

УДК 577.21: 546.795

ВОЗДЕЙСТВИЕ ТОРИЯ-232 НА БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНУЮ ФЕРМЕНТАТИВНУЮ СИСТЕМУ И РАДИОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ

© 2024 г. **Т.В. Рожко***, **О.В. Колесник****, *******, **#**, **А.С. Сачкова******, **Н.Ю. Романова***,
Д. И. Стом*****, **Н.С. Кудряшева****, *******

*Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России,
ул. Партизана Железняка, 1, Красноярск, 660022, Россия

**Институт биофизики СО РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Красноярский научный центр
Сибирского отделения РАН», Академгородок, 50/50, Красноярск, 660036, Россия

***Сибирский федеральный университет, Свободный просп., 79, Красноярск, 660041, Россия

****Томский политехнический университет, просп. Ленина, 30, Томск, 634050, Россия

*****Байкальский музей СО РАН,

Академическая ул., 1, Листвянка Иркутского района Иркутской области, 664520, Россия

#E-mail: olga.kolesnik.krsk@gmail.com

Поступила в редакцию 24.01.2024 г.

После доработки 18.03.2024 г.

Принята к публикации 20.03.2024 г.

Изучение низкодозовых эффектов актуально в связи с расширением районов с антропогенной нагрузкой. Торий – один из фонообразующих элементов в природных экосистемах, его содержание может повышаться в окружающей среде в ходе добычи природных ресурсов и работы ТЭЦ. Особый интерес представляют биоэффекты тория в присутствии гуминовых веществ – природных детоксикантов. Целью работы является выявление нейтрализующего эффекта гуминовых веществ в условиях низкодозового воздействия тория-232 (< 0.04 Гр). В качестве модельного биологического объекта выбрана биолюминесцентная система ферментативных реакций, включающая бактериальную люциферазу и НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазу. Выявлена активация биолюминесценции на начальном этапе воздействия тория-232 (до 50 мин) и увеличение содержания активных форм кислорода после 50 мин его воздействия. Показана связь интенсивности биолюминесценции и содержания активных форм кислорода (коэффициент корреляции -0.86). Присутствие гуминовых веществ нейтрализует активирующее действие тория и уменьшает содержание активных форм кислорода до контрольного значения. Продемонстрировано влияние гуминовых веществ на скорость НАДН-зависимого ферментативного редокс-процесса. Полученные результаты вносят вклад в понимание молекулярных механизмов воздействия тория-232 и нейтрализации его влияния на ферментативные процессы.

Ключевые слова: торий-232, биолюминесценция, ферментативный биотест, радиопротекция, гуминовые вещества, активные формы кислорода.

DOI: 10.31857/S0006302924030034, EDN: OGGZUW

Воздействие низкодозового облучения на живые организмы в настоящее время представляет особый интерес в связи с распространением радиоактивного загрязнения [1]. Продукты распада радиоактивных элементов могут воздействовать на сопряженные химические и биологические процессы в природных экосистемах; эти процес-

сы сопровождаются естественным изменением баланса экосистемы в целом.

Торий-232 представляет собой природный альфа-излучатель. Он является одним из наиболее распространенных радиоактивных фонообразующих элементов в природных экосистемах [2]. Природный торий – мягкий серебристо-белый металл, он содержится в следовых количествах в природных фосфатах, полиоксидах и силикатах. В настоящее время торий рассматривается как перспективный энергетический материал; он является ядерным топливным сырьем, при погло-

Сокращения: ФМН – флавиномононуклеотид, АФК – активные формы кислорода, ГВ – гуминовые вещества, КРАБ – комплект реактивов для аналитической биолюминесценции.

щении нейтронов превращается в уран-233, который, в свою очередь, является основой уран-ториевого топливного цикла [3, 4].

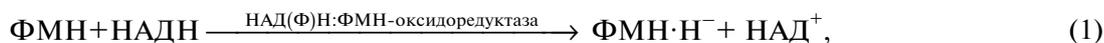
Торий имеет несколько изотопов, как природных, так и искусственных; все они являются радиоактивными. Природный торий содержит 2 изотопа: торий-232 – наиболее распространенная форма тория, долгоживущий материнский источник альфа-излучения (время полураспада – $1.4 \cdot 10^{10}$ лет), родоначальник радиоактивного семейства тория; второй изотоп – торий-228, находящийся в равновесии с торием-232, также является альфа-излучателем с периодом полураспада 1.91 года [5].

Опасность тория как внешнего источника альфа-излучения невысока, но, поскольку торий присутствует в воздухе, воде, почве и биологических материалах, существует риск его попадания в организм во время приема пищи или при контакте с кожей. Инкорпорированный торий как типичный альфа-излучатель представляет большую опасность для живого организма. Попадая в кровь, он может привести к заболеваниям кровеносной системы и к образованию специфических опухолей. Радионуклид высокотоксичен и имеет тенденцию к накоплению в тканях организма [6, 7].

Повышенное внимание к воздействию токсичных веществ на водную экосистему и человека привело к использованию чувствительных организмов в качестве биоиндикаторов для мониторинга и управления загрязнением окружающей среды.

Микроорганизмы являются основной и простейшей частью водных экосистем, внося значительный вклад в баланс экосистемы, а их физиологические показатели служат индикаторами состояния биосферы в целом. БиOLUMИНЕСЦЕНТНЫЕ системы, основанные на светящихся бактериях, являются удобными биообъектами для изучения токсичности водных сред [8–15], а также биологических эффектов радиации [16–18].

Для мониторинга токсичности окружающей среды широко распространен ферментативный биOLUMИНЕСЦЕНТНЫЙ биотест, основанный на системе двух сопряженных ферментативных реакций, одна из которых – реакция, катализируемая бактериальной люциферазой. Принцип люциферазных биотестов заключается в обнаружении ингибирующих свойств тестируемых веществ и смесей по их влиянию на биOLUMИНЕСЦЕНТНЫЕ ферментативные реакции, что позволяет более детально изучить механизм действия токсиканта [19]. БиOLUMИНЕСЦЕНТНАЯ биферментная система включает две ферментативные реакции:



В результате реакции (1), катализируемой НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазой, происходит восстановление флавинонуклеотида (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 флавинонуклеотида (ФМН·Н⁻).

Реакция (2), катализируемая люциферазой, является биOLUMИНЕСЦЕНТНОЙ. В этой реакции восстановленный флавинонуклеотид и алифатический альдегид (RCHO) окисляются кислородом воздуха. В результате реакции испускается квант света. При этом наблюдается длительное свечение, обусловленное множественными оборотами фермента.

В настоящее время описанная бактериальная биферментная система активно используется в

биOLUMИНЕСЦЕНТНЫХ анализах в экологии, сельском хозяйстве и других областях [20–22].

