ М) в физиологическом интервале кислотности среды ($pH > 5,0$). Токсического (ингибирующего) эффекта нитрата тория-232 не обнаружено. Анализ содержания АФК и скоростей ферментативной НАДН-зависимой реакции в присутствии тория-232 указывает на интенсификацию ферментативных редокс-процессов при воздействии тория-232 на бактерии;

2. Установлено, что в растворах тория-232 гуминовые вещества не модифицируют биолюминесцентный отклик бактерий, и умеренно нейтрализуют воздействия тория-232 на ферменты. Фуллеренол не модифицирует биоэффекты тория на бактерии и их ферментативную систему, что вероятно, связано с малыми величинами этих биоэффектов (до 30–50%) при низких концентрациях растворенного тория-232;

3. Показано, что изменение интенсивности биолюминесценции бактерий (активация и ингибирование) при низкодозовом воздействии трития ($< 0,05$ Гр) сопровождается изменением содержания АФК в бактериальной суспензии. Выявлены высокие положительные корреляции между интенсивностью биолюминесценции и содержанием АФК, что указывает на подвижность баланса между производством и потреблением АФК бактериями в биолюминесцентном процессе;

4. Выявлена радиопротекторная активность гуминовых веществ и фуллеренола в растворах бета-излучающего радионуклида трития: эти соединения уменьшили отклонения интенсивности биолюминесценции бактерий и уровня АФК от контроля, как в случае активации, так и случае ингибирования;

5. Показано, что изменения интенсивности биолюминесценции бактерий и фагоцитарной активности лейкоцитов кроликов в условиях низкодозового воздействия трития идентичны и соответствуют модели гормезиса. Гуминовые вещества нейтрализуют ингибирующие воздействия трития на клетки крови кроликов и бактерий.

Таким образом, полученные данные подтверждают перспективность использования люминесцентного бактериального биотеста для оценки радиационных рисков и радиомодифицирующей активности биоактивных соединений. Люминесцентные бактерии могут использоваться в качестве экспресс-биотеста для оценки радиоактивного воздействия на клеточные процессы в высших организмах, а также радиопротекторной активности биологически активных веществ.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

НТО – тритиевая вода;

I – интенсивность биолюминесцентного или хемилюминесцентного сигнала;

P. phosphoreum – *Photobacterium phosphoreum*;

РСНО – альдегид (тетрадеканаль);

V. fischeri – *Vibrio fischeri*;

АФК – активные формы кислорода;

ГВ – гуминовые вещества;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

КРАБ – комплект реактивов аналитической биолюминесценции;

НАД(Ф)Н – никотинамиллинуклеотидфосфат;

НАДН – никотинамиддинуклеотид;

ФМН – флавинмононуклеотид;

ЛПЭ – линейная передача энергии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иоффе, А. Ф. О физике и физиках / А. Ф. Иоффе. – Л. : Наука, 1977. – 260 с.
2. Cember, H. Introduction to Health Physics / H. Cember, T. E. Johnson. – 4th edition. – New York City : McGraw-Hill Education, 2008. – 864 p. – ISBN 978-0071423083.
3. Erdmann, F. Environmental Agents and Childhood Cancer / F. Erdmann, A. Ghantous, J. Schüz // Encyclopedia of Environmental Health. – Oxford, 2019. – ISBN 9780128042397. – P. 347-359.
4. Ray, K. Toxicity of Radiation: Biological Effects of Ionizing Radiation Exposure on Reproduction / K. Ray // Reproductive and Developmental Toxicology. – London, 2017. – ISBN 9780128042397. – P. 359–375.
5. Mehta, K. Radiation: Basic principles / K. Mehta // Journal of Vascular Surgery. – 2005. – Vol. 42, Iss. 6. – P. 1237–1238.
6. Schmitz, K. S. Quantum Energies for Central Potentials / K. S. Schmitz // Physical Chemistry. – 2017. – ISBN 9780128005149. – P. 413–460.
7. Kónya, J. Radioactive Decay / J. Kónya, N. Nagy // Nuclear and Radiochemistry. – 2018. – ISBN 9780128136447 – P. 49–84.
8. Airey, P. The Scientific Basis / P. Airey, T. Hinton, J. Twining // Radioactivity in the Environment. – 2012. – ISBN 9780080450162. – P. 1–57.
9. Qi, C. Alpha decay as a probe for the structure of neutron-deficient nuclei / C. Qi // Reviews in Physics. – 2016. – Vol. 1. – P. 77–89.
10. Несмеянов, А. Н. Радиохимия : учебник для студентов химических факультетов / А. Н. Несмеянов. – 2-е изд., перераб. – Москва : Химия, 1978. – 560 с.
11. L’Annunziata, M. F. Chapter 11 – Alpha Radiation / M. F. L’Annunziata // Radioactivity. – Boston, 2023. – ISBN 978-0-323-90440-7. – P. 653–665.
12. L’Annunziata, M. F. Alpha Radiation / M. F. L’Annunziata // Radioactivity. – 2016. – ISBN 9780444634894. – P. 123–134.

13. Obertelli, A. Beta Decay Strength and Half-Life / A. Obertelli, H. Sagawa // *Modern nuclear physics : from fundamentals to frontiers*. – 2021. – ISBN 978-981-16-2289-2. – P. 207–219.

14. Gökmen, U. Impact of the gamma and neutron attenuation behaviors on the functionally graded composite materials / U. Gökmen, Z. Özkan, S. B. Ocak // *Physica Scripta*. – 2021. – Vol. 96, Iss. 12. – P. 125326.

15. Matsumoto, H. Health effects triggered by tritium: how do we get public understanding based on scientifically supported evidence? / H. Matsumoto, Y. Shimada, A. J. Nakamura [et al.] // *Journal of Radiation Research*. – 2021. – Vol. 62, Iss. 4. – P. 557–563.

16. Loveland, W. Nuclear Chemistry / W. Loveland // *Encyclopedia of Physical Science and Technology*. – 2003. – P. 597–615.

17. Иванов, С. А. Влияние нейтронного облучения на характеристики фазовых переходов в многофункциональных материалах со структурой перовскита (обзор) / С. А. Иванов, А. И. Сташ // *Журнал неорганической химии*. – 2020. – Т. 65, № 12. – С. 1581–1613.

18. Пышкина, М. Д. Совершенствование системы индивидуального дозиметрического контроля нейтронного излучения на объектах использования атомной энергии : специальность 2.4.9 «Ядерные энергетические установки, топливный цикл, радиационная безопасность» : диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук / Пышкина Мария Дмитриевна ; Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина. – Екатеринбург, 2022. – 154 с.

19. Bless, A. A. Biological effects of neutron radiation / A. A. Bless // *Proceedings of the Florida Academy of Sciences*. – 1943. – Vol. 6, Iss. 1. – P. 25–28.

20. X-rays // National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering (NIBIB) : официальный сайт. – URL: <https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/x-rays> (дата обращения: 08.07.2024).

21. Tonnessen, B. H. Radiation physics / B. H. Tonnessen, L. Pounds // *Journal of Vascular Surgery*. – 2011. – Vol. 53, Iss 1. – P. 6S-8S.

22. Obodovskiy, I. Nuclei and Nuclear Radiations / I. Obodovskiy // Radiation. – 2019. – ISBN 9780444639790. – P. 41-62.

23. Külahcı, F. On the determination of transportation, range and distribution characteristics of Uranium-238, Thorium-232 and Potassium-40: a critical review / F. Külahcı, Ş. Çiçek // Environmental Earth Sciences. – 2019. – Vol. 78, Iss. 24. – P. 721.

24. Phaniendra, A. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases / A. Phaniendra, D. Jestadi, L. Periyasamy // Indian Journal of Clinical Biochemistry. – 2015. – Vol. 30, Iss. 1. – P. 11–26.

25. Vengosh, A. A critical review on the occurrence and distribution of the uranium- and thorium-decay nuclides and their effect on the quality of groundwater / A. Vengosh, R. M. Coyte, J. Podgorsky, T. M. Johnson // Science of the Total Environment. – 2022. – Vol. 808. – P. 151914.

26. Жерин, И. И. Торий / И. И. Жерин, Г. Н. Амелина // Химия тория, урана, плутония. – Томск, 2010. – С. 19–24.

27. Hassan, S. S. M. Removal of Uranium-238, Thorium-232, and Potassium-40 from Wastewater via Adsorption on Multiwalled Carbon Nanotubes / S. S. M. Hassan, E. M. A. Rahman, G. M. El-Subruti [et al.] // ACS Omega. – 2022. – Vol. 7, Iss 14. – P. 12342–12353.

28. Eyrolle, F. An updated review on tritium in the environment / F. Eyrolle, L. Ducros, S. Le Dizès [et al.] // Journal of Environmental Radioactivity. – 2018. – Vol. 181. – P.128–137.

