

ВЛИЯНИЕ РЯДА НЕОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ, СОДЕРЖАЩИХ СЕРУ РАЗНОЙ СТЕПЕНИ ОКИСЛЕНИЯ, НА БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНУЮ БИФЕРМЕНТНУЮ СИСТЕМУ¹

Е.В. Ветрова, Е.В. Прохорова*

Проведено исследование влияния неорганических серосодержащих соединений на биологическую люминесцентную биферментную систему НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза. Установлено, что участие соединений серы в процессах взаимодействия с растворенным в воде кислородом – субстратом реакции светозлучения определяет изменение кинетических параметров биологической люминесценции: коэффициент ингибирования и максимальную активацию биологической люминесценции. Установлены корреляции и показана прямая зависимость между уменьшением концентрации растворенного в воде кислорода и ингибированием интенсивности биологической люминесценции при соединениях серы. Изучены процессы восстановления ФМН в присутствии серосодержащих соединений. Показано, что с ростом концентрации соединений серы эффективность восстановления ФМН в системе увеличивается, что является причиной активации биологической люминесценции. Полученные результаты формируют биофизическую основу люминесцентного экологического мониторинга неорганических серосодержащих соединений.

Люминесцентные бактерии и выделенные из них ферментативные системы представляют собой уникальную экспериментальную систему, в которой энергия физических и химических преобразований приводит к образованию электронно-возбужденного молекулярного комплекса с запасом энергии, необходимым для флуоресценции [1]. Спектр эмиссии большинства люминесцентных систем бактерий характеризуется отдельной широкой полосой в сине-зеленой области от 400 до 600 нм с максимумом 472-505 нм [2]. При этом эффективность излучательной дезактивации флуоресцентных состояний в биологической люминесцентной системе (интенсивность биологической люминесценции) является интегральной характеристикой всех стадий протекающих физико-химических процессов: от начальных стадий химических перестроек до формирования и дезактивации электронно-возбужденных состояний [3].

Светящиеся бактерии и ферментативная реакция исключительно чувствительны к действию веществ разной структуры с различными физико-химическими свойствами [4]. На сегодняшний день изучение механизмов действия на биологическую люминесценцию различных классов химических соединений актуально, поскольку позволяет прогнозировать чувствительность биологической люминесцентной тестовой системы к поллютантам. Для этих целей применяется экспериментальный подход, основанный на использовании рядов соединений с различными физико-химическими характеристиками, который позволяет установить корреляции между изменением кинетических параметров биологической люминесценции и физико-химическими свойствами этих соединений (энергией ЭВС, редокс-потенциалом и др.). Такие корреляции тесно связаны с механизмом бактериальной люминесценции и представляют собой биофизическую основу люминесцентного мониторинга.

Целью данной работы было исследование закономерностей влияния неорганических серосодержащих соединений на биологическую люминесцентную систему НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза – люцифераза.

Серосодержащие соединения широко распространены в окружающей среде и могут быть как природными компонентами, так и токсикантами, оказывая существенное влияние на экологическое состояние природных водных экосистем, так как обладают выраженными редокс-свойствами, то есть активно влияют на процессы переноса электрона [5].

**Влияние серосодержащих соединений
на биологическую люминесценцию биферментной системы**

Исследовано влияние солей натрия Na_2S , Na_2SO_3 , Na_2SO_4 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ и $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$, содержащих в качестве аниона соединения серы разной степени окисления, на кинетику биологической люминесценции биферментной системы НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза – люцифераза. На рис. 1 представлены зависимости изменения максимальной интенсивности биологической люминесценции от концентрации серосодержащих соединений в люминесцентной системе.

Установлено, что в присутствии соединения серы происходит как активация, так и ингибирование люминесценции, эффект определяется концентрацией экзогенного соединения в системе. Эффективность воздействия исследуемых соединений на интенсивность свечения характеризовали коэффициентами ингибирования и активации биологической люминесценции [6], которые рассчитывали из концентрационной зависимости (С) по формулам:

¹ При поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации и Американского фонда гражданских исследований и развития, гранты КУ-002-Х1 (РЕС-002) и У1-В-02-12, программа «Фундаментальные исследования и высшее образование»

* © Е.В. Ветрова, Институт биофизики СО РАН, Красноярск, 2005; e-mail: vetrova@ibp.ru; Е.В. Прохорова, Красноярский государственный университет, 2005; e-mail: prochorova@list.ru.

$$I/I_k = \exp(-K_i \cdot C), \quad (1)$$

$$I/I_k = \exp(-K_a \cdot C), \quad (2)$$

где I – максимальная интенсивность биолюминесценции при концентрации анализируемого вещества C (M), I_k – максимальная интенсивность биолюминесценции контрольного опыта, K_i и K_a – коэффициенты ингибирования и активации биолюминесценции (M^{-1}) соответственно.