Биологические эффекты низкодозовой радиации в настоящее время связывают с образованием активных форм кислорода (АФК) [23, 24]. Под термином «активные формы кислорода» понимают совокупность взаимопревращающихся реакционноспособных форм кислорода [25], у которых периоды полупревращения находятся в диапазоне от наносекунд до часов [26]. Эти формы могут возникать во многих химических и биологических процессах в виде молекул, ионов и свободных радикалов. К группе АФК относятся супероксид анион-радикал (O₂⁻), пероксид водорода (H₂O₂), гидроксильный радикал (·OH), синглетный кислород (¹O₂), гипохлорит (HOCl), гидропероксильный радикал (HOO·), а также окись азота (NO) и пероксинитрит (ONOO⁻), обладающие высокой окислительной активностью.

Традиционно АФК рассматриваются как инициаторы окислительного стресса и повреждений, что приводит к износу тканей и органов, старе-

нию и болезням [24]. АФК постоянно генерируются, изменяются и потребляются во всех живых организмах в результате их аэробного функционирования. Существуют данные о положительном влиянии АФК на физиологию. Показано, что в низких и умеренных дозах АФК способствуют регуляции жизненно важных физиологических функций [3]; они ответственны за пролиферацию, миграцию, дифференцировку и метаболизм [27, 28]. Их роли значительно различаются в зависимости от типов АФК, реакций, в которых они участвуют, и молекул-мишеней, с которыми они реагируют. В биологических процессах АФК являются естественными побочными продуктами метаболических окислительных процессов и играют важную роль в передаче клеточного сигнала и гомеостазе. Участие АФК в биоэффектах наноструктур разного типа в настоящее время активно исследуется [29–31].

Известно, что радиоактивный распад в водных растворах приводит к образованию АФК [32–34], которые могут воздействовать на обитателей водной среды. Существует взаимосвязь между содержанием АФК в радиоактивных растворах и изменением физиологических функций организмов. Так, в работах [33–36] рассматривалась роль АФК в воздействиях радионуклидов на люминесцентные бактерии и их ферментативные реакции.

В работе [37] было изучено влияние радионуклида тория на биолюминесценцию морских бактерий и их ферментативную систему. Было показано, что нитрат тория умеренно активировал биолюминесценцию бактерий и ферментативную систему. (до 50%) при малых дозах воздействия (< 0.1 Гр). Помимо этого, в условиях экспериментов наблюдалось снижение содержания активных форм кислорода.

Биологические реакции на облучение могут меняться в зависимости от молекулярного окружения. Добавление органических молекул может изменять ионное и радикальное состояния водных растворов альфа- и бета-излучающих изотопов, изменяя тем самым окружение водных обитателей и, следовательно, их реакции на растворы радионуклидов. Гуминовые вещества (ГВ), продукты естественной окислительной трансформации органических веществ в почве и донных отложениях, являются важными компонентами окружающей среды и земной коры в целом. Они оказывают решающее влияние на наземные экосистемы, т.к. воздействуют на сложные химические процессы в почве [38], а также регулируют глобальные циклы углерода и азота, рост растений и микроорганизмов [39]. ГВ содержатся в почве (60%), воде и воздухе, соответственно в твердом состоянии, в виде растворов и аэрозолей. Основными наземными источниками ГВ являются природные руды, торф, лигнит.

Гуминовые вещества известны как природные нейтрализаторы токсичности загрязняющих веществ. Их способность детоксицировать водные растворы является предметом интереса для исследователей. Гуминовые вещества представляют собой супрамолекулярные структуры гетерогенных молекул, состоящих из сахаров, жирных кислот, полипептидов, алифатических цепей и ароматических колец, удерживаемых вместе гидрофобными взаимодействиями и водородными связями [40]. Предполагается, что радиопротекторный эффект ГВ связан с их комплексообразующими и окислительно-восстановительными способностями, приводящими к снижению концентрации свободного токсического соединения в водных растворах [41, 42]. Кроме того, ГВ способны интенсифицировать физиологические функции организмов, поэтому в последнее время их детоксицирующий эффект рассматривается как более сложный, имеющий двойную природу – внешнюю и внутреннюю по отношению к организму [42–44]. В настоящее время реагирование организмов на токсичные соединения в присутствии ГВ является предметом внимания биофизиков и токсикологов, в частности, при изучении радиопротекторной активности ГВ [36, 45–47].

Целью данной работы является выявление детоксицирующего эффекта ГВ в растворах тория-232 в условиях низкодозового облучения; поглощенная доза не превышала 0.04 Гр. В качестве модельного биологического объекта выбрана биолюминесцентная ферментативная система, которая ответственна за свечение морских бактерий. Рассмотрено влияние ГВ на интенсивность биолюминесценции, содержание АФК и скорости НАДН-зависимой ферментативной реакции (1).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы и материалы. В работе использовали восстановленный никотинамидадениндинуклеотид (LLC, США), флавиномононуклеотид (Sigma, Франция), тетрадеканаль (RCHO) (Serva, Германия).

Источником альфа-излучения служил азотно-кислый торий-232 ($\text{Th}(\text{NO}_3)_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) со следующими паспортными данными: 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%.

Комплект реактивов для аналитической биолюминесценции (КРАБ) включает лиофилизированные препараты люциферазы *Photobacterium leiognathi* (0.5 г/л) и НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазы из *Vibrio fischeri* (0.15 ед. активности). Для приготовления раствора препарата ферментов

КРАБ во флакон вносили калий-фосфатный буфер (0.05M, pH 6.8).

В работе использовали угольные гуминоподобные вещества (препарат «Гумат-80» (ООО «Гумат», Иркутск, Россия)). Препарат получен механохимической реакцией бурого окисленного угля (Черемховское месторождение, Россия) со щелочью (KOH, NaOH) [48]. Характеристики препарата: гуминовые кислоты $\approx 85\%$, растворимый калий (K_2O) – 9%, Fe – 1%, вода – 5%, pH 8–9 в 1% водном растворе. Элементный состав используемого препарата: C – 64.5%, H_2 – 4.2%, N_2 – 2.3%, O_2 – 29.0%.

Для регистрации кинетики биолюминесцентного и хемилюминесцентного сигналов был использован планшетный люминометр Luminoskan Ascent (Thermo Electron Corp., США).

Скорости окисления NADH определяли по изменению оптической плотности раствора на спектрофотометре UVIKON-943 (KONTRON Instruments, Italy).

Анализ образцов проводили при комнатной температуре (20°C). Каждое измерение проводили в 15–20 повторностях.

Регистрация биолюминесценции при воздействии тория-232 на ферментативную систему. Для мониторинга воздействия тория использовали биолюминесцентную систему двух связанных реакций, катализируемых НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазой и люциферазой.

Контрольный (нерадиоактивный) образец имел следующий состав: 6 мкл препарата ферментов «КРАБ», 25 мкл 0.0025%-го раствора тетрадеканала CH_{30} , 50 мкл 0.05 M калий-фосфатного буфера (pH 6.8), 25 мкл $5.4 \cdot 10^{-4}$ M раствора ФМН, 100 мкл $4 \cdot 10^{-4}$ M раствора НАДН.

Радиоактивные образцы имели следующий состав: 6 мкл препарата ферментов «КРАБ» в растворе тория-232 ($C_{Th} = 10^{-9}, 10^{-7}, 10^{-5}$ и 10^{-3} M), 25 мкл 0.0025%-го раствора тетрадеканала CH_{30} , 50 мкл 0.05 M калий-фосфатного буфера (pH 6.8), 25 мкл $5.4 \cdot 10^{-4}$ M раствора ФМН, 100 мкл $4 \cdot 10^{-4}$ M раствора НАДН.

Для оценки влияния тория на ферментативную систему использовали относительную величину – I^{rel} . Для ее расчета максимальную интенсивность биолюминесценции в растворах тория-232, I_{Th} , сопоставляли с максимальной интенсивностью контрольного (нерадиоактивного) образца, I_k :

$$I^{rel} = \frac{I_{Th}}{I_k}$$

Регистрация биолюминесценции при воздействии тория-232 на ферментативную систему в при-

сутствии гуминовых веществ. При исследовании действия гуминовых веществ на ферментативную систему в присутствии тория интенсивность биолюминесценции измеряли в смесях следующего состава: 6 мкл препарата ферментов «КРАБ» в растворе тория-232 ($C_{Th} = 10^{-9}, 10^{-7}, 10^{-5}$ и 10^{-3} M) в присутствии ГВ ($C_{ГВ} = 10^{-4}$ г/л), 25 мкл 0.0025%-го раствора тетрадеканала CH_{30} , 50 мкл 0.05 M калий-фосфатного буфера (pH 6.8), 25 мкл $5.4 \cdot 10^{-4}$ M раствора ФМН, 100 мкл $4 \cdot 10^{-4}$ M раствора НАДН.

Для оценки влияния тория на ферментативную систему использовали относительную величину – I^{rel} . Для ее расчета максимальную интенсивность биолюминесценции в растворах тория-232 и гуминовых веществ, $I_{Th+ГВ}$, сопоставляли с максимальной интенсивностью контрольного (нерадиоактивного) образца, I_k :

$$I^{rel} = \frac{I_{Th+ГВ}}{I_k}$$

Исследование содержания АФК при воздействии радионуклида тория-232 на ферментативную систему в отсутствие и присутствии гуминовых веществ. Для оценки содержания АФК в ферментативной системе при воздействии тория-232 в отсутствие и присутствии ГВ использовали хемилюминесцентный люминольный метод. Этот метод определяет интегральное содержание АФК.

Регистрацию максимальной интенсивности хемилюминесценции в контрольных (нерадиоактивных) и радиоактивных образцах в отсутствие и в присутствии ГВ проводили сразу же после регистрации интенсивности биолюминесценции в одних и тех же ячейках добавлением 50 мкл водно-щелочного раствора люминола ($C = 10^{-4}$ M) и 75 мкл раствора $K_3[Fe(CN)_6]$ ($C = 10^{-3}$ M).

Для определения содержания активных форм кислорода в растворах разного состава, предварительно была построена калибровочная кривая зависимости максимальной интенсивности хемилюминесценции от концентрации пероксида водорода (H_2O_2) как одного из представителей активных форм кислорода. Калибровочная кривая приведена ранее в статье [37].

Для оценки содержания активных форм кислорода при воздействии тория-232 в отсутствие гуминовых веществ использовали относительную величину – $A\Phi K^{rel}$, которую определяли выражением:

$$A\Phi K^{rel} = \frac{A\Phi K_{Th}}{A\Phi K_k}$$

где $A\Phi K_{Th}$ – содержание АФК в радиоактивном растворе, $A\Phi K_k$ – содержание АФК в контрольном (нерадиоактивном) образце.

Таким же образом оценивали содержание АФК при воздействии тория-232 в присутствии ГВ:

$$A\Phi K^{rel} = \frac{A\Phi K_{Th+ГВ}}{A\Phi K_k},$$

где $A\Phi K_{Th+ГВ}$ – содержание АФК в радиоактивном растворе в присутствии гуминовых веществ; $A\Phi K_k$ – содержание АФК в контрольном (нерадиоактивном) образце.

Измерение скорости окисления НАДН в растворах тория в отсутствие и присутствии гуминовых веществ. Влияние тория-232 на скорость окисления НАДН исследовали с использованием растворов, включающих: НАДН ($C = 4 \cdot 10^{-4}$ М), калий-фосфатный буфер ($C = 0.05$ М, pH 6.8), препарат ферментов КРАБ, ФМН ($C = 5 \cdot 10^{-4}$ М), торий-232 ($C = 10^{-7}$ М), гуминовые вещества ($C = 10^{-4}$ г/л).

Скорость окисления НАДН (V) рассчитывали как:

$$V = -\frac{\Delta C}{\Delta t},$$

где Δt – изменение времени (10 мин), ΔC – изменение концентрации НАДН, высчитываемое по формуле:

$$\Delta C = \frac{\Delta D}{\epsilon l},$$

где ΔD – изменение оптической плотности, ϵ – молярный коэффициент экстинкции на длине волны 340 нм ($8250 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), l – оптический путь света в растворе (1 см).

Статистическая обработка. Чтобы оценить зависимость между относительной интенсивностью биолюминесценции (I^{rel}) и содержанием АФК ($A\Phi K^{rel}$), была проанализирована статистическая корреляционная связь между этими признаками: рассчитаны ранговые коэффициенты корреляции Спирмена – r [49]. Применение рангового метода было оправдано отсутствием нормального распределения интенсивности биолюминесценции и содержания АФК, а также ограниченным набором данных. Сеты данных распределения во времени по каждому типу образца (для каждой концентрации тория-232) проверялись в программе Statistica 6.0 методами Шапиро–Уилка и Лиллиефорса (расчетные типы тестов, позволяющие оценивать нормальность для малого объема выборок), а также построением в этой же программе нормально-вероятностных графиков (косвенно-графический тест). Все три

метода дали отсутствие нормального распределения.

В результате расчета непараметрического коэффициента корреляции Спирмена в программе Statistica 6.0 получены значения r и уровень значимости нулевой гипотезы p ; пороговое значение p было установлено на уровне 0.05, сравнение проводилось автоматически.

Для представления данных на рисунках рассчитывали медианы и интерквартильные интервалы Me [0.25;0.75]. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Статистическую обработку результатов и построение графиков проводили с использованием пакетов прикладных программ MS Office (Microsoft, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Воздействие тория-232 на биолюминесценцию ферментативной системы в отсутствие и присутствии гуминовых веществ. Проанализировано влияние тория-232 и гуминовых веществ (ГВ) на биолюминесценцию ферментативной системы (рис. 1). Во всех случаях доза облучения ферментативной системы не превышала 0.04 Гр. Использование более концентрированных растворов тория было ограничено необходимостью поддержания оптимальной кислотности среды в ферментативной системе [37].