29. Feng, B. Levels and behavior of environmental tritium in East Asia / B. Feng, W.-H. Zhuo // Nuclear Science and Techniques. – 2022. – Vol. 33, Iss. 7. – P. 86.

30. Ojovan, M. I. Short-Lived Waste Radionuclides / M. I. Ojovan, W. E. Lee, S. N. Kalmykov // An Introduction to Nuclear Waste Immobilisation. – 2019. – ISBN 978-0081027028. – P. 145-154.

31. Geyh, M. A. Radiometric Dating Methods / M. A. Geyh, H. Schleicher // Absolute Age Determination. – Berlin, 1990. – ISBN 978-3-540-51276-9. – P. 51-134.

32. Libby, W. F. Moratorium tritium geophysics / W. F. Libby // Journal of Geophysical Research. – 1963. – Vol. 68, Iss. 15. – P. 4485-4494.

33. Larsen, G. An Evaluation of the Global Effects of Tritium Emissions from Nuclear Fusion Power / G. Larsen, D. Babineau // *Fusion Engineering and Design*. – 2020. – Vol. 158. – P. 111690.

34. Cook, G. T. Environmental liquid scintillation analysis / G. T. Cook, C. J. Passo, B. Carter // *Handbook of Radioactivity Analysis*. – 2003. – ISBN 9780080495057. – P. 537-607.

35. Kendall, C. Stable Isotope Applications in Hydrologic Studies / C. Kendall, D. H. Doctor // *Treatise on Geochemistry*. – 2003. – P. 319-364.

36. Бондарева, Л. Г. Тритий. Теория, практика, последствия : монография / Л. Г. Бондарева, М. Я. Чеботина, С. Ю. Артамонова, И. Г. Тананаев. – Апатиты : Изд-во Кольского научного центра, 2024. – 359 с. – ISBN 978-5-91137-499-0.

37. Selivanova, M. A. Effect of tritium on luminous marine bacteria and enzyme reactions / M. A. Selivanova, O. A. Mogilnaya, G. A. Badun [et al.] // *Journal of Environmental Radioactivity*. – 2013. – Vol. 120. – P. 19-25.

38. Rozhko, T. V. Humic Substances Mitigate the Impact of Tritium on Luminous Marine Bacteria. Involvement of Reactive Oxygen Species / T. V. Rozhko, O. V. Kolesnik, G. A. Badun, D. I. Stom, N. S. Kudryasheva // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21, Iss 18. – P. 6783.

39. Раков, А.Л. Внутренние болезни. Военно-полевая терапия : учебное пособие / А. Л. Раков, А. Е. Сосюкин. – СПб : Фолиант, 2003. – 384 с. – ISBN 5939290655.

40. Иминова, Д. Е. Радиоактивный тритий – загрязнитель водных объектов / Д. Е. Иминова // *Молодой учёный*. – 2017. – Т. 6. – С. 29-32.

41. Zapponi G. A. Low-Dose Risk, Hormesis, Analogical and Logical Thinking / G. A. Zapponi, I. Marcello // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2006. – Vol. 1076, Iss 1. – P. 839-857.

42. Nakamura, H. Molecular dynamics study on DNA damage by tritium disintegration / H. Nakamura, H. Miyanishi, T. Yasunaga [et al.] // *Japanese Journal of Applied Physics*. – 2020. – Vol. 59. – P. SAAE01.

43. Rozhko, T. V. Reactive Oxygen Species and low-dose effects of tritium on bacterial cells / T. V. Rozhko, E. I. Nogovitsyna, G. A. Badun [et al.] // *Journal of Environmental Radioactivity*. – 2019. – Vol. 208-209. – P. 106035.

44. Desouky, O. Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation / O. Desouky, N. Ding, G. Zhou // *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. – 2015. – Vol. 8, Iss 2. – P. 247-254.

45. Mohan, S. Chapter 18 - Biological effects of radiation / S. Mohan, V. Chopra // *Woodhead Publishing Series in Electronic and Optical Materials*. – 2022. – ISBN 978-0-323-85471-9. – P. 485-508.

46. 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.

47. Кудряшов, Ю. Б. Радиационная биофизика (ионизирующие излучения) / Ю. Б. Кудряшов. – Москва : Физмалит, 2004. – 446 с.

48. Li, T. The biological effects of radiation-induced liver damage and its natural protective medicine / T. Li, Y. Cao, B. Li, R. Dai // *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. – 2021. – Vol. 167. – P. 87-95.

49. Varès, G. Mutagenic adaptive response to high-LET radiation in human lymphoblastoid cells exposed to low doses of heavy-ion radiation / G. Varès, B. Wang, K. Tanaka [et al.] // *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. – 2011. – Vol. 712, Iss. 1-2. – P. 49-54.

50. Zhang, Y. Ionizing radiation-induced DNA damage responses affect cell compressibility / Y. Zhang, Q. Fu, T. Huang [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2022. – Vol. 603. – P. 116-122.

51. Chen, J. Cellular DNA effects of radiation and cancer risk assessment in cells with mitochondrial defects / J. Chen, D. M. Sridharan, C. L. Cross, J. M. Pluth // *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. – 2022. – Vol. 15, Iss. 1. – P. 89-94.

52. Смагин, А. И. Биологическое действие и защита от ионизирующих излучений : учебное пособие / А. И. Смагин. – Челябинск : Изд-во ЮУрГУ, 2018. – 117 с. – ISBN 978-5-696-05056-0.

53. Huang, Y. Assessing OBT formation and enrichment: ROS signaling is involved in the radiation hormesis induced by tritium exposure in algae / Y. Huang, M. Qin, J. Lai [et al] // *Journal of Hazardous Materials*. – 2023. – Vol. 443. – P. 130159.

54. Collin, F. Chemical basis of reactive oxygen species reactivity and involvement in neurodegenerative diseases / F. Collin // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20, Iss. 10. – P. 2407.

55. Yu, W. Chemiluminescence detection of reactive oxygen species generation and potential environmental applications / W. Yu, L. Zhao // *TrAC – Trends in Analytical Chemistry*. – 2021. – Vol. 136. – P. 116197.

56. 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, Iss. 7. – P. 385-396.

57. Hayyan, M. Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications / M. Hayyan, M. A. Hashim, I. M. AlNashef // *Chemical Reviews*. – 2016. – Vol. 116, Iss. 5. – P. 3029–3085.

58. Dickinson, B. C. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses / B. C. Dickinson, C. J. Chang // *Nature Chemical Biology*. – 2011. – Vol. 7, Iss. 8. – P. 504-511.

59. Zakhvataev, V. E. Stress-induced bystander signaling as a possible factor contributing to neuronal excitability and seizure generation/epileptogenesis / V. E. Zakhvataev // *Medical Hypotheses*. – 2016. – Vol. 90. – P. 57-62.

60. Liberti, M. V. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? / M. V. Liberti, J. W. Locasale // *Trends in Biochemical Sciences*. – 2016. – Vol. 41, Iss. 3. – P. 211-218.

61. Moloney, J. N. ROS signalling in the biology of cancer / J. N. Moloney, T. G. Cotter // *Seminars in Cell & Developmental Biology*. – 2018. – Vol. 80. – P. 50-64.

62. Fetoni, A. R. Targeting dysregulation of redox homeostasis in noise-induced hearing loss: Oxidative stress and ROS signaling / A. R. Fetoni, F. Paciello, R. Rolesi [et al.] // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2019. – Vol. 135. – P. 46-59.

63. Proctor, P. Electron-transfer factors in psychosis and dyskinesia / P. Proctor // *Physiological chemistry and physics*. – 1972. – Vol. 4, Iss. 4. – P. 349-60.

64. 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, Iss. 2. – P. 345-350.

65. Kashmiri, Z. N. Free radicals and oxidative stress in bacteria / Z. N. Kashmiri, S. A. Mankar // *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. – 2014. – Vol. 3, Iss. 9. – P. 34-40.

66. Srinivas, U. S. ROS and the DNA damage response in cancer / U. S. Srinivas, B. W. Q. Tan, B. A. Vellayappan, A. D. Jeyasekharan // *Redox Biology*. – 2019. – Vol. 25. – P. 101084.

67. Luzina, E. L. Synthesis and anticancer activity of *N*-bis(trifluoromethyl)alkyl-*N'*-thiazolyl and *N*-bis(trifluoromethyl)alkyl-*N'*-benzothiazolyl ureas / E. L. Luzina, A. V. Popov // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2009. – Vol. 44, Iss. 12. – P. 4944-4953.

68. Jella, K. K. Reactive oxygen species and nitric oxide signaling in bystander cells / K. K. Jella, R. Moriarty, B. McClean [et al.] // *PLOS ONE*. – 2018. – Vol. 13, Iss. 4. – P. e0195371.

69. Sokolov, M. Changes in gene expression as one of the key mechanisms involved in radiation-induced bystander effect (Review) / M. Sokolov, R. Neumann // *Biomedical Reports*. – 2018. – Vol. 9, Iss. 2. – P. 99-111.

