



\_\_Химическая структура молекулы целентерамида

\_\_Изменение спектров флуоресценции целентерамид-содержащих белков под действием химических реагентов и радиации

\_\_Вклады фиолетовой (I) и сине-зеленой (II) компонент в спектры флуоресценции целентерамид-содержащего белка («разряженного обелина») при различных временах воздействия трития (200 МБк/л)

## ТРИТИЙ И ЕГО БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Тритий в малых количествах всегда присутствует в окружающей среде, в основном в виде тритиевой воды, так как он постоянно образуется под действием космического излучения в верхних слоях атмосферы. До начала ядерной эры концентрация трития в природной воде была достаточно низкой — один атом трития на  $10^{18}$  атомов нерадиоактивного изотопа водорода, протия. Однако после проведения испытаний термоядерного оружия в атмосфере (конец 50-х — начало 60-х годов XX века) концентрация трития повысилась почти в 1000 раз. И хотя после прекращения испытаний концентрация трития снижалась, в последние годы наблюдается локальное увеличение содержания трития в окружающей среде как результат работы атомных электростанций.

В процессе распада тритий ( $^3\text{H}$ ) превращается в положительно заряженный изотоп гелия-3 с испусканием электрона и антинейтрино. Максимальный пробег образующихся при распаде бета-частиц (электронов) в воздухе 5,8 мм при 20°C, в биологической ткани — 6,5 мкм. Бета-частицы трития полностью поглощаются роговыми слоями кожи, так что внешнее облучение организма тритием и его соединениями не представляет опасности. Опасно его попадание в организм через кожу, легкие или при приеме пищи и воды и распад уже в организме. Являясь изотопом водорода, тритий химически ведет себя так же, как и нерадиоактивный водород (протий), и поэтому способен замещать его во всех соединениях с кислородом, серой, азотом, легко проникая в протоплазму любой клетки. В этом случае распад трития способен серьезно повредить внутриклеточные структуры, включая генетический аппарат клеток.

Важную роль в физико-химических процессах, сопровождающих распад трития, играет перераспределение электронной плотности в среде. При распаде трития возникает бета-частица и положительно заряженный ион гелия-3. Последняя частица чрезвычайно активна, она склонна к акцептированию электрона из окружающей среды (например, ближайшей органической молекулы) с образованием устойчивой оболочки инертного газа. При этом инициируются катион-радикалы различной активности. Таким образом, продукты бета-распада трития способны запускать (или активизировать) цепи переноса заряда/электрона в биохимических процессах. В результате описанных процессов локальное воздействие при распаде трития может быть достаточно эффективным. Поэтому изучение биологических эффектов трития является одной из актуальных задач современной биофизики и радиобиологии и имеет практическое значение для безопасного развития атомной индустрии.

бактерии — одноклеточные организмы, которые встречаются в море как в свободном виде, так и в светящихся органах рыб. В последние десятилетия набирают популярность ферментативные люминесцентные биотесты, то есть ферментативные реакции светящихся бактерий. Недавно сибирскими учеными предложено использование целентерамид-содержащих флуоресцентных белков, которые являются продуктами биолюминесцентных реакций некоторых морских светящихся кишечнополостных — медуз, полипов. В отличие от «зеленых» флуоресцентных белков, которые в настоящее время широко используются в качестве флуоресцентных меток в медицинских и биологических исследованиях, целентерамид-содержащие белки не получили широкого признания, и их потенциал явно недооценен. Спектры флуоресценции этих белков могут варьироваться за счет формирования различных флуоресцентных форм. Соотношение между этими формами определяется эффективностью фотохимического переноса протона, а она, в свою очередь, зависит от воздействия токсичных веществ на белковый комплекс.

Известно, что флуоресцентные белки состоят из ароматического флуорофора и полипептида. Флуорофором целентерамид-содержащих белков, как следует из их названия, является молекула целентерамида, образующая комплекс с полипептидом. Входящая в состав комплекса молекула целентерамида, фотохимически активна; при возбуждении светом она способна к отдаче протона, как показано на рис. 1.