Из рис. 1а видно, что кинетические кривые в отсутствие ГВ немонотонны. На начальном этапе воздействия тория наблюдается стадия активации биолюминесценции ($I^{rel} > 1$). Наличие активации указывает на применимость модели гормезиса [50, 51] к эффекту тория. Схожую активацию биолюминесценции в присутствии тория-232 наблюдали ранее и для люминесцентных бактерий, т.е. для клеточной системы [37]. Вероятно, активация ферментативной системы вносит вклад в низкоконцентрационные активационные эффекты тория-232 для клеточных организмов.

На рис. 1б приведены кинетики биолюминесценции ферментативной системы в растворах тория-232 в присутствии ГВ. Для экспериментов выбрана концентрация ГВ, равная 10^{-4} г/л, не влияющая на интенсивность биолюминесценции биферментной системы контрольного раствора (без радионуклида). Как видно из сравнения рис. 1а и 1б, гуминовые вещества смещают кинетические кривые к контролю ($I^{rel} \approx 1$, рис. 1б), тем самым нейтрализуя воздействие тория на ферментативную систему.

Содержание активных форм кислорода при воздействии тория-232 на ферментативную систему в отсутствие и присутствии гуминовых веществ. Изучено содержание АФК в ферментативной систе-

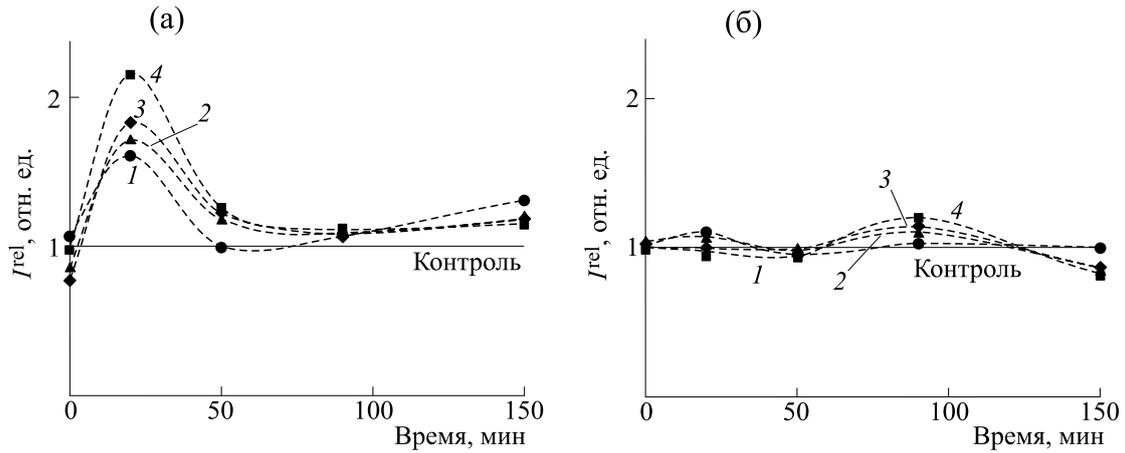


Рис. 1. Кинетика свечения ферментативной системы в растворах тория-232 в отсутствие (а) и в присутствии (б) гуминовых веществ ($C = 10^{-4}$ г/л). Концентрации тория: кривая 1 – 10^{-9} М, кривая 2 – 10^{-7} М, кривая 3 – 10^{-5} М, кривая 4 – 10^{-3} М. Для значений I^{rel} отклонения от медианы 1 и 3 квартилей не превышают 1%.

ме в присутствии тория различной концентрации (рис. 2).

Из рис. 2а виден нелинейный отклик содержания АФК в ферментативной системе: при времени регистрации 90 мин наблюдали увеличение содержания АФК по сравнению с контролем ($A\Phi K^{\text{rel}} > 1$). При этом при высоких концентрациях тория (10^{-5} и 10^{-3} М) содержание АФК увеличивается в 12 раз по сравнению с контролем, при концентрации 10^{-7} М – в 4 раза, а наименьшая концентрация (10^{-9} М) не изменяет содержания АФК в течение всего времени воздействия тория ($A\Phi K^{\text{rel}}$ близко к 1). При малых временах воздействия тория (до 50 мин) наблюдали умеренное (до 30%) снижение содержания АФК.

Из сравнения рис. 1а и 2а видно, что эффекты тория-232 в ферментативной системе разнесены во времени: торий увеличивает интенсивность биолюминесценции (I^{rel}) в начальный промежуток времени воздействия, а содержание АФК ($A\Phi K^{\text{rel}}$) – после 50 мин наблюдения. Оба эффекта являются локальными, т.е. стремятся к контрольным значениям с увеличением времени воздействия.

Как видно из рис. 2б, воздействие тория на ферментативную систему в присутствии гуминовых веществ практически не изменяет содержания АФК ($A\Phi K^{\text{rel}}$ близко к 1). Таким образом, как и в случае интенсивности биолюминесценции (рис. 1б), мы наблюдаем нейтрализацию эффекта тория гуминовыми веществами.

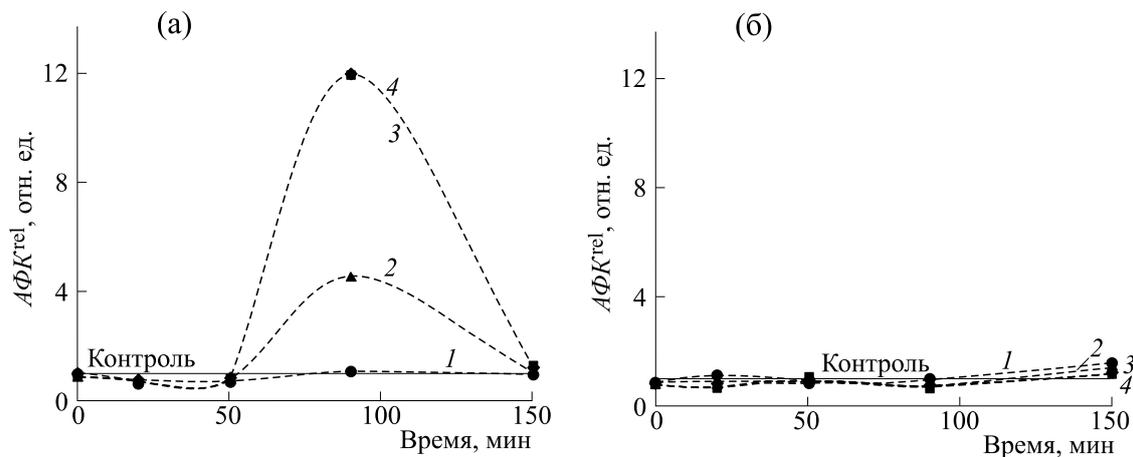


Рис. 2. Относительное содержание АФК ($A\Phi K^{\text{rel}}$) в ферментативной системе при воздействии тория-232 в отсутствие (а) и в присутствии (б) гуминовых веществ ($C = 10^{-4}$ г/л). Концентрации тория: кривая 1 – 10^{-9} М, кривая 2 – 10^{-7} М, кривая 3 – 10^{-5} М, кривая 4 – 10^{-3} М. Концентрация АФК в контрольном (нерадиоактивном) образце – $9.1 \cdot 10^{-7}$ М. Для значений $A\Phi K^{\text{rel}}$ отклонения от медианы 1 и 3 квартилей не превышают 5%.

Таблица 1. Коэффициенты корреляции r между зависимостями интенсивности биолюминесценции и содержания АФК от времени в ферментативной системе в присутствии тория-232

Концентрация тория-232, М	0 (контроль)	10^{-9}	10^{-7}	10^{-5}	10^{-3}
r	-0.86	-0.79	-0.64	-0.64	-0.43

Следует отметить, что концентрация АФК в ферментативной системе в отсутствие тория-232 не изменяется при добавлении ГВ и стабильна во времени.

Корреляции между интенсивностью биолюминесценции и содержанием АФК. Были рассчитаны ранговые коэффициенты корреляции Спирмена, r , между зависимостями относительной интенсивности биолюминесценции (I^{rel}) и содержания АФК ($A\Phi K^{rel}$) от времени в нерадиоактивных (контрольных) и радиоактивных растворах.

Значения r в растворах тория-232 в отсутствие гуминовых веществ указаны в табл. 1.

Результаты показывают значимую ($p < 0.05$) отрицательную корреляцию, т.е. обратную связь между интенсивностью биолюминесценции (I^{rel}) и содержанием АФК ($A\Phi K^{rel}$) в ферментативной системе. Величины r свидетельствуют о высоких и умеренных корреляциях. Этот результат можно связать со следующими процессами в биолюминесцентной ферментативной системе [52, 53]:

(1) Потребление молекулярного кислорода в реакции бактериальной люциферазы со сдвигом равновесия в системе « $O_2 - A\Phi K$ ». Этот процесс, вероятно, ответственен за активацию биолюминесценции на начальном этапе воздействия тория (до 50 мин, $I^{rel} > 1$, рис. 1а) и одновременное снижение на 30% содержания АФК ($A\Phi K^{rel} < 1$, рис. 2а).

(2) Накопление пероксида водорода (представителя АФК) в биолюминесцентной ферментативной системе в темновых путях, не связанных с излучением кванта света. Именно этот процесс, вероятно, является причиной накопления АФК ($A\Phi K^{rel} > 1$, рис. 2а) после 50-минутного воздействия тория при одновременном стремлении интенсивности биолюминесценции к контрольному значению ($I^{rel} \rightarrow 1$, рис. 1а).

Добавление гуминовых веществ (рис. 1б и 2б) нейтрализовало воздействие тория-232 на интенсивность биолюминесценции (I^{rel}) и содержание АФК ($A\Phi K^{rel}$), приблизило эти характеристики к контрольным значениям, сделав отличия от контроля статистически недостоверными. При этом все значения r указывали на высокие отрицатель-

ные корреляции между зависимостями I^{rel} и $A\Phi K^{rel}$ от времени.

Таким образом, гуминовые вещества нейтрализовали воздействие тория-232 на ферментативную систему: они уменьшили активацию биолюминесценции и подавление АФК на начальном этапе воздействия тория-232 (до 50 мин), а также уменьшили содержание АФК при большем времени воздействия тория-232 (90 мин). Последний эффект гуминовых веществ является проявлением их антиоксидантной активности.

Скорость окисления НАДН в растворе тория в отсутствие и присутствии гуминовых веществ. Изучено влияние тория и гуминовых веществ на скорость окисления НАДН – эндогенного восстановителя в биолюминесцентной ферментативной системе. Окисление НАДН осуществляется в ферментативной системе в соответствии с реакцией (1), представленной выше. Определяли скорости окисления НАДН в ферментативной системе с различным содержанием компонентов – в отсутствие и в присутствии тория-232 и ГВ. Результаты приведены в табл. 2.

Из табл. 2 видно, что скорость автоокисления НАДН достаточно мала – 2.0 М/л. Добавление эндогенного окислителя ФМН к НАДН (реакция (1)) ускоряет окисление НАДН в 8 раз (до 16.2 М/л).

При добавлении тория-232 скорость автоокисления НАДН увеличивается до 6.1 М/л. Добавление тория-232 в реакцию (1) значительно увеличивает скорость окисления НАДН – до 26.7 М/л. Последний результат указывает на то, что торий-232 повышает эффективность окислительно-восстановительного ферментативного процесса (реакция (1)), выполняя роль дополнительного катализатора, что приводит к увеличению выхода биолюминесценции в реакции бактериальной люциферазы (реакция (2)). Этот результат объясняет возможность активации биолюминесценции в присутствии тория-232, продемонстрированной на рис. 1а.

Также было проанализировано влияние ГВ на изменение скорости окисления НАДН в присутствии тория-232. Как видно из сравнения второго и третьего столбцов табл. 2, ГВ дополнительно увеличивают как скорость автоокисления НАДН, так и скорость окисления этого вещества в присутствии ФМН (реакция (1)). При этом в соответ-

Таблица 2. Скорости расходования НАДН в ферментативной системе с различным содержанием компонентов в отсутствие и присутствии тория-232

№	Состав системы	V·108, М/л		
		В отсутствие тория-232	В присутствии тория-232	В присутствии тория-232 и ГВ
1	НАДН	2.0 ± 0.3	6.1 ± 0.5	8.8 ± 0.6
2	НАДН+ФМН (реакция (1))	16.2 ± 0.4	26.7 ± 0.7	36.8 ± 0.8

Примечание. Длина волны регистрации оптической плотности 340 нм. Концентрация тория-232 равна 10–7 М, концентрация ГВ – 10–4 г/л.

ствии с этой реакцией система увеличивает скорость наработки субстрата ФМН·Н⁻ для люминесцентной реакции (2) и, следовательно, увеличивает интенсивность биолюминесценции в биферментной системе. Однако мы наблюдаем уменьшение интенсивности биолюминесценции гуминовыми веществами (нейтрализации эффекта активации торием-232, см. рис. 1а,б). Вероятно, другие процессы ответственны за нейтрализацию эффекта тория гуминовыми веществами в ферментативной биолюминесцентной системе. Это может быть, например, расщепление ферментов люциферазы и редуктазы в присутствии гуминовых веществ [54–56].

Таким образом, увеличение интенсивности биолюминесценции ферментативной системы в присутствии тория-232 малых концентраций может быть связано с его каталитической активностью в окислительно-восстановительной реакции оксидоредуктазы (реакция (1)). Нейтрализация эффекта тория-232 гуминовыми веществами (рис. 1а,б) не связана с ускорением реакции (1), а, вероятно, определяется нарушением сопряжения ферментов в биферментной системе в присутствии гуминовых веществ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение низкодозовых биологических эффектов в настоящее время чрезвычайно актуально в связи с расширением районов радиоактивного загрязнения. Торий – один из самых распространенных фонообразующих элементов в природных экосистемах. Несмотря на распространенность данного элемента, в настоящее время его влияние на живые организмы изучено недостаточно. Для прогнозирования биоэффектов тория в природной среде особый интерес представляет влияние тория на биологические объекты в присутствии детоксикантов природного происхождения, таких как гуминовые вещества. Биолюминесцентные ферментативные биотесты являются оптимальной биотестовой системой

для выявления биохимических механизмов низкодозового воздействия тория.

В работе использована биолюминесцентная система двух ферментативных реакций, ответственная за свечение морских бактерий. Варьировали концентрацию тория-232 в ферментативной системе, определяли интенсивность биолюминесценции и содержание активных форм кислорода. Выявлена активация биолюминесценции (до 100%) на начальном этапе воздействия тория-232 (до 50 мин), а также 12-кратное увеличение содержания АФК после 50 мин его воздействия. Выявлена отрицательная корреляция между интенсивностью биолюминесценции и содержанием АФК; коэффициент корреляции Спирмена оказался равным –0.86. Показано, что ГВ нейтрализуют активирующее воздействие тория на биолюминесценцию и уменьшают содержание АФК до контрольного значения, проявляя антиоксидантную активность. Продемонстрировано влияние ГВ на скорость НАДН-зависимого ферментативного редокс-процесса.

Полученные результаты вносят вклад в понимание молекулярных механизмов воздействия тория-232 и возможности нейтрализации его воздействий на ферментативные процессы с помощью гуматов – веществ природного происхождения. Логическим продолжением данной работы, ее следующим этапом, должно стать изучение эффектов тория-232 на более сложные биологические системы (клетки, ткани, органы, организмы), а также возможности нейтрализации этих эффектов гуминовыми веществами.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (проект № FWES-2024-0018). Работа частично поддержана Российским научным фондом (грант № 23-26-10018) и Красноярским краевым фондом науки (проект «Прогнозирование реакции сельскохозяйственных животных на низкоинтенсивную радиацию и

применение радиопротекторов. Экспрессный биолюминесцентный скрининг радиобиологических эффектов»).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ali Y. F., Cucinotta F. A., Ning-Ang L., and Zhou G. Cancer Risk of Low Dose Ionizing Radiation. *Front. Phys.*, **8**, 234 (2020). DOI: 10.3389/fphy.2020.00234
2. Kulahci F. and Çiçek S. On the determination of transportation, range and distribution characteristics of Uranium-238, Thorium-232 and Potassium-40: a critical review. *Environ. Earth Sci.*, **78** (24), 721 (2019). DOI: 10.1007/s12665-019-8736-8
3. Phaniendra A., Jestadi D. B., and Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J. Clin. Biochem.*, **30** (1), 11–26 (2015). DOI: 10.1007/s12291-014-0446-0
4. Zuo L., Zhou T., Pannell B. K., Ziegler A. C., and Best T. M. Biological and physiological role of reactive oxygen species—the good, the bad and the ugly. *Acta Physiol.*, **214** (3), 329–348 (2015). DOI: 10.1111/apha.12515
5. Жерин И. И. и Амелина Г. Н. Торий. в кн. *Химия тория, урана, плутония*, под ред. В. А. Матюха и О. В. Водянкина (Изд. ТПУ, Томск, 2010), сс. 19–24.
6. Hassan S. S. M., Rahman E. M. A. R., El-Subruiti G. M., Kamel A. H., and Diab H. M. Removal of Uranium-238, Thorium-232, and Potassium-40 from Wastewater via Adsorption on Multiwalled Carbon Nanotubes. *ACS Omega*, **7** (14), 12342–12353 (2022). DOI: 10.1021/acsomega.2c00819
7. Chaudhury D., Sen U., Sahoo B. K., Bhat N. N., Kumara S., Karunakara N., Biswas S., Shenoy S., and Bose B. Thorium promotes lung, liver and kidney damage in BALB/c mouse via alterations in antioxidant systems. *Chem. Biol. Interact.*, **363**, 109977 (2022). DOI: 10.1016/j.cbi.2022.109977
8. Bulich A. A. and Isenberg D. L. Use of the luminescent bacterial system for the rapid assessment of aquatic toxicity. *ISA Trans.*, **20** (1), 29 (1981).
9. Abbas M., Adil M., Ehtisham-Ul-Haque S., Munir B., Yameen M., Ghaffar A. Shar G. A., Tahir M. A., and Iqbal M. *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review. *Sci. Total Environ.*, **626**, 1295–1309 (2018). DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.01.066
10. Ismailov A. D. and Aleskerova L. E. Photobiosensors containing luminescent bacteria. *Biochemistry*, **80**, 733–744 (2015). DOI: 10.1134/S0006297915060085
11. Ventura F. F., Mendes L. F., Oliveira A. G., Bazito R. C., Bechara E. J. H., Freire R. S., and Stevani C. S. Evaluation of Phenolic Compound Toxicity Using a Bioluminescent Assay with the Fungus *Gerronema viridilucens*. *Environ. Toxicol. Chem.*, **39** (8), 1558–1565 (2020). DOI: 10.1002/etc.4740
12. Li Y., He X., Zhu W. Li H., and Wang W. Bacterial bioluminescence assay for bioanalysis and bioimaging. *Anal. Bioanal. Chem.*, **414** (1), 75–83 (2022). DOI: 10.1007/s00216-021-03695-9
13. Syed A. J. and Anderson J. C. Applications of bioluminescence in biotechnology and beyond. *Chem. Soc. Rev.*, **50**, 5668–5705 (2021). DOI: 10.1039/D0CS01492C
14. Voon C. H., Yusop N. M., and Khor S. M. The state-of-the-art in bioluminescent whole-cell biosensor technology for detecting various organic compounds in oil and grease content in wastewater: From the lab to the field. *Talanta*, **241**, 123271 (2022). DOI: 10.1016/j.talanta.2022.123271
15. Ali S. A., Mittal D., and Kaur G. In-situ monitoring of xenobiotics using genetically engineered whole-cell-based microbial biosensors: recent advances and outlook. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **37**, 81 (2021); DOI: 10.1007/s11274-021-03024-3
16. Girotti S., Ferri E. N., Fumo M. G., and Maolini E. Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria. *Anal. Chim. Acta*, **608** (1), 2–29 (2008). DOI: 10.1016/j.aca.2007.12.008
17. Kudryasheva N. S. and Rozhko T. V. Effect of low-dose ionizing radiation on luminous marine bacteria: radiation hormesis and toxicity. *J. Environ. Radioact.*, **142**, 68–77 (2015). DOI: 10.1016/j.jenvrad.2015.01.012
18. Kolesnik O. V., Rozhko T. V., and Kudryasheva N. S. Marine Bacteria under Low-Intensity Radioactive Exposure: Model Experiments *Int. J. Mol. Sci.*, **24** (1), 410 (2023). DOI: 10.3390/ijms24010410
19. Кудряшева Н. С., Кратасюк В. А. и Есимбекова Е. Н. Взаимодействие веществ в биолюминесцентных системах как основа экологического мониторинга. В кн. *Физико-химические основы биолюминесцентного анализа*, под ред. А. Г. Сизых (Краснояр. гос. ун-т., Красноярск, 2002), сс. 63–84.
20. Esimbekova E., Kratasyuk V., and Shimomura O. Application of enzyme bioluminescence in ecology. In *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Ed. by G. Thouand and R. Marks (Berlin, Heidelberg, Springer, 2014), pp. 67–109. DOI: 10.1007/978-3-662-43385-0_3
21. Esimbekova E. N., Torgashina I. G., Kalyabina V. P., and Kratasyuk V. A. Enzymatic Biotesting: Scientific Basis and Application. *Contem. Probl. Ecol.*, **14**, 290–304 (2021). DOI: 10.1134/S1995425521030069
22. Roda A., Guardigli M., Michelini E., and Mirasoli M. Bioluminescence in analytical chemistry and in vivo imaging. *Trends Analyt. Chem.*, **28** (3), 307–322 (2009). DOI: 10.1016/j.trac.2008.11.015
23. Matsumoto H., Hamada N., Takahashi A. Kobayashi Y., and Ohnishi T. Vanguard of Paradigm Shift in Ra-

- diation Biology: Radiation-Induced Adaptive and Bystander Responses. *J. Radiat. Res.*, **48**, 97–106 (2007). DOI: 10.1269/jrr.06090
24. Smith R. W., Wang J., Schültke E., Seymour C. V., Brauer-Krisch E., Laissue J. A., Blattmann H., and Mothersill C. E. Proteomic changes in the rat brain induced by homogenous irradiation and by the bystander effect resulting from high energy synchrotron X-ray microbeams. *Int. J. Radiat. Biol.*, **89**, 118–127 (2013). DOI: 10.3109/09553002.2013.732252
 25. Колупаев Ю. Е. Активные формы кислорода в растениях при действии стрессоров: образование и возможные функции. *Вестн. Харьковского национального аграрного ун-та. Сер. Биология*, **3** (12), 6–26 (2007).
 26. Su Y., Song H., and Lv Y. Recent advances in chemiluminescence for reactive oxygen species sensing and imaging analysis. *Microchem. J.*, **146**, 83–97 (2019). DOI: 10.1016/j.microc.2018.12.056
 27. Griending K. K., Touyz R. M., Zweier J. L., Diaklov S., Chilian W., Chen Y.-R., Harrison D. G., and Bhatnagar A. Measurement of Reactive Oxygen Species, Reactive Nitrogen Species, and Redox-Dependent Signaling in the Cardiovascular System. *Circ. Res.*, **119** (5), 39–75 (2016). DOI: 10.1161/RES.000000000000110
 28. Suzen S., Gurer-Orhan H. and Saso L. Detection of Reactive Oxygen and Nitrogen Species by Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Technique. *Molecules*, **22** (1), 181 (2017). DOI: 10.3390/molecules22010181
 29. Sushko E. S., Vnukova N. G., Churilov G. N., and Kudryasheva N. S. Endohedral Gd-Containing Fullerenol: Toxicity, Antioxidant Activity, and Regulation of Reactive Oxygen Species in Cellular and Enzymatic Systems. *Int. J. Mol. Sci.*, **23** (9), 5152 (2022). DOI: 10.3390/ijms23095152
 30. Kicheeva A. G., Sushko E. S., Bondarenko L. S., Kydraliev K. A., Pankratov D. A., Tropskaya N. S., Dzeranov A. A., Dzhardimalieva G. I., Zarelli M., and Kudryasheva N. S. Functionalized Magnetite Nanoparticles: Characterization, Bioeffects, and Role of Reactive Oxygen Species in Unicellular and Enzymatic Systems. *Int. J. Mol. Sci.*, **24** (2), 1133 (2023). DOI: 10.3390/ijms24021133
 31. Stepin E. A., Sushko E. S., Vnukova N. G., Churilov G. N., Rogova A. V., Tomilin F. N., and Kudryasheva N. S. Effects of Endohedral Gd-Containing Fullerenols with a Different Number of Oxygen Substituents on Bacterial Bioluminescence. *Int. J. Mol. Sci.*, **25** (2), 708 (2024). DOI: 10.3390/ijms25020708
 32. Selivanova M. A., Rozhko T. V., Devyatovskaya A. N., and Kudryasheva N. S. Comparison of chronic low-dose effects of alpha- and beta-emitting radionuclides on marine bacteria. *Cent. Eur. J. Biol.*, **9** (10), 951–959 (2014). DOI: 10.2478/s11535-014-0331-0
 33. Alexandrova M., Rozhko T., Vydryakova G., and Kudryasheva N. Effect of americium-241 on luminous bacteria. Role of peroxides. *J. Environ. Radioact.*, **102**, 407–411 (2011). DOI: 10.1016/j.jenvrad.2011.02.011
 34. Azzam E. I., Jay-Gerlin J.-P., and Pain D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett.*, **327** (1–2), 48–60 (2012). DOI: 10.1016/j.canlet.2011.12.012
 35. Rozhko T. V., Nogovitsyna E. I., Badun G. A., Lukyanchuk A. N., and Kudryasheva N. S. Reactive Oxygen Species and low-dose effects of tritium on bacterial cells. *J. Environ. Radioact.*, **208–209**, 106035 (2019). DOI: 10.1016/j.jenvrad.2019.106035
 36. Rozhko T. V., Kolesnik O. V., Badun G. A., Stom D. I., and Kudryasheva N. S. Humic Substances Mitigate the Impact of Tritium on Luminous Marine Bacteria. Involvement of Reactive Oxygen Species. *Int. J. Mol. Sci.*, **21** (18), 6783 (2020). DOI: 10.3390/ijms21186783
 37. Kolesnik O. V., Rozhko T. V., Lapina M. A., Solovyev V. S., Sachkova A. S., and Kudryasheva N. S. Development of Cellular and Enzymatic Bioluminescent Assay Systems to Study Low-Dose Effects of Thorium. *Bioengineering*, **8** (12), 194 (2021). DOI: 10.3390/bioengineering8120194
 38. Trevisan S., Francioso O., Quaggiotti S., and Nardi S. Humic substances biological activity at the plant-soil interface. *Plant Signal Behav.*, **5** (6), 635–643 (2010). DOI: 10.4161/psb.5.6.11211
 39. Lipczynska-Kochany E. Humic substances, their microbial interactions and effects on biological transformations of organic pollutants in water and soil: A review. *Chemosphere*, **202**, 420–437 (2018). DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.03.104
 40. Shah Z. H., Rehman H. M., Akhtar T., Alsamadany H., Hamooh B. T., Mujtaba T., Daur I., Zahrani Y. A., Alzahrani H. A. S., Ali S., Yang S. H., and Chung G. Humic Substances: Determining Potential Molecular Regulatory Processes in Plants. *Front. Plant Sci.*, **9**, 263 (2018). DOI: 10.3389/fpls.2018.00263
 41. Kudryasheva N. S., Stom D. I., and Tarasova A. S. Antioxidant activity of humic substances via bioluminescent monitoring in vitro. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **22**, 155 (2015). DOI: 10.1007/s10661-015-4304-1
 42. Bondareva L. and Kudryasheva N. Direct and Indirect Detoxification Effects of Humic Substances. *Agronomy*, **11** (2), 198 (2021). DOI: 10.3390/agronomy11020198
 43. Klocking R. and Helbig B. Humic Substances, Medical Aspects and Applications of. In *Biopolymers for medical and pharmaceutical applications*, Ed. by A. Steinbuchel and M. Hofrichter (WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005), pp. 3–16. DOI: 10.1002/3527600035.bpol1013
 44. Жилин Д. М. Исследование реакционной способности и детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к соединениям ртути (II). Дис. ... канд. хим. наук (Моск. гос. ун-т имени М. В. Ломоносова, М., 1998).
 45. Rozhko T., Bondareva L., Mogilnaya O., Vydryakova G., Bolsunovsky A., Stom D., and Kudryasheva N. S. Detoxification of AM-241 solutions by humic substances: bioluminescent monitoring. *Anal. Bioanal.*

- Chem.*, **400** (2), 329–334 (2011). DOI: 10.1007/s00216-010-4442-9
46. Goel P. and Dhingra M. Humic Substances: Prospects for Use in Agriculture and Medicine. In *Humic Substances*, Ed. by A. Makan (London, IntechOpen, 2021). DOI: 10.5772/intechopen.99651
 47. Shkarupa V. M. and Klymenko S. V. Radioprotective properties of sodium humate in radiation-induced mutagenesis in cultured lymphocytes of thyroid cancer patients. *Exp. Oncol.*, **38** (2), 108–111 (2016). DOI: 10.31768/2312-8852.2016.38(2):108-111
 48. Скрипкина Т. С. Механохимическая модификация структуры гуминовых кислот для получения комплексных соединений. Дис. ... канд. хим. наук (ИХТТМ СО РАН, Новосибирск, 2018).
 49. Gnurnan V. *Fundamentals of Probability Theory and Mathematical Statistics* (American Elsevier Publishing Co., 1968).
 50. Calabrese E. J. Hormesis: a fundamental concept in biology. *Microb. Cell.*, **1** (5), 145–149 (2014). DOI: 10.15698/mic2014.05.145
 51. Calabrese E. J. and Selby P. B. Comet assay and hormesis. *Environ Pollut.*, **341**, 122929 (2024). DOI: 10.1016/j.envpol.2023.122929
 52. Nemtseva E. V. and Kudryasheva N. S. The mechanism of electronic excitation in the bacterial bioluminescent reaction. *Russ. Chem. Rev.*, **76** (1), 101–112 (2007). DOI: 10.1070/RC2007v076n01ABEH003648
 53. Hastings J. W. and Gibson Q. H. Intermediates in the Bioluminescent Oxidation of Reduced Flavin Mononucleotide. *J. Biol. Chem.*, **238** (7), 2537–2554 (1963). DOI: 10.1016/s0021-9258(19)68004-x
 54. Петушков В. Н., Родионова Н. С. и Белобров П. И. Изучение эффективности работы биферментной системы NADH:FMN- оксидоредуктаза-люцифераза светящихся бактерий. *Биохимия*, **50** (3), 401–405 (1985).
 55. Tu S. C. Activity coupling and complex formation between bacterial luciferase and flavin reductases. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **7**, 183–188 (2008). DOI: 10.1039/B713462B
 56. O. S. Sutormin, E. V. Nemtseva, D. V. Gulnov, Sukovatyi L. A., Tyrtysnaya Y. S., Lisitsa A. E., and Kratasjuk V. A. Coupling of NAD(P)H:FMN-oxidoreductase and luciferase from luminous bacteria in a viscous medium: Finding the weakest link in the chain. *Photochem. Photobiol.*, **100** (2), 465–476 (2024). DOI: 10.1111/php.13845

Effects of Thorium-232 on the Bioluminescent Enzymatic System and Radioprotective Activity of Humic Substances

T.V. Rozhko*, **O.V. Kolesnik****, *******, **A.S. Sachkova******, **N.Yu. Romanova***, **D. I. Stom*******, and **N.S. Kudryasheva****, *******

*Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voyno-Yasenetskii, Ministry of Health of the Russian Federation, ul. Partizana Zheleznyaka 1, Krasnoyarsk, 660022 Russia

**Institute of Biophysics, Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center" of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Akademgorodok, 50/50, Krasnoyarsk 660036 Russia

*** Siberian Federal University, Svobodny prosp. 79, Krasnoyarsk, 660041

****Tomsk Polytechnic University, prosp. Lenina 30, Tomsk, 634050

*****Baikal Museum, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Akademicheskaya ul. 1, Listvyanka, Irkutsky district, Irkutsk Region, 664520

Research into the effects of low-dose radiation exposure is relevant due to an increase in the number of areas to which anthropogenic loading has occurred. Thorium is one of the radioactive elements naturally occurring in ecosystems; the amounts of thorium in the environment may be increased due to the activities related to the extraction of natural resources and operation of thermal power plants. Special interest focuses on the biological effects of thorium in the presence of humic substances as natural detoxicants. The aim of this study is to explore whether humic substances exert "mitigating" effects during exposure to thorium-232 at low-doses (< 0.04 Gy). A bioluminescent system of the enzymatic reactions including the bacterial luciferase and NADH:FMN-oxidoreductase has been chosen as a biological object. It was found that the activation of bioluminescence occurred in the initial stage of the exposure (up to 50 min) and production of reactive oxygen species increased after the 50 min exposure of this system to thorium-232. The relationship between the intensity of bioluminescence and the level of reactive oxygen species (correlation coefficient is –0.86) is shown. The addition of humic substances helps to neutralize thorium activity and reduce the level of reactive oxygen species to the control value. The effects of humic substances on the rate of NADH-dependent enzymatic process including redox reactions are shown. The results obtained contribute to the understanding of the mechanisms of the effects of thorium-232 at molecular level and its neutralization effects on the enzymatic processes.

Keywords: thorium-232, bioluminescence, enzyme bioassay, radioprotection, humic substances, reactive oxygen species