70. Griendling, K. K. Measurement of Reactive Oxygen Species, Reactive Nitrogen Species, and Redox-Dependent Signaling in the Cardiovascular System / K. K. Griendling, R. M. Touyz, J. L. Zweier [et al.] // *Circulation Research*. – 2016. – Vol. 119, Iss. 5. – P. 39-75.

71. Suzen, S. Detection of Reactive Oxygen and Nitrogen Species by Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Technique / S. Suzen, H. Gurer-Orhan, L. Saso // *Molecules*. – 2017. – Vol. 22, Iss. 1. – P. 181.

72. Надеев, А. Д. Активные формы кислорода в клетках сердечно-сосудистой системы / А. Д. Надеев, Н. В. Гончаров // *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. – 2015. – № 4. – P. 80-94.

73. Sullivan, L. B. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer / L. B. Sullivan, N. S. Chandel // *Cancer & Metabolism*. – 2014. – Vol. 2, Iss. 1. – P. 17.

74. Lelieveld, S. Hydroxyl Radical Production by Air Pollutants in Epithelial Lining Fluid Governed by Interconversion and Scavenging of Reactive Oxygen Species / S. Lelieveld, J. Wilson, E. Dovrou [et al.] // *Environmental Science & Technology*. – 2021. – Vol. 55. – P. 14069-14079.

75. Zorov, D. B. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release / D. B. Zorov, M. Juhaszova, S. J. Sollott // *Physiological Reviews*. – 2014. – Vol. 94, Iss. 3. – P. 909-950.

76. Koppenol, W. H. The Haber-Weiss cycle – 70 years later / W. H. Koppenol // *Redox Report*. – 2001. – Vol. 6, Iss. 4. – P. 229-234.

77. Halliwell, B. *Free Radicals in Biology and Medicine* / B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge. – OUP Oxford, 2015. – ISBN 9780191802133.

78. Hastings, J. W. Intermediates in the bioluminescent oxidation of reduced flavin mononucleotide / J. W. Hastings, Q. H. Gibson // *The Journal of biological chemistry*. – 1963. – Vol. 238, Iss. 7. - P. 2537-2554.

79. Zhao, X. Reactive oxygen species and the bacterial response to lethal stress / X. Zhao, K. Drlica // *Current Opinion in Microbiology*. – 2014. – Vol. 21. – P. 1-6.

80. Улащик, В. С. Активные формы кислорода, антиоксиданты и действие лечебных физических факторов / В. С. Улащик // *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры*. – 2013. – Т. 90, № 1. – С. 60-69.

81. Шанин, Ю. Н. Антиоксидантная терапия в клинической практике / Ю. Н. Шанин, В. Ю. Шанин, Е. В. Зиновьев. – Санкт-Петербург : ЭЛБИ-СПб, 2003. –128 с. – ISBN 5939790704.

82. Matsumoto, H. *Vanguards of Paradigm Shift in Radiation Biology: Radiation-Induced Adaptive and Bystander Responses* / H. Matsumoto, N. Hamada A, A. Takahashi [et al.] // *Journal of Radiation Research*. – 2007. – Vol. 48, Iss. 2. – P. 97-106.

83. 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, Iss. 4. – P. 158-72.

84. 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, Iss. 7. – P. 443-454.

85. Smith, T. A. Radioprotective agents to prevent cellular damage due to ionizing radiation / T. A. Smith, D. R. Korkpatrick, S. Smith [et al.] // *Journal of Translational Medicine*. – 2017. – Vol. 15, Iss. 1. – P. 1–18.

86. Southam, C. M. Effects of extract of western red-cedar heartwood on certain wood-decaying fungi in culture / C. M. Southam // *Phytopathology*. – 1943. – Vol. 33. – P. 517-524.

87. Lau. Y. Low Dose Ionising Radiation-Induced Hormesis: Therapeutic Implications to Human Health / Y. Lau, M. Chew, A. Alqahtani [et al.] // *Applied Sciences*. – 2021. – Vol. 11, Iss. 19. – P. 8909.

88. Calabrese, J. Hormesis Predicts Low-Dose Responses Better Than Threshold Models / E. J. Calabrese, E. J. Stanek, M. A. Nascarella, G. R. Hoffmann // *International Journal of Toxicology*. – 2008. – Vol. 27, Iss. 5. – P. 369-378.

89. Kudryasheva, N. S. Monitoring of Low-Intensity Exposures via Luminescent Bioassays of Different Complexity: Cells, Enzyme Reactions, and Fluorescent Proteins / N. S. Kudryasheva, E. S. Kovel // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20, Iss. 18. – P. 4451.

90. Luckey, T. D. Hormesis with Ionizing Radiation. / T. D. Luckey. – New York : CRC Press, 1980. – 222 p. – ISBN 9780367227166.

91. Бурлакова, Е. Б. Сверхслабые воздействия химических соединений и физических факторов на биологические системы / Е. Б. Бурлакова, А. А. Конрадов, Е. Л. Мальцева // *Биофизика*. – 2004. – Т. 49, № 3. – С. 551-564.

92. Feinendegen, L. E. Evidence for beneficial low level radiation effects and radiation hormesis / L. E. Feinendegen // *British Journal of Radiology*. – 2005. – Vol. 78, Iss. 925. – P. 3-7.

93. Feinendegen, L. E. Whole-body responses to low-level radiation exposure: New concepts in mammalian radiobiology / L. E. Feinendegen, M. Pollycove, R. D. Neumann // *Experimental Hematology*. – 2007. – Vol. 35, Iss. 4. – P. 37-46.

94. Mothersill, C. Implications for human and environmental health of low doses of ionising radiation / C. Mothersill, C. Seymour // *Journal of Environmental Radioactivity*. – 2014. – Vol. 133. – P. 5-9.

95. Ray, S. D. Hormesis / S. D. Ray, F. F. Farris, A. C. Hartmann // Encyclopedia of Toxicology. – Oxford : Academic Press, 2014. – P. 944-948.

96. Calabrese, E. J. Hormesis: a fundamental concept in biology / E. J. Calabrese // Microbial Cell. – 2014. – Vol. 1, Iss. 5. – P. 145-149.

97. Jo, E. R. Radiation sensitivity of bacteria and virus in porcine xenoskin for dressing agent / E. R. Jo, P. M. Jung, J. Choi, J. W. Lee // Radiation Physics and Chemistry. – 2012. – Vol. 81, Iss. 8. – P. 1259-1262.

98. Mesquita, N. Flow cytometry as a tool to assess the effects of gamma radiation on the viability, growth and metabolic activity of fungal spores / N. Mesquita, A. Portugal, G. Piñar [et al.] // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2013. – Vol. 84. – P. 250-257.

99. Paul, J. An insight into the influence of low dose irradiation pretreatment on the microbial decolouration and degradation of Reactive Red-120 dye / J. Paul, A. A. Kadam, S. P. Govindwar [et al.] // Chemosphere. – 2013. – Vol. 90, Iss. 4. – P. 1348-1358.

100. Xavier, M. de la P. Use of mild irradiation doses to control pathogenic bacteria on meat trimmings for production of patties aiming at provoking minimal changes in quality attributes / M. de la P. Xavier, C. Dauber, P. Mussio [et al.] // Meat Science. – 2014. – Vol. 98, Iss. 3. – P. 383-391.

101. Rana, D. Radioactive decontamination of water by membrane processes — A review / D. Rana, T. Matsuura, M. A. Kassim, A. F. Ismail // Desalination. – 2013. – Vol. 321. – P. 77-92.

102. Albers, R. W. Biochemical Aspects of Active Transport / R. W. Albers // Annual Review of Biochemistry. – 1967. – Vol. 36, Iss 1. – P. 727-756.

103. Lloyd, D. C. Chromosomal aberrations in human lymphocytes induced in vitro by very low doses of x-rays / D. C. Lloyd, A. A. Edwards, A. Leonard [et al.] // International Journal of Radiation Biology. – 1992. – Vol. 61, Iss. 3. – P. 335-343.;

104. Zaka, R. Study of external low irradiation dose effects on induction of chromosome aberrations in *Pisum sativum* root tip meristem / R. Zaka, C. Chenal, M. T. Misset // Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. – 2002. – Vol. 517, Iss. 1-2. – P. 87-99.

105. Mossman, K. L. Deconstructing radiation hormesis / K. L. Mossman // *Health Physics*. – 2001. – Vol. 80, Iss. 3. – P. 263-269.

106. Planel, H. Test of experimental demonstration of the biological activity of natural ionizing radiations / H. Planel, J. Soleihavoup, D. Blanc [et al.] // *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*. – 1966. – Vol. 262. – P. 2767-2770.

107. Кузин, А. М. Электромагнитная информация в явлении жизни / А. М. Кузин // *Биофизика*. – 2000. – Т. 45, № 1. – С. 144-147.

108. Петин, В. Г. Некоторые эффекты радиационного гормезиса бактериальных и дрожжевых клеток / В. Г. Петин, И. И. Морозов, Н. М. Кабакова, Т. А. Горшкова // *Радиационная биология. Радиоэкология*. – 2003. – Т. 43, № 2. – С. 176-178.

109. Ивановский, Ю. А. Радиационный гормезис. Благоприятны ли малые дозы ионизирующей радиации? / Ю. А. Ивановский // *Вестник ДВО РАН*. – 2006. – № 6. – С. 86-91.

110. Вайсерман, А. М. Молекулярные и клеточные аспекты радиационного гормезиса в *Drosophila melanogaster* / Вайсерман А. М., Литошенко А. Я., Квитницкая-Рыжова Т. Ю [и др.] // *Цитология и генетика* – 2003. – Т. 37, №3. – С. 41–48.

111. Nair, C. Radioprotectors in Radiotherapy / C. K. Nair, D. K. Parida, T. Nomura // *Journal of Radiation Research*. – 2001. – Vol. 42, Iss. 1. – P. 21–37.

112. Feinendegen, L. E. Responses to Low Doses of Ionizing Radiation in Biological Systems / L. E. Feinendegen, M. Pollycove, C. A. Sondhaus // *Nonlinearity Biol. Toxicol. Med.* – 2004. – Vol. 2, Iss. 3. – P. 143–171.

113. Guéguen, Y. Adaptive responses to low doses of radiation or chemicals: their cellular and molecular mechanisms / Y. Guéguen, A. Bontemps, T. G. Ebrahimian // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2019. – Vol. 76, Iss. 7. – P. 1255–1273.

114. Szejka, M. Radioprotectors in radiotherapy – advances in the potential application of phytochemicals / M. Szejka, J. Kołodziejczyk-Czepas, H. M. Żbikowska // *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. – 2016. – Vol. 70. – С. 722-734.

115. Fischer, N. Prevention from radiation damage by natural products / N. Fischer, E. J. Seo, T. Efferth // *Phytomedicine*. – 2018. – Vol. 47. – P. 192–200.

116. Топурия, Л. Ю. Радиозащитные свойства растений / Л. Ю. Топурия // Известия Оренбургского аграрного университета. – 2004. – №3. – С. 117-119.

117. Park, J. E. Protection of Radiation induced Somatic Damage by the Reduction of Oxidative Stress at Critical Organs of Rat with Naringenin Administration / J. E. Park, S. H. Kang, H. M. Kim [et al.] // The Korean Journal of Food And Nutrition. – 2016. – Vol. 29, Iss. 6. – P. 829-834.

118. Vasin, M. V. Comments on the mechanisms of action of radiation protective agents: Basis components and their polyvalence / M. V. Vasin // SpringerPlus. – 2014. – Vol. 3, Iss. 1. – P. 1-16.

119. Majithia, N. Oral Complications / N. Majithia, C. L. Hallemeier, C. L. Loprinzi // Abeloff's Clinical Oncology. – Elsevier, 2019. – ISBN 9780323476744. – P. 607-620.

120. Citrin, D. Radioprotectors and Mitigators of Radiation-Induced Normal Tissue Injury / D. Citrin, A. P. Cotrim, F. Hyodo [et al.] // The Oncologist. – 2010. – Vol. 15, Iss. 4. – P. 360-371.

121. Stone, H. B. Models for evaluating agents intended for the prophylaxis, mitigation and treatment of radiation injuries. Report of an NCI Workshop, December 3-4, 2003 / H. B. Stone, J. E. Moulder, C. N. Coleman [et al.] // Radiation research. – 2004. – Vol. 162, Iss. 6. – P. 711-728.

122. Савченко, И. А. Биологическая активность гуминовых веществ: перспективы и проблемы их применения в медицине / И. А. Савченко, И. Н. Корнеева, Е. А. Лукша, К. К. Пасечник // Медиаль. – 2019. – Т. 1, № 23. – С. 54-60.

123. Weber, J. H. Binding and transport of metals by humic materials / J. H. Weber // Humic substances and their role in environment. – Wiley, 1988. – P. 165–178.

124. Perminova, I. V. Remediation chemistry of humic substances : theory and implications for technology / I. V. Perminova, K. Hatfield // Use of Humic Substances to Remediate Polluted Environments: From Theory to Practice. – 2005. – ISBN 1-4020-3250-1. – P. 3-36.

125. Ришар, К. Роль фракционирования при изучении фотохимических свойств гумусовых веществ / К. Ришар, Ж. Гийо, Ж.-П. Агуер [и др.] // Российский

Химический Журнал (Журнал Российского химического общества им. Д. И. Менделеева). – 2008. – Т. ЛП., № 1. – С. 107-113.

126. Jarukas, L. Determination of Organic Compounds, Fulvic Acid, Humic Acid, and Humin in Peat and Sapropel Alkaline Extracts / L. Jarukas, L. Ivanauskas, G. Kasparaviciene [et al.] // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26, Iss. 10. – P. 2995.

127. Орлов, Д. С. Гуминовые вещества в биосфере / Д. С. Орлов. – Соросовский образовательный журнал. – 1997. – Т. 2. – С. 56-63.

128. Перминова, И. В. Гуминовые вещества в контексте зеленой химии / И. В. Перминова, Д. М. Жилин // *Зеленая химия в России : сборник статей / под редакцией В. В. Лунина, П. Тундо, Е. С. Локтевой*. – Москва, 2004. – С. 146-162.

129. Перминова, И. В. Гуминовые вещества – вызов химикам XXI века / И. В. Перминова // *Химия и жизнь*. – 2008. – № 1. – С. 50-56.

130. Trevisan, S. Humic substances biological activity at the plant-soil interface: From environmental aspects to molecular factors / S. Trevisan, O. Francioso, S. Quagiotti, S. Nardi // *Plant Signaling & Behavior*. – 2010. – Vol. 5, Iss. 6. – P. 635-643.

131. Zavarzina, A. G. Humic Substances: Hypotheses and Reality (a Review) / A. G. Zavarzina, N. N. Danchenko, V. V. Demin [et al.] // *Eurasian Soil Science*. – 2021. – Vol. 54, Iss. 12. – P. 1826–1854.

132. Alvarez-Puebla, R. A Characterization of the porous structure of different humic fractions / R. A. Alvarez-Puebla, P. J. G. Goulet, J. J. Garrido // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2005. – Vol. 256, Iss. 2-3. – P. 129-135.

133. Kulikova, N. A. Uptake of humic substances by wheat plants: preferential accumulation in lipid fraction / N. A. Kulikova, E. A. Tsvetkova, G. A. Badun [et al.] // *Humic Substances in Ecosystems 8 : book of abstracts of international scientific conference*. – Soporna, 2009. – P. 28-29.

134. Ермагамбет, Б. Т. Перспективы применения гуминовых веществ и их получение из окисленного бурого угля / Б. Т. Ермагамбет, Н. У. Нургалиев, А. А. Сыздыкова, Н. А. Маслов // *Наука, техника и образование*. – 20. – Т. 2, №55. – С. 20-25.

135. Piccolo, A. The Supramolecular Structure of Humic Substances / A. Piccolo // *Soil Science*. – 2001. – Vol. 166, Iss. 11. – P. 810-832.

136. Sutton, R. Molecular Structure in Soil Humic Substances: The New View / R. Sutton, G. Sposito // *Environmental Science & Technology*. – 2005. – Vol. 39, Iss. 23. – P. 9009-9015.

137. Wershaw, R. L. Molecular aggregation of humic substances / R. L. Wershaw // *Soil science*– 1999. – V. 164. – N. 11. – P. 803–813.

138. Islam, M. Z. Humic Substances-Versatile Natural Products: Properties & Application / M. Z. Islam, M. Dizman, O. F. Tutar, A. Tutar // 19th International Conference of Humic Substances and their Contribution to the Climate Change Mitigation : book of abstracts / Sofia, 2018. – P. 44–52.

139. Klocking, R. Medical aspects and applications of humic substances // *Biopolymers for medical and pharmaceutical applications* / R. Klocking, B. Helbig // *Biopolymers Online*. – Wiley, 2005. – ISBN 3527311548. – P. 3-16.

140. Жилин, Д. М. Исследование реакционной способности и детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к соединениям ртути (II) : специальность 02.00.03 «Органическая химия» : диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук / Жилин Денис Михайлович ; Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова. – Москва, 1998. – 202 с.

141. Hao, L. Humic acid-coated hydrated ferric oxides-polymer nanocomposites for heavy metal removal in water / L. Hao, L. Li, S. Yu, J. Liu // *Science of the Total Environment*. – 2022. – Vol. 834. – P. 155427.

142. Ondrasek, G. Humates mitigate Cd uptake in the absence of NaCl salinity, but combined application of humates and NaCl enhances Cd mobility & phyto-accumulation / G. Ondrasek, D. Romić, V. Tanaskovik [et al.] // *Science of the Total Environment*. – 2022. – Vol. 847. – P. 157649.

143. Bondareva, L. Direct and indirect detoxification effects of humic substances / L. Bondareva, N. Kudryasheva // *Agronomy*. – 2021. – Vol. 11, Iss. 2. – P. 1-13.

144. Tarasova, A. S. Bioluminescence as a tool for studying detoxification processes in metal salt solutions involving humic substances / A. S. Tarasova, S. L.

Kislan, E. S. Fedorova [et al.] // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* – 2012. – Vol. 117. – P. 164–170.

145. Tarasova, A. S. Effect of humic substances on toxicity of inorganic oxidizer bioluminescent monitoring / A. S. Tarasova, D. I. Stom, N. S. Kudryasheva // *Environ. Toxicol. Chem.* – 2011. – Vol. 30, Iss. 5. – P. 1013–1017.

146. Fedorova, E. Bioluminescent monitoring of detoxification processes: Activity of humic substances in quinone solutions / E. Fedorova, N. Kudryasheva, A. Kuznetsov [et al.] // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* – 2007. – Vol. 88, Iss. 2–3. – P. 131–136.

147. Muslumova, Z. H. Humic Substances Antistress Activity at the Corn Seedlings / Z. H. Muslumova, I. V. Azizov, M. F. Farajov // *Journal of Stress Physiology & Biochemistry.* – 2024. – Vol. 20, Iss. 2. – P. 99–106.

148. Shkarupa, V. M. Radioprotective properties of sodium humate in radiation-induced mutagenesis in cultured lymphocytes of thyroid cancer patients / V. Shkarupa, S. V. Klymenko // *Experimental Oncology.* – 2016. – Vol. 38, Iss. 2. – P. 108–111.

149. Rozhko, T. Detoxification of AM-241 solutions by humic substances: bioluminescent monitoring / T. Rozhko, L. Bondareva, O. Mogilnaya [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2011. – Vol. 400, Iss. 2. – P. 329–334.

150. Пиотровский, Л. Б. Фуллерены в биологии / Л. Б. Пиотровский, О.И. Киселев. – Санкт-Петербург : Росток, 2006. – 336 с. – ISBN 5-94668-039-0.

151. Chiang, L. Y. Efficient one-flask synthesis of water-soluble [60]fullerenols / L. Y. Chiang, J. B. Bhonsle, L. Wang [et al.] // *Tetrahedron.* – 1996. – Vol. 52, Iss. 14. – P. 4963–4972.

152. Injac, R. Chapter 5 – Fullerene Nanoparticles: Toxicity and Antioxidant Activity / R. Injac, M. Prijatelj, B. Strukelj // *Oxidative Stress and Nanotechnology. Methods and Protocols.* – Totowa, 2013. – ISBN 978-1-62703-474-6. – P. 75–100.

153. Сушко, Е. С. Токсические и антиоксидантные свойства фуллеренолов. Изучение с помощью билюминесцентных тестовых систем : специальность 1.5.2 «Биофизика» : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Сушко Екатерина Сергеевна; Институт биофизики СО РАН – обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН. – Красноярск, 2024. – 131 с.

154. Foley, S. Cellular localization of a water-soluble fullerene derivative / S. Foley, C. Crowley, M. Smahi [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2002. – Vol. 294. – P. 116-119.

155. Grebowski, J. Fullerenol $C_{60}(OH)_{36}$ could associate to band 3 protein of human erythrocyte membranes / J. Grebowski, A. Krokosz, M. Puchala // *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*. – 2013. – Vol. 1828, Iss. 9. – P. 2007-2014.

156. Vileno, B. Evidence of lipid peroxidation and protein phosphorylation in cells upon oxidative stress photo-generated by fullerols / B. Vileno, S. Jeney, A. Sienkiewicz [et al.] // *Biophysical Chemistry*. – 2010. – Vol. 152, Iss. 1-3. – P. 164-169.

157. Lao, F. Fullerene derivatives protect endothelial cells against NO-induced damage / F. Lao, W. Li, D. Han [et al.] // *Nanotechnology*. – 2009. – Vol. 20, Iss. 22. – P. 225103.

158. Gudkov, S. V. Unmodified hydrated C_{60} fullerene molecules exhibit antioxidant properties, prevent damage to DNA and proteins induced by reactive oxygen species and protect mice against injuries caused by radiation-induced oxidative stress / S. V. Gudkov, E. L. Guryev, A. B. Gapeyev [et al.] // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. – 2019. – Vol. 15, Iss. 1. – P. 37-46.

159. Grebowski, J. Fullerenols as a New Therapeutic Approach in Nanomedicine / J. Grebowski, P. Kazmierska, A. Krokosz // *BioMed Research International*. – 2013. – Vol. 2013. – P. 1-9.

160. Grebowski, J. Fullerenes in radiobiology / J. Grebowski, A. Krokosz // *Postepy biochemii*. – 2010. – Vol. 56, Iss. 4. – P. 456-462.

161. Grebowski, J. Rate constants of highly hydroxylated fullerene C_{60} interacting with hydroxyl radicals and hydrated electrons: Pulse radiolysis study / J. Grebowski, A. Krokosz, A. Konarska [et al.] // *Radiation Physics and Chemistry*. – 2014. – Vol. 103. – P. 146-152.

162. Djordjevic, A. Review of synthesis and antioxidant potential of fullerene nanoparticles / A. Djordjevic, B. Srdjenovic, M. Seke [et al.] // *Journal of Nanomaterials*. – 2015. – Vol. 2015, Iss. 1. – P. 567073

163. Roy, P. Exploring the Inhibitory and Antioxidant Effects of Fullerene and Fullerenol on Ribonuclease A / P. Roy, S. Bag, D. Chakraborty, S. Dasgupta // ACS Omega. – 2018. – Vol. 3, Iss. 9. – P. 12270-12283.

164. Wang, Z. Syntheses, structures and antioxidant activities of fullerenols: knowledge learned at the atomistic level / Z. Wang, S. Wang, Zhang-Hui Lu, X. Gao // Journal of Cluster Science. – 2015. – Vol. 26, Iss. 375. – P. 375-388.

165. Kovel, E. Antioxidant Activity and Toxicity of Fullerenols via Bioluminescence Signaling: Role of Oxygen Substituents / E. Kovel, A. Sachkova, N. Vnukova [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – Vol. 20, Iss. 9. – P. 2324.

166. Trajković, S. Tissue-protective effects of fullerenol C₆₀(OH)₂₄ and amifostine in irradiated rats / S. Trajković, S. Dobrić, V. Jaćević [et al.] // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2007. – Vol. 58, Iss. 1. – P. 39-43.

167. Vesna, J. Effects of fullerenol nanoparticles and amifostine on radiation-induced tissue damages: Histopathological analysis / J. Vesna, J. Danica, K. Kamil [et al.] // Journal of Applied Biomedicine. – 2016. – Vol. 14, Iss. 4. – P. 285-297.

168. Zhao, Q. Radioprotection by fullerenols of *Styloynchia mytilus* exposed to γ -rays / Q. Zhao, Y. Li, J. Xu [et al.] // International Journal of Radiation Biology. – 2005. – Vol. 81, Iss. 2. – P. 169-175.

169. Владимиров, Ю. А. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция / Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурнина // Успехи биологической химии. – 2009. – Т. 49. – С. 341–388.

170. Васильев, Р. Ф. Химическое свечение / Р. Ф. Васильев // Химия и Химики. – 2010. – Том 1. – С. 5–62.

171. Кривохижина, Л. В. Хемилюминесценция тромбоцитов. Использование метода хемилюминесценции для определения активности тромбоцитов / Л. В. Кривохижина, С. А. Кантюков, Е. Н. Ермолаева, Д. Н. Кривохижин // Вестник Тюменского государственного университета. – 2013. – № 6. – С. 174–181.

172. Сабитова, Р. И. Хемилюминесценция как один из методов, используемых для изучения антиокислительной активности крови, слюнной жидкости и мочи у работников нефтехимической промышленности / Р. И.

Сабитова, Д. А. Еникеев, Д. Ф. Шакиров, Р. Т. Буляков // Медицинский вестник Башкортостана. – 2014. – Т. 9, № 5. – С. 87–90.

173. Wang, L.-J. Flow injection chemiluminescence determination of loxoprofen and naproxen with the acidic permanganate-sulfite system / L.-J. Wang, Y.-H. Tang, Y.-H. Liu // Journal of Pharmaceutical Analysis. – 2011. – Vol. 1, Iss. 1. – P. 51-56.

174. Irani-nezhad, M. H. A Chemiluminescent Method for the Detection of H₂O₂ and Glucose Based on Intrinsic Peroxidase-Like Activity of WS₂ Quantum Dots / M. H. Irani-nezhad, A. Khataee, J. Hassanzadeh, Y. A. Orooji // Molecules. – 2019. – Vol. 24, Iss. 4. – P. 689.

175. Ge, M. Establishment of a Chemiluminescent ELISA Method for Florfenicol in Eggs and Chicken Meat / M. Ge, Y. Xing, Y. Sun [et al.] // Food Anal. Methods. – 2024. – Vol. 18, Iss. 1. – P. 48–56.

176. Panoutsou, P. Rapid enzymatic chemiluminescent assay of glucose by means of a hybrid flow-injection/sequential-injection method / P. Panoutsou, A. Economou // Talanta. – 2005. – Vol. 67, Iss. 3. – P. 603–609.

177. Sun, Y. Determination of sugars by LC with On-Line Electrogenerated Cu(HIO₆)₂]⁵⁻-Luminol Chemiluminescence Detection / Y. Sun, Z. Zhang, Y. Zhang, Y. Wei // Chromatographia. – 2008. – Vol. 67, Iss. 9–10. – P. 825–827.

178. Myint, A. Flow injection-chemiluminescence determination of paraben preservative in food safety / A. Myint, Q. Zhang, L. Liu, H. Cui // Anal. Chim. Acta. – 2004. – Vol. 517, Iss. 1–2. – P. 119–124.

179. Zhang, Q. High-performance liquid chromatographic assay of parabens in wash-off cosmetic products and foods using chemiluminescence detection / Q. Zhang, M. Lian, L. Liu, H. Cui // Anal. Chim. Acta. – 2005. – Vol. 537, Iss. 1–2. – P. 31–39.

180. Бельская, Л. В. Антиоксидантная активность смешанной слюны человека в норме / Л. В. Бельская, Е. А. Сарф, В. К. Косенок, Ж. Массард // Экология человека. – 2017. – Т. 24, № 6. – С. 36–40.

181. Коленчукова, О. А. Антиоксидантный статус как маркер здоровья студентов в период интенсивной умственной нагрузки / О. А. Коленчукова, Е. Н. Долгушина, А. А. Рюпина [и др.] // Гигиена и санитария. – 2018. – Т. 97, № 4. – С. 332–336.

182. Liu, Y. Development of a chemiluminescent immunoassay based on magnetic solid phase for quantification of homocysteine in human serum / Y. Liu, Y. Li, R. Wang [et al.] // *BMC Biotechnol.* – 2024. – Vol. 24., Iss. 1. – 77.

183. Ji, Y. Development of a chemiluminescence assay for tissue plasminogen activator inhibitor complex and its applicability to gastric cancer / Y. Ji, Y. Qin, Q. Tan [et al.] // *BMC Biotechnol.* – 2024. – Vol. 24, Iss. 1. – 30.

184. Ding, L. A Novel Cell-Assisted Enhanced Chemiluminescence Strategy for Rapid and Label-Free Detection of Tumor Cells in Whole Blood / L. Ding, Y. Wu, Y. Duan [et al.] // *ACS Sensors.* – 2020. – Vol. 5, Iss. 2. – P. 440-446.

185. Образцов, И. В. Хемилюминесцентный анализ клеток крови в медицине: история, теория, практика / И. В. Образцов, М. А. Годков // *Молекулярная медицина.* – 2013. – № 4. – С. 3–9.

186. Казаринов, К. Д. Изучение биологических эффектов микроволнового излучения с помощью хемилюминесцентного метода / К. Д. Казаринов, И. Г. Полников // *Электронная техника. Сер. 1. СВЧ-техника.* – 2010. – Т. 2, № 505. – С. 57–71.

187. Khan, P. Luminol-Based Chemiluminescent Signals: Clinical and Non-clinical Application and Future Uses / P. Khan, D. Idrees, M. Moxley [et al.] // *Applied Biochemistry and Biotechnology.* – 2014. – Vol. 173, Iss. 2. – P. 333-355.

188. Barni, F. Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection / F. Barni, S. W. Lewis, A. Berti [et al.] // *Talanta.* – 2007. – Vol. 72, Iss. 3. – P. 896-913.

189. Shevlin, P. B. Mechanism of the Ferricyanide-Catalyzed Chemiluminescence of Luminol / P. B. Shevlin, H. A. Neufeld // *Journal of Organic Chemistry.* – 1970. – Vol. 35, Iss. 7. – P. 2178–2182.

190. Seitz, W. R. Chemiluminescence Detection of Enzymically Generated Peroxide / W. R. Seitz // *Methods in Enzymology.* – Academic Press, 1978. – Vol. 57. – ISBN 2013206534. – P. 445–462.

191. Duan, C. Size-Dependent Inhibition and Enhancement by Gold Nanoparticles of Luminol–Ferricyanide Chemiluminescence / C. Duan, H. Cui, Z. Zhang [et al.] // *Journal of Physical Chemistry C.* – 2007. – Vol. 111, Iss. 12. – P. 4561–4566.

192. Li, Y. Validation of Lucigenin (Bis-N-methylacridinium) as a Chemiluminescent Probe for Detecting Superoxide Anion Radical Production by Enzymatic and Cellular Systems / Y. Li, H. Zhu, P. Kuppasamy [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 1998. – Vol. 273, Iss. 4. – P. 2015–2023.

193. Bronsart, L. L. Chemiluminescence Imaging of Superoxide Anion Detects Beta-Cell Function and Mass / L. L. Bronsart, C. Stokes, C. H. Contag // *PLoS One*. – 2016. – Vol. 11, Iss. 1. – e0146601.

194. Gámiz-Gracia, L. Chemiluminescence detection in liquid chromatography: Applications to clinical, pharmaceutical, environmental and food analysis—A review / L. Gámiz-Gracia, A. M. García-Campaña, J. F. Huertas-Pérez, F. J. Lara // *Analytica Chimica Acta*. – 2009. – Vol. 640, Iss. 1-2. – P. 7-28.

195. Hu, Y. F. A novel luminol-based chemiluminescence method for the determination of amikacin sulfate in serum by using trivalent copper-periodate complex / Y. F. Hu, G. K. Li, Z. J. Zhang // *Journal of Pharmaceutical Analysis*. – 2013. – Vol. 3, Iss. 5. – P. 360-366.

196. Евгенийев, М. И. Тест-методы и экология / М. И. Евгенийев // *Соровский образовательный журнал*. – 1999. – № 11. – С. 29-34.

197. Easterly, C. E. Biotesting wastewater for hazard evaluation / C. E. Easterly, T. D. Jones, L. R. Glass [et al.] // *Water Research*. – 1993. – Vol. 27, Iss. 7. – P. 1145-1152.

198. Girotti, S. Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria / S. Girotti, E. N. Ferri, M. G. Fumo, E. Maiolini // *Analytica Chimica Acta*. – 2008. – Vol. 608, Iss. 1. – P. 2-29.

199. Kratasyuk, V. A. Principle of luciferase biotesting / V. A. Kratasyuk // *Biological Luminescence* / 1990. – ISBN 978-9810204051. – P. 550.

200. Kudryasheva, N. S. Bioluminescence and exogenous compounds: Physico-chemical basis for bioluminescent assay / N. S. Kudryasheva // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2006. – Vol. 83, Iss. 1. – P. 77-86.

201. Александрова, В. В. Биотестирование как современный метод оценки токсичности природных и сточных вод : [монография] / В. В. Александрова ; Нижневартковский государственный университет. – Нижневартовск : Изд-во

Нижевартовского государственного университета, 2013. – 119 с. – ISBN 978-5-00047-090-9.

202. Гительзон, И. И. Экологическая биофизика. Учебное пособие в 3 т. Под ред. И. И. Гительзона, Н. С. Печуркина. Т. 1. Фотобиофизика экосистем / И. И. Гительзон, В. А. Кратасюк, В. Н. Лопатин [и др.] – Москва: Логос, 2002. – 328 с.

203. Müller, M. E. Combining *in vitro* reporter gene bioassays with chemical analysis to assess changes in the water quality along the Ammer River, Southwestern Germany / M. E. Müller, B. I. Escher, M. Schwientek [et al.] // *Environ. Sci. Eur.* – 2018. – Vol. 30, Iss. 1. – P. 20.

204. Brack, W. How to confirm identified toxicants in effect-directed analysis / W. Brack, M. Schmitt-Jansen, M. Machala [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2008. – Vol. 390, Iss. 8. – P. 1959–1973.

205. Sako, F. Effects of food dyes on *Paramecium caudatum*: Toxicity and inhibitory effects on leucine aminopeptidase and acid phosphatase activity / F. Sako, N. Taniguchi, N. Kobayashi [et al.] // *Toxicology and Applied Pharmacology.* – 1977. – Vol. 39, Iss. 1. – P. 111–117.

206. Jardim, W. F. Short-term toxicity test using *Escherichia coli*: Monitoring CO₂ production by flow injection analysis / W. F. Jardim, C. Pasquini, J. R. Guimarães, L. C. de Faria // *Water Research.* – 1990. – Vol. 24, Iss. 3. – P. 351–354.

207. Terekhova, V. A. Biotesting of Soil Ecotoxicity in Case of Chemical Contamination: Modern Approaches to Integration for Environmental Assessment (a Review) / V. A. Terekhova // *Eurasian Soil Sci.* – 2022. – Vol. 55, Iss. 5. – P. 601–612.

208. Terekhova, V. A. A Soil Biodiagnostics Methodology and Features of Some Bioindication and Biotesting Methods (Review) / V. A. Terekhova, S. A. Kulachkova, E. V. Morachevskaya, A. P. Kiryushina // *Moscow Univ. Soil Sci. Bull.* – 2023. – Vol. 78, Iss. 2. – P. 102–111.

209. Dunlap, P. V. Bioluminescence, Microbial / P. V. Dunlap // *Encyclopedia of Microbiology* / 2009. – P. 45-61.

210. Montgomery, M. K. Bacterial symbionts induce host organ morphogenesis during early postembryonic development of the squid *Euprymna scolopes* / M. K.

Montgomery, M. McFall-Ngai // *Development*. – 1994. – Vol. 120, Iss. 7. – P. 1719–1729.

211. Pflüger, E. Ueber die Phosphorescenz verwesender Organismen / E. Pflüger // *Arch. für die Gesamte Physiol. des Menschen und der Thiere*. – 1875. – Vol. 11, Iss. 1. – P. 222–263.

212. Lee, J. Bioluminescence, the nature of the light / J. Lee. – 2020. – 216 p.

213. 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 [et al.] // *International Journal of Radiation Biology*. – 2013. – Vol. 89. – P. 18–27.

214. 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 [et al.] // *Central European Journal of Biology*. – 2014. – Vol. 9, Iss. 10 – P. 951–959.

215. Alexandrova, M. Effect of americium-241 on luminous bacteria. Role of Peroxides / M. Alexandrova, T. Rozhko, G. Vydryakova [et al.] // *Journal of Environmental Radioactivity*. – 2011. – Vol. 102. – P. 407–411.

216. Dunlap, P. Biochemistry and Genetics of Bacterial Bioluminescence / P. Dunlap // *Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology - Volume 1* / 2014. – ISBN 978-3-662-43385-0. – P. 37–64.

217. 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.

218. Кудряшева, Н. С. Физико-химические основы биолюминесцентного анализа : учебное пособие / Н. С. Кудряшева, В. А. Кратасюк, Е. Н. Есимбекова. – Красноярск : Краснояр. гос.ун-т., 2002. – 154 с.

219. Roda, A. Bioluminescence in analytical chemistry and *in vivo* imaging / A. Roda, M. Guardigli, E. Micheli, M. Mirasoli // *Trends in Analytical Chemistry*. – 2009. – Vol. 28, Iss. 3. – P. 307–322.

220. Wang, X. Effect of water quality on mercury toxicity to *Photobacterium phosphoreum*: Model development and its application in natural waters / X. Wang, R. Qu,

Z. Wei [et al.] // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2014. – Vol. 104, Iss. № 1. – P. 231–238.

221. Wang, D. Size-dependent acute toxicity and oxidative damage caused by cobalt-based framework (ZIF-67) to *Photobacterium phosphoreum* / D. Wang, L. Bai, X. Huang [и др.] // *Science of the Total Environment*. – 2022. – Vol. 851. – P. 158317.

222. Rozhko, T. V. On the mechanism of biological activation by tritium / T. V. Rozhko, G. A. Badun, I. A. Razzhivina [et al.] // *Journal of Environmental Radioactivity*. – 2016. – Vol. 157. – P. 131–135.

223. Kudryasheva, N. S. Exposure of luminous marine bacteria to low-dose gamma-radiation / N. S. Kudryasheva, A. S. Petrova, D. V. Dementyev, A. A. Bondar // *Journal of Environmental Radioactivity*. – 2017. – Vol. 169–170. – P. 64–69.

224. Rozhko, T. V. Is bacterial luminescence response to low-dose radiation associated with mutagenicity? / T. V. Rozhko, O. A. Guseynov, V. E. Guseynova [et al.] // *Journal of Environmental Radioactivity*. – 2017. – Vol. 177. – P. 261–265.

225. Rozhko, T. V. Effect of low-level α -radiation on bioluminescent assay systems of various complexity / T. V. Rozhko, N. S. Kudryasheva, A. M. Kuznetsov [et al.] // *Photochemical and Photobiological Sciences*. – 2007. – Vol. 6, Iss. 1. – P. 67–70.

226. Esimbekova, E. Application of enzyme bioluminescence in ecology / E. Esimbekova, V. Kratasyuk, O. Shimomura // *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* / Berlin; Heidelberg, 2014. – ISBN: 9783662433850. – P. 67–109.

227. Esimbekova, E. N. Design of bioluminescent biosensors for assessing contamination of complex matrices / E. N. Esimbekova, V. P. Kalyabina, K. V. Kopylova [et al.] // *Talanta*. – 2021. – Vol. 233. – P. 122509.

228. Kalyabina, V. P. Pesticides: formulants, distribution pathways and effects on human health – a review / V. P. Kalyabina, E. N. Esimbekova, K. V. Kopylova, V. A. Kratasyuk // *Toxicol. Reports*. – 2021. – Vol. 8. – P. 1179–1192.

229. Tyulkova, N. A. Purification of bacterial luciferase from *Photobacterium leiognathi* with the use of FPLC-system / N. A. Tyulkova // *Bacterial Luminescence*. Singapore: WorldScient: 1990. P. 369–374.

230. Скрипкина, Т. С. Механохимическая модификация структуры гуминовых кислот для получения комплексных соединений : специальность 02.00.21 «Химия твёрдого тела» : диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук / Скрипкина Татьяна Сергеевна ; ИХТТМ СО РАН. – Новосибирск, 2018. – 124 с.

231. Kuznetsov, A. M. Bioassay Based on Lyophilized Bacteria / E. K. Rodicheva, E. V. Shilova // *Biotekhnologiya*. – 1996. – Vol. 9. – P. 57–61.

232. Котеров, А. Н. Биологические и медицинские эффекты излучения с низкой ЛПЭ для различных диапазонов доз / А. Н. Котеров, А. А. Вайнсон // *Медицинская радиология и радиационная безопасность*. – 2015. – Т. 60, № 3. – С. 5–31.

233. Fadeikina, O. V. Statistical Analysis of Results from the Attestation of Biological Standard Samples: Use of the Mann-Whitney Test / O. V. Fadeikina, R. A. Volkova, E. V. Karpova // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2019. – Vol. 53, Iss. 7. – P. 655–659.

234. Jargin, S. Hormesis and radiation safety norms: Comments for an update / S. Jargin // *Human & Experimental Toxicology*. – 2018. – Vol. 37, Iss. 11. – P. 1233–1243.

235. Kolesnik O. V. Marine Bacteria under Low-Intensity Radioactive Exposure: Model Experiments / O. V. Kolesnik, T. V. Rozhko, N. S. Kudryasheva // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24, Iss. 1. – P. 410.

236. Kolesnik, O. V. Development of Cellular and Enzymatic Bioluminescent Assay Systems to Study Low-Dose Effects of Thorium / O. V. Kolesnik, T. V. Rozhko, M. A. Lapina, V. S. Solovyev, A. S. Sachkova, N. S. Kudryasheva // *Bioengineering*. – 2021. – Vol. 8, Iss. 12. – P. 194.

237. Krieger, N. Bioluminescence: pH Activity Profiles of Related Luciferase Fractions / N. Krieger, J. W. Hastings // *Science*. – 1968. – Vol. 161. – P. 586–589.

238. Кудряшева, Н. С. Действие солей металлов на бактериальные билюминесцентные системы различной сложности / Н. С. Кудряшева, Л. В. Зюзикова, Т. В. Гутник, А. В. Кузнецов // *Биофизика*. – 1996. – Т. 41, №6. – С. 1264–1269.

239. Кудряшева, Н. С. Механизм действия солей металлов на бактериальную биолюминесцентную систему *in vitro* / Н. С. Кудряшева, Е. В. Зюзикова, Т. В. Гутник // Биофизика. – 1999. – Т. 44, №2. – С. 244–250.

240. Rozhko, T. V. Comparison of Effects of Uranium and Americium on Bioluminescent Bacteria / T. V. Rozhko, N. S. Kudryasheva, M. A. Aleksandrova [et al.] // Journal of Siberian Federal University, Biology. – 2008. – Vol. 1. – P. 60–65.

241. Calabrese, E. J. Comet assay and hormesis / E. J. Calabrese, P. B. Selby // Environmental Pollution. – 2024. – Vol. 341. – P. 122929.

242. Рожко, Т. В. Воздействие тория-232 на биолюминесцентную ферментативную систему и радиопротекторная активность гуминовых веществ / Т. В. Рожко, О. В. Колесник, А. С. Сачкова, Н. Ю. Романова, Д. И. Стом, Н. С. Кудряшева // Биофизика. – 2024. – Т. 69, №3. – С. 444–454.

243. Петушков, В. Н. Изучение эффективности работы биферментной системы NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза светящихся бактерий / В. Н. Петушков, Н. С. Родионова, П. И. Белобров // Биохимия. – 1985. – Т. 50, № 3. – С. 401–405.

244. Tu, S. C. Activity coupling and complex formation between bacterial luciferase and flavin reductases / S. C. Tu // Photochemical & Photobiological Sciences. – 2008. – Vol. 7. – P. 183–188.

245. Sutormin, O. S. Coupling of NAD(P)H:FMN-oxidoreductase and luciferase from luminous bacteria in a viscous medium: Finding the weakest link in the chain / O. S. Sutormin, E. V. Nemtseva, D. V. Gulnov [et al.] // Photochemistry and Photobiology. – 2024. – Vol. 100, Iss. 2. – P. 465–476.

246. Селиванова, М. А. Влияние на люминесцентные бактерии бета- и альфа-излучающих радионуклидов на примере трития и америция-241 : специальность 03.01.02 «Биофизика» : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Селиванова Мария Александровна ; Сибирский федеральный университет. – Красноярск, 2013. – 117 с.

247. Bondareva, L. Tritium: Doses and Responses of Aquatic Living Organisms (Model Experiments) / L. Bondareva, N. Kudryasheva, I. Tananaev // Environments. – 2022. – Vol. 9, Iss. 4. – P. 51.

248. Kolesnik, O. V. Radioprotective Properties of Fullerenol: Cellular, Biochemical and Physicochemical Approaches / O. V. Kolesnik, A. S. Grabovoy, G. A. Badun, G. N. Churilov, N. S. Kudryasheva // Eurasian Journal of Chemistry. – 2024. – Vol. 29, Iss. 3. – P. 72-81.

249. Vikram, A. Prior Bleeding Enhances the Sensitivity of Peripheral Blood and Bone Marrow Micronucleus Tests in Rats / A. Vikram, P. Ramarao, G. Jena // Mutagenesis. – 2007. – Vol. 22, Iss. 4. – P. 287–291.

250. Moertl, S. Radiation exposure of peripheral mononuclear blood cells alters the composition and function of secreted extracellular vesicles / S. Moertl, D. Buschmann, O. Azimzadeh [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2020. – Vol. 21, Iss. 7.

251. Campbell, T. Evaluation and Interpretation of the Peripheral Blood of Mammals / T. Campbell, K. Grant // Exotic Animal Hematology and Cytology. – John Wiley & Sons Inc, 2022. – ISBN 9781119660231. – P. 23–58.

ПРИЛОЖЕНИЕ А**(справочное)****Изучение воздействия радионуклида трития на клетки крови кроликов в
отсутствии и в присутствии гуминовых веществ**

Эксперименты по исследованию воздействия трития на клетки крови кроликов проводились в 2023–2024 годах в лаборатории кафедры внутренних незаразных болезней, акушерства и физиологии сельскохозяйственных животных на зооферме Института прикладной биотехнологии и ветеринарной медицины; в научно-информационном центре ФГБОУ ВО «Красноярский государственный аграрный университет»; а также в Центре биомедицинских исследований «Международный центр исследования экстремальных состояний организма» Федерального исследовательского центра «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» в рамках совместного проекта РФФИ №23-26-10018 Жигаревым А. А. и Федотовой А. С.

Исследование проводилось на калифорнийских кроликах в возрасте 7 месяцев, средняя масса животных составляла $4,45 \pm 0,35$ кг. В эксперименте были задействованы две группы: экспериментальная (10 особей) и контрольная (15 особей).

Кролики содержались в индивидуальных клетках на зооферме. Рацион питания и система содержания кроликов во всех группах не отличались. Все кролики были подвергнуты клиническому обследованию. Были исследованы следующие общие физиологические параметры: температура тела; частота дыхания; частота сердечных сокращений, вес, упитанность; состояние тела, телосложение; позвоночник, состояние кожи, волосяного покрова и зубов, реакция на внешние раздражители, слизистые оболочки, лимфатические узлы.

Помимо этого, оценивалась фагоцитарная активность лейкоцитов крови. Кровь собирали из краевой вены ушной раковины в вакуумные пробирки с добавлением гепарина натрия. Было проанализировано 75 образцов венозной

крови. Фагоцитарная активность лейкоцитов крови определялась путем введения латексных частиц (концентрация $5 \cdot 10^8$ частиц/мл) в образцы крови *in vitro*, опсонизированных белками пула сыворотки кроликов, с последующим окрашиванием 0,25%-ым раствором генцианового фиолетового ($C_{25}H_{30}N_3Cl$) в 3%-ом растворе уксусной кислоты (CH_3COOH). Активность фагоцитов оценивалась микроскопически (увеличение $\times 40$) в камере Горяева путем подсчета 100 фагоцитов. Статистическая обработка цифровых данных проводилась с использованием методов вариационной статистики (программное обеспечение Microsoft Office Excel 2007).

Схема эксперимента представлена на Рисунке А.1. Кролики экспериментальной группы получали тритиевую воду (НТО) в дозе 2,27 МБк/сутки в течение 4 и 20 дней или 2,72 МБк/сутки в рамках 10-дневного эксперимента (Этап 1 на Рисунке А.1). При расчете поглощенных доз учитывалось равномерное распределение НТО по органам животных, а также эффективное время полувыведения изотопа из организма, составляющее 10 дней [1–4]. В результате расчетов были определены поглощенные дозы, которые составили 0,38, 2,18 и 5,73 мГр после 4, 10 и 20 дней эксперимента соответственно.

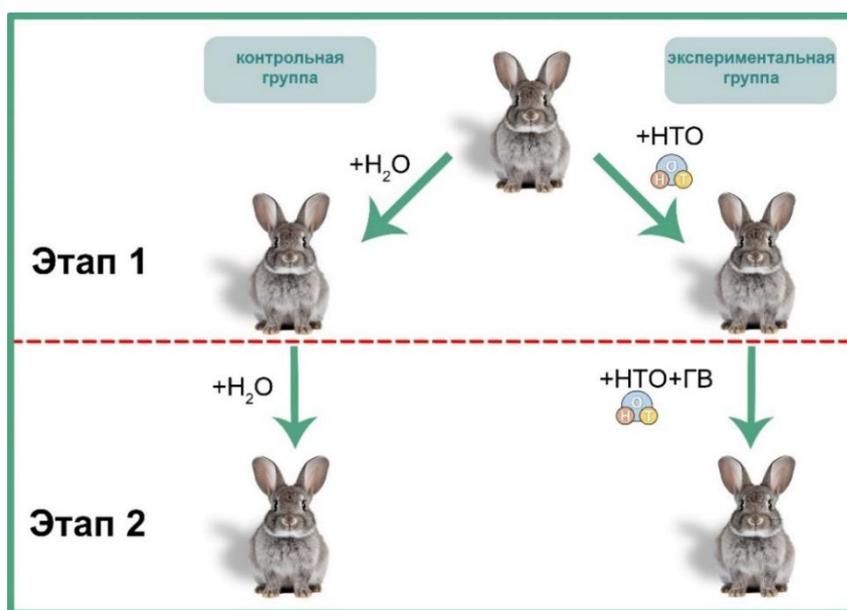


Рисунок А.1 – Схема эксперимента с кроликами. Этап 1 представляет эксперимент только с НТО; Этап 2 представляет эксперимент НТО+ГВ

При достижении поглощенной дозы 5,73 мГр кроликам вводили гуминовые вещества (10^{-3} г/л) в 1 МБк/л НТО (НТО+ГВ) в течение 20 дней (Этап 2 на Рисунке А.1). ГВ рассматривались как потенциальный радиопротектор. Анализы крови проводились на 8-й, 13-й и 20-й дни эксперимента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ к приложению А

1. Федотова, А. С. Ветеринарная радиобиология : учебное пособие / А. С. Федотова, А. С. Кашин. – Красноярск : Краснояр. гос. аграр. ун-т., 2007. – 110 с
2. Роднева, С. М. Генотоксический эффект оксида трития и ^3H -тимидина в селезенке и костном мозге крыс Wistar при длительном поступлении с питьевой водой / С. М. Роднева, Л. П. Сычева, А. А. Максимов [и др.] // Медицинская радиология и радиационная безопасность. – 2024. – Т. 69, №5. – 15–20.
3. Hill, R. L. Metabolism and dosimetry of tritium / R. L. Hill, J. R. Johnson // Health Physics. – 1993. – Vol. 65, Iss. 6. – P. 628–647.
4. Eisenbud, M. Tritium in the environment NCRP Report No 62 / M. Eisenbud, B. Bennett, R. E. Blanco [et al.] // International symposium on the behaviour of tritium in the environment / IAEA. – Vienna, 1979. – P. 585-587.