Перенос протона меняет цвет флуоресценции целентерамида: форма целентерамида, содержащая протон, характеризующаяся «фиолетовой» флуоресценцией, депротонированная форма характеризуется «сине-зеленой» флуоресценцией.

Ученые Красноярска показали, что термические, химические и радиационные воздействия изменяют спектры флуоресценции целентерамид-содержащего белка. В качестве примера такого белка они использовали «разряженный обелин» — продукт биолюминесцентной реакции морского кишечнополостного обелина. На рис. 2 представлены спектры флуоресценции этого белка. Из рисунка видно, что воздействие химических агентов или радиации изменяет вклады цветных компонент — увеличивает вклад фиолетовой и уменьшает вклад сине-зеленой флуоресценции. Токсический эффект оценивается именно по изменению вкладов этих компонент.

Возможность использования целентерамид-содержащих белков для оценки химической и радиационной токсичности обоснована в недавнем обзоре красноярских ученых (Talanta, 2017). Преимущества использования этих белков связаны с их фотобиологической активностью: так как перенос протона в возбужденном состоянии — чрезвычайно быстрый (наносекундный) процесс, скорость одного измерения лимитируется только длительностью

## Предложенный красноярскими учеными подход переводит понимание токсических эффектов на уровень элементарных физико-химических процессов

\_\_Флуорофор — фрагмент молекулы, придающий ей флуоресцентные свойства.

\_\_Пептид, полипептид, белок. Аминокислоты способны соединяться связями, которые называются пептидными, при этом образуется полимерная молекула. Если количество аминокислот не превышает 10, то новое соединение называется пептид; если от 10 до 40–50 аминокислот — полипептид, если аминокислот больше — белок.

\_\_Грей — единица поглощенной дозы ионизирующего излучения в Международной системе единиц. Доза равна одному грею, если в результате поглощения ионизирующего излучения вещество получило один джоуль энергии на один килограмм массы.

регистрации спектра флуоресценции. Причем воспроизводимость этих измерений высока; она соответствует воспроизводимости физических экспериментов. Это важно для решения проблемы воспроизводимости биологических измерений, которая всегда возникает при использовании организмов и ферментативных реакций.

Последнее исследование красноярских ученых было связано с изучением воздействия на флуоресцентный белок низкодозовой радиации. Оно выполнено в сотрудничестве с коллегами из Московского государственного университета (кафедра радиохимии), результаты опубликованы в журнале *Analytical & Biochemical Chemistry*. В качестве радиоактивного элемента в этих экспериментах выбран тритий, бета-излучающий изотоп водорода, который принято считать одним из наименее токсичных радиоизотопов.

На рис. 3 показано изменение вкладов фиолетовой и сине-зеленой компонент спектра флуоресценции белка под действием трития. Тритий входил в состав тритиевой воды, которую добавляли в раствор белка. Наблюдения проводили в течение 18 суток. Максимальная доза радиоактивности, накопленная образцом белка, оказалась равной 0,28 Грей, что близко к условной границе малых доз. Из рисунка видно, что воздействие трития приводит к увеличению вклада фиолетовой и уменьшению вклада сине-зеленой компонент по сравнению с контрольными образцами. Видно также, что даже сутки воздействия трития (соответствующего дозе 0,03 Грей) вызывают заметные изменения вкладов цветных компонент, что указывает на высокую чувствительность белка к низкодозовому излучению.

Таким образом, красноярскими учеными предложен принципиально новый подход к изучению токсичности с использованием простейшей биотестовой системы — флуоресцентного белка, его фотобиологических свойств и регистрации флуоресценции «цветных» компонент фотобиологического процесса. Предлагаемый подход переводит понимание токсических эффектов на уровень элементарных физико-химических процессов.

НАДЕЖДА КУДРЯШЕВА,

доктор физико-математических наук, ведущий научный сотрудник Института биофизики Сибирского отделения РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН