

УДК 577.34

ОБРАЗОВАНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА ПРИ СОВМЕСТНОМ ДЕЙСТВИИ НИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ИОНОВ УРАНИЛА И РЯДА ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

Гармаш С.А.

ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук»,
Пуццино, e-mail: daradysha@rambler.ru;
Пуццинский государственный естественно-научный институт, Пуццино

В работе исследовано образование активных форм кислорода (АФК) под действием ионов уранила и таких физических факторов, как тепло, видимый свет и ионизирующая радиация. В качестве источника ионов уранила использовали водный раствор нитрата уранила ($UO_2(NO_3)_2$) в микромолярных концентрациях, которые соответствуют концентрациям, содержащимся в естественных природных источниках. Количественно определено образование таких АФК, как перекись водорода и гидроксильные радикалы при совместном действии ионов уранила и физических факторов. Концентрацию перекиси водорода измеряли методом усиленной хемилюминисценции в системе люминол-параюодфенол-пероксидаза, гидроксильные радикалы измеряли с помощью флуоресцентного зонда кумарин-3-карбоновой кислоты. Показано, что совместное действие ионов уранила и таких физических факторов, как тепло, видимый свет и ионизирующая радиация, приводит к сверхпродукции АФК *in vitro*.

Ключевые слова: ионы уранила, активные формы кислорода, перекись водорода, гидроксильные радикалы, ионизирующая радиация

THE FORMED REACTIV OXYGEN SPECIES UNDER THE COMBINED ACTION OF URANYL IONS AND PHYSICAL FACTORS

Garmash S.A.

Institute of theoretical and experimental biophysics RAS, Pushchino, e-mail: daradysha@rambler.ru;
Pushchino state natural science institute, Pushchino

In this paper we study the formation of reactive oxygen species (ROS) under the action of uranyl ions and physical factors such as heat, visible light and ionizing radiation. As a source of uranyl ions using an aqueous solution of uranyl nitrate ($UO_2(NO_3)_2$) at micromolar concentrations, which correspond to the concentrations contained in natural sources. Formation of hydrogen peroxide as the most long-lived of the ROS, and the hydroxyl radical, which is the most capable of reaction under the combined action of uranyl ions and physical factors was quantitatively estimated. The concentration of hydrogen peroxide was measured by enhanced chemiluminescence in the luminol-peroxidase-parayodfenol, hydroxyl radicals was measured using a fluorescent probe coumarin-3-carboxylic acid. It is shown that the combined effect of uranyl ions, and physical factors such as heat, visible light and ionizing radiation leads to to extra amounts of ROS *in vitro*.

Keywords: uranyl ions, reactive oxygen species, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, ionizing radiation

Концентрация урана в природных водах варьируется в широких пределах от 0,01 мкг/л до 12,4 мг/л, максимальные концентрации (около 10 мг/г) наблюдаются в Западной Сибири, Казахстане, и других районах, богатых залежами изотопов урана [4].

В настоящее время обедненный уран (ОУ) широко используется как в мирных целях – в качестве балласта в судах, самолетах; для придания цвета стеклу и керамике, так и во время военных действий. В связи с войной на Балканах и в Персидском заливе, где применялись снаряды из обедненного урана, опубликовано немало работ, связывающих заболевания неясной этиологии с влиянием ионов уранила, которые образуются в результате самовоспламенения урана при поражении цели снарядами, содержащими урановые сердечники [1].

В последнее время в литературе появились работы, свидетельствующие о том, что ионы уранила могут являться причиной повреждения ДНК, мутагенеза, канцерогенеза

[2, 7, 8]. Несмотря на это, молекулярный механизм токсического действия ионов уранила на организм изучен не достаточно. Мы предполагаем, что ионы уранила оказывают негативное влияние на живые организмы за счет своих прооксидантных свойств. Цель данной работы заключалась в исследовании прооксидантных свойств малых концентраций ионов уранила и их способности усиливать действие естественных факторов окружающей среды – тепла, видимого света или ионизирующего излучения.

Материалы и методы исследования

В качестве источника ионов уранила в этом и во всех последующих экспериментах использовался водный раствор соли – уранил нитрата ($UO_2(NO_3)_2$). Для вычленения влияния нитрат ионов на наблюдаемые нами эффекты проведена серия опытов с эквивалентными концентрациями нитрата натрия.

Определение концентрации гидроксильных радикалов
Определение концентрации гидроксильных радикалов ($HO\cdot$) осуществляли с использованием флуоресцентного зонда – кумарин-3-карбоновой кислоты

(ККК) [4]. При гидроксировании ККК образуется устойчивый продукт – 7-ОН-кумарин-3-карбоновая кислота, концентрацию которой измеряли по её флуоресценции при $\lambda_{\text{ex}} = 400$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 450$ нм в кварцевой зеркальной кювете на приборе Cary Eclipse, Австралия.

Определение концентрации перекиси водорода

Концентрацию образующейся перекиси водорода (H_2O_2) определяли высокочувствительным методом усиленной хемиллюминесценции в системе люминол-4-йодофенол-пероксидаза, с регистрацией сигнала жидкостным спинтилляционным счетчиком «Бета 1», работающим в режиме счета одиночных фотонов (без схемы совпадений). Чувствительность данного метода соответствует концентрации $\text{H}_2\text{O}_2 < 1$ нМ. Концентрацию образовавшейся перекиси водорода вычисляли, используя калибровочные графики, для построения которых измеряли интенсивность хемиллюминесценции образцов, содержащих экзогенную перекись водорода известной концентрации. Исходную концентрацию H_2O_2 , используемую для калибровки, определяли спектрофотометрически при длине волны 240 нм с коэффициентом молярного поглощения $43,6$ ($\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) [3].

Воздействие физических факторов

В экспериментах с видимым светом для облучения образцов использовали электролампу

Comtech, с энергетической освещенностью поверхности образцов – $83,3$ Вт/м². Тепловое воздействие осуществляли с помощью ультратермостата «ТЕРМЭКС М01», Россия. В качестве источника ионизирующей радиации служила рентгеновская терапевтическая установка РУТ-15, мощность дозы 1 Гр/мин.

Результаты исследования и их обсуждение

Образование гидроксильных радикалов при совместном действии ионов уранила с теплом или светом

С помощью высокоспецифичного флуоресцентного зонда для гидроксильных радикалов – кумарин-3-карбоновой кислоты, установлено, что при действии тепла (80°C , 2 часа) на растворы, содержащие ионы уранила, наблюдается существенно более интенсивное образование гидроксильных радикалов, по сравнению с контролем, при этом исследуемый процесс имел зависимость от концентрации, близкую к экспоненциальной (табл. 1).

Таблица 1

Влияние ионов уранила на образование HO^{\cdot} *in vitro* под действием тепла (80°C , 2 часа). Измерение проводили с помощью высокоспецифичного флуоресцентного зонда для гидроксильных радикалов – кумарин-3-карбоновой кислоты в 1 мМ фосфатном буфере (ФСБ) pH 7,4. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего значения по четырем независимым экспериментам

Концентрация, мкМ	Гидроксильные радикалы (HO^{\cdot}), нМ	
	уранилнитрат ($\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$)	нитрат натрия ($(\text{NaNO}_3) \times 2$)
Контроль (1 мМ ФСБ)	$8,5 \pm 0,4$	
1	$27,2 \pm 1,4$	$8,6 \pm 0,8$
2	$59,5 \pm 3,6$	$10,4 \pm 1,1$
5	$84,6 \pm 9,5$	$13,7 \pm 1,2$
10	$112,8 \pm 12,1$	$16,1 \pm 2,1$
50	$238,7 \pm 19,7$	$20,0 \pm 2,6$

Известно, что уран является радиоактивным элементом, поэтому необходимо было выяснить вклад радиоактивности в тепловую генерацию гидроксильных радикалов. Как известно, температура не влияет на скорость радиоактивного распада, поэтому было предположено, что как при 20°C , так и при 80°C , ионы уранила будут оказывать одинаковый эффект на генерацию гидроксильных радикалов. Однако в эксперименте при 80°C , количество образовавшихся гидроксильных радикалов более чем в 5 раз (120 нМ) превысило теоретически рассчитанное (23 нМ) при концентрации уранилнитрата 10 мкМ (данные не представлены). Из этого следует, что наблюдаемый эффект связан с химическими свойствами ионов уранила, а не с его радиоактивностью.

В работе также исследовали влияние ионов уранила и видимого света на обра-

зование гидроксильных радикалов. Образование гидроксильных радикалов зависит от концентрации ионов уранила в растворе, зависимость носит линейный характер в диапазоне исследованных концентраций (табл. 2).

Полученные результаты показывают, что в присутствии ионов уранила в водных растворах существенно увеличивается образование гидроксильных радикалов под действием видимого света.

Образование перекиси водорода при совместном действии ионов уранила с видимым светом или ионизирующей радиацией

Известно, что под действием света и ионизирующей радиации происходит образование такой долгоживущей активной формы кислорода, как перекись водорода [3]. Исследовано образование перекиси водо-

рода при совместном действии ионов уранила и видимого света. Количество образовавшейся перекиси водорода исследовали методом усиленной хемилюминисценции в системе люминол-парафенон-пероксидаза. Показано, что концентрация пере-

киси водорода почти линейно увеличивается с увеличением концентрации ионов уранила. Результаты этого эксперимента также иллюстрируют усиление ионами уранила действия видимого света на образование перекиси водорода в воде (табл. 3).

Таблица 2

Влияние ионов уранила и видимого света (83,3 Вт/м², 2 часа) на образование HO[•] *in vitro*.

Измерение проводили с помощью высокоспецифичного флуоресцентного зонда для гидроксильных радикалов – кумарин-3-карбоновой кислоты в 1 мМ фосфатном буфере (ФСБ) pH 7,4. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего значения по четырем независимым экспериментам

Концентрация, мкМ	Гидроксильные радикалы (HO [•]), нМ	
	уранилнитрат (UO ₂ (NO ₃) ₂)	нитрат натрия ((NaNO ₃)×2)
Контроль (1мМ ФСБ)	7,5 ± 0,4	
10	11,5 ± 1,2	8,6 ± 0,2
50	25,0 ± 3,5	11,5 ± 0,5
100	41,8 ± 4,6	16,5 ± 0,6

Таблица 3

Влияние ионов уранила на образование H₂O₂ *in vitro* под действием видимого света (83,3 Вт/м², 2 часа). Измерение проводили методом усиленной хемилюминисценции в системе люминол- 4-йодфенон-пероксидаза. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего значения по четырем независимым экспериментам

Концентрация, мкМ	Перекись водорода (H ₂ O ₂), нМ	
	уранилнитрат (UO ₂ (NO ₃) ₂)	нитрат натрия ((NaNO ₃)×2)
Контроль (H ₂ O _{би})	8,7 ± 1,0	
5	14,8 ± 1,2	9,3 ± 0,1
10	21,7 ± 1,2	9,9 ± 0,2
50	57,7 ± 2,6	13,7 ± 0,4
100	95,6 ± 5,2	19,2 ± 0,6

Исследовано образование перекиси водорода при совместном действии ионов уранила и ионизирующей радиации. Для этого образцы, содержащие ионы

уранила в различных концентрациях от 0,001 до 10 мкМ, предварительно облучали рентгеновским излучением в дозе 1 Гр (табл. 4).

Таблица 4

Зависимость образования H₂O₂ от концентрации ионов уранила в растворе, предварительно облученном рентгеном в дозе 1 Гр. Измерение проводили методом усиленной хемилюминисценции в системе люминол-4-йодфенон-пероксидаза. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего значения по четырем независимым экспериментам

Концентрация, мкМ	Перекись водорода (H ₂ O ₂), нМ	
	уранилнитрат (UO ₂ (NO ₃) ₂)	нитрат натрия ((NaNO ₃)×2)
Контроль (H ₂ O _{би})	93,5 ± 4,1	
0,001	134,7 ± 9,3	163,0 ± 0,8
0,01	260,8 ± 29,2	173,1 ± 11,1
0,1	439,9 ± 32,0	174,4 ± 9,5
1	296,0 ± 24,0	137,9 ± 3,4
5	209,9 ± 11,3	131,5 ± 3,5
10	117,5 ± 3,1	93,4 ± 28,3

Ионы уранила, облученные в дозе 1 Гр, приводили к сверхпродукции перекиси водорода в водных растворах относительно контроля, которым служила вода, облученная в дозе 1 Гр, не содержащая ионов уранила. Количество образующейся при данной схеме эксперимента перекиси водорода зависело от концентрации ионов уранила и зависимость эта имела сложный, отличный от линейного характер. Результаты эксперимента еще раз подтверждают, что в наблюдаемых эффектах химические, окислительные свойства ионов уранила преобладают над радиоактивными, так как в случае преобладания радиоактивных свойств наблюдаемые эффекты зависели бы от концентрации практически линейно.

Заключение

Полученные результаты позволяют сделать заключение, что ионы уранила в микромолярных концентрациях увеличивают количество образующихся АФК, таких как перекись водорода и гидроксильный радикал в водных растворах, при воздействии тепла, света или ионизирующего излучения и проявляют существенные прооксидантные свойства, которые преимущественно связаны с химической структурой ионов уранила, а не с их естественной радиоактивностью.

Работа поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований (10-04-00949-а, 10-04-01265-а).

Список литературы

1. Случаи массовых заболеваний «неясной этиологии»: токсикологические аспекты. Роль малых доз физиологически активных веществ / Н.А. Лошадкин, В.А. Голденков, В.В. Дикий, И.А. Пушкин, А.А. Дружинин, В.Р. Рембовский, Л.В. Дарьина, Т.Х. Хохоев // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева). – 2002. – т. XLVI, № 6. – С. 46–57.
2. Образование 8-оксогуанина и его окисленных продуктов в ДНК *in vitro* под действием температуры 37°C / В.С. Смирнова, С.В. Гудков, А.В. Черников, В.И. Брусков // Биофизика. – 2005. – Т. 50. – С. 243–252.
3. Смирнова В.С., Гудков С.В., Брусков В.И. 8-оксогуанин и продукты его окисления. Образование в ДНК *in vitro* под действием тепла, ионов уранила и гамма-излучения // Saarbrücken. LAMBERT Academic Publishing. – 2011. – С. 152.
4. Черников А.В., Брусков В.И. Генерация гидроксильных радикалов и других редокс-активных соедине-

ний в морской воде под действием тепла // Биофизика. – 2002. – Т. 47(5). – С. 773–781.

5. Depleted Uranium: Sources, Exposure and Health Effects // WHO (World Health Organization). – 2001.

6. Comparative analysis of gene expression in brain, liver, skeletal muscles, and gills of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to environmentally relevant waterborne uranium concentrations / A. Lerebours, P. Gonzalez, C. Adam, V. Camilleri, J.P. Bourdineaud, J. Garnier-Laplace // Environmental Toxicology and Chemistry. – 2009. – №28. – P. 1271–1278.

7. A search for cellular and molecular mechanisms involved in depleted uranium (DU) toxicity / J. Pourahmad, M. Ghashang, H.A. Ettehad, R. Ghalandari // Environmental Toxicology. – 2006. – №21. – P. 349–354.

8. Sandra S. Wise W. Douglas Thompson, AbouEl-Makarim Aboueissa, Michael D. Mason and John Pierce Wise, Sr. Particulate depleted uranium is cytotoxic and clastogenic to human lung cells // Chem. Res. Toxicol. – 2007. – №20(5). – P. 815–820.

References

1. N.A. Loshadkin, V.A. Goldenkov, V.V. Dikij, I.A. Pushkin, A.A. Druzhinin, V.R. Rembovskij, L.V. Dar'ina, T. H. Hohoiev. *Ros. him. zh. (Zh. Ros. him. ob-va im. D.I. Mendeleeva)*, 2002, no. 6, pp. 46–57.
2. Smirnova V.S., Gudkov S.V., Chernikov A.V., Bruskov V.I. *Biofizika*, 2005, no.50, pp. 243–252.
3. Smirnova V.S., Gudkov S.V., Bruskov V.I. Saarbrücken. *LAMBERT Academic Publishing*, 2011, p. 152.
4. Chernikov A.V., Bruskov V.I. *Biofizika*, 2002, no. 47(5), pp. 773–781.
5. Depleted Uranium: Sources, Exposure and Health Effects. *WHO (World Health Organization)*, 2001.
6. Lerebours A., Gonzalez P., Adam C. Bourdineaud, J.-P., Garnier-Laplace J. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2009, no.28, pp. 1271–1278.
7. Pourahmad J., Ghashang M., Ettehad H.A., Ghalandari R. *Environmental Toxicology*, 2006, no. 21, pp. 349–354.
8. Sandra S. Wise, W. Douglas Thompson, AbouEl-Makarim Aboueissa, Michael D. Mason and John Pierce Wise, Sr. *Chem Res Toxicol.*, 2007, no. 20(5), pp. 815–820.

Рецензенты:

Вихлянцев И.М., д.б.н., ведущий научный сотрудник ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук» (ИТЭБ РАН), г. Пушкино;

Бункин Н.Ф., д.ф.-м.н., профессор, ведущий лабораторией светоиндуцированных фазовых переходов Научного центра волновых исследований Института общей физики им. А.М. Прохорова РАН, г. Москва.

Работа поступила в редакцию 03.09.2012.