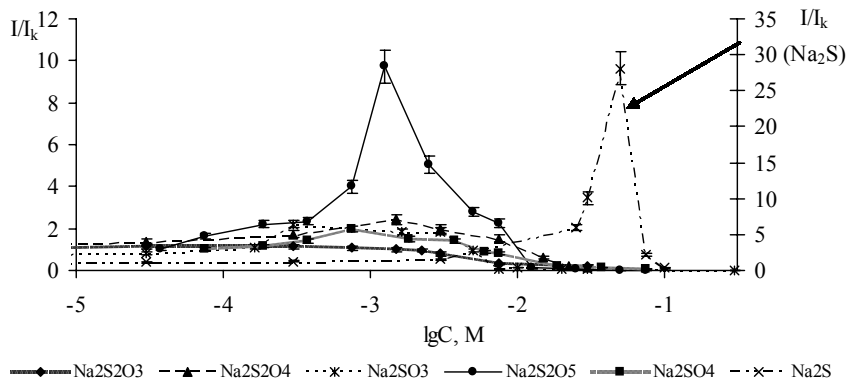


Рис.1. Зависимость интенсивности биолюминесценции (I/I_k) от концентрации серосодержащих соединений (lgC, M)

На рис. 2 представлены зависимости коэффициентов ингибирования (K_i, M^{-1}) и коэффициентов активации (K_a, M^{-1}) биолюминесценции от стандартного одностадийного редокс-потенциала (E^0, B) [7] исследуемых соединений.

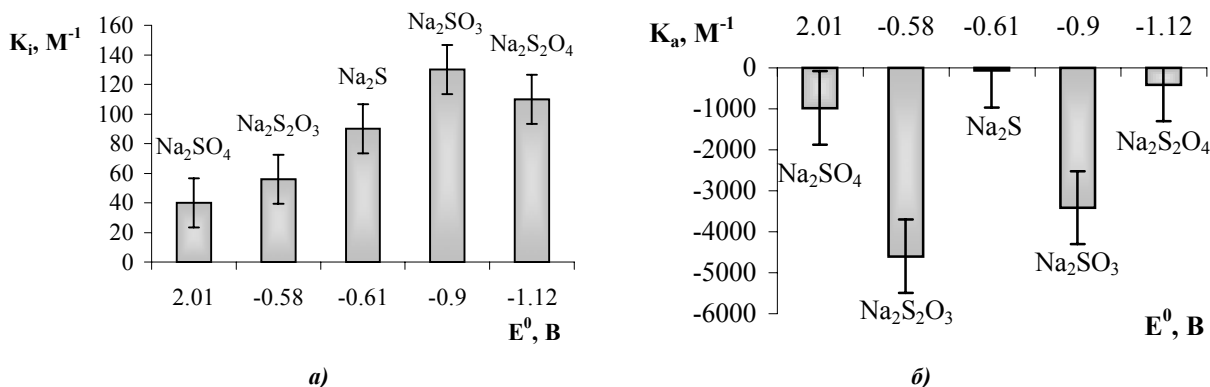


Рис.2. Зависимость коэффициентов ингибирования (K_i, M^{-1}) - а) и коэффициентов активации (K_a, M^{-1}) – б) биолюминесценции от стандартного редокс-потенциала (E^0, B) неорганических соединений серы

Как видно из рисунков, с уменьшением стандартного редокс-потенциала, то есть с увеличением восстановительной способности, происходит увеличение значения коэффициентов ингибирования биолюминесценции, в то время как для коэффициентов активации четкой зависимости от редокс-потенциала не наблюдается.

Необходимо отметить сложность редокс-преобразований, которые обусловлены многостадийностью процессов переноса электронов с участием соединений серы. Например, в случае серы с максимальной степенью окисления -2 (S^{2-}), имеющей шесть электронов, миграция электронов к окислителю может проходить в несколько стадий и по разным траекториям. Причем каждая стадия, каждый перенос электрона будет сопровождаться различным изменением свободной энергии ΔG_i реакции и, соответственно, характеризоваться различным редокс-потенциалом ΔE_i .

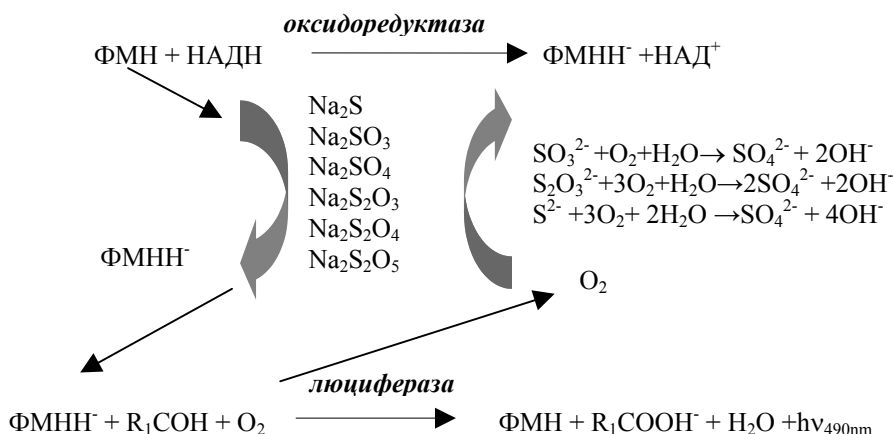
Для обратимой окислительно-восстановительной полуреакции $Ox + ne \leftrightarrow Red$ зависимость редокс-потенциала E от активностей окисленной (Ox) и восстановленной (Red) форм выражается уравнением Нернста [8]:

$$E = E_{Ox/Red}^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{Ox}}{a_{Red}}, \quad (3)$$

где E^0 – стандартный электродный потенциал, n – число электронов, участвующих в реакции, F – постоянная Фарадея, R – универсальная газовая постоянная, T – температура.

Таким образом, зависимость коэффициентов ингибирования от стандартного редокс-потенциала соединений указывает на то, что соединения серы влияют на формирование электронно-возбужденных состояний в бактериальной биолюминесценции на стадиях переноса электронов в биолюминесцентной системе. Именно окислительно-восстановительные характеристики экзогенных соединений серы определяют их влияние на интенсивность биолюминесценции. В связи с этим сделано предположение, что воздействие неорганических соединений серы на биолюминесценцию может быть связано с их влиянием на редокс-процессы в биферментной системе, такие как восстановление ФМН и взаимодействие с растворенным в воде кислородом.

Влияние неорганических серосодержащих соединений на биолюминесцентную систему НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза – люцифераза



Здесь ФМН и ФМНН₂ – окисленная и восстановленная форма флавиномононуклеотида, НАД и НАДН – окисленная и восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотида, RCOH и RCOOH – длинноцепочечный алифатический альдегид и соответствующая жирная кислота.

Влияние неорганических соединений серы на содержание растворенного в воде кислорода

С использованием потенциометрического метода анализа растворов исследовано содержание растворенного молекулярного кислорода в буферной системе при разных концентрациях неорганических соединений серы. Результаты представлены на рис. 3.

В результате экспериментов показано, что тиосульфат натрия $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ не влияет на концентрацию кислорода в системе, в то время как в присутствии других соединений серы с ростом их концентрации уменьшается растворенный в воде кислород. Это происходит в результате протекания реакций окисления соединений кислородом. Эффективность этих процессов определяется восстановительными свойствами исследуемых соединений.

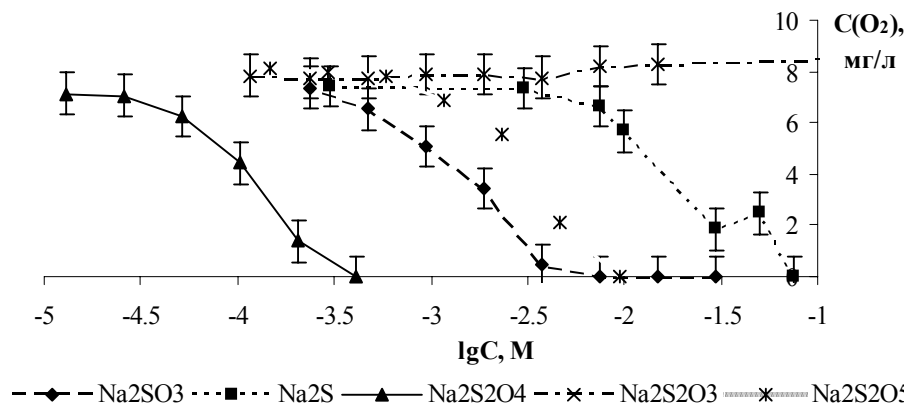


Рис.3. Изменение концентрации растворенного в воде кислорода $C(\text{O}_2)$ в присутствии неорганических серосодержащих соединений различных концентраций $\lg C$

Для характеристики влияния ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, Na_2SO_3 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, Na_2S) неорганических соединений серы на содержание растворенного в воде кислорода предложена величина C_{50} – концентрация соединения, при которой наблюдается уменьшение содержания растворенного кислорода в системе на 50 %. На рис. 4 представлена зависимость параметра C_{50} от редокс-потенциала исследуемых соединений (E^0 , В). Как видно из рис. 4, с уменьшением E^0 (увеличением восстановительной способности соединения) происходит уменьшение величины C_{50} . Например, дитионит натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) имеет минимальные значения E^0 и C_{50} (–1.12 В и 0.12 мМ соответственно), то есть это соединение более эффективно по сравнению с другими взаимодействует с растворенным в воде кислородом. Данная зависимость описана уравнением (коэффициент корреляции 0.85):

$$y=8842.2 \cdot \exp(9.88 \cdot x) \quad (4)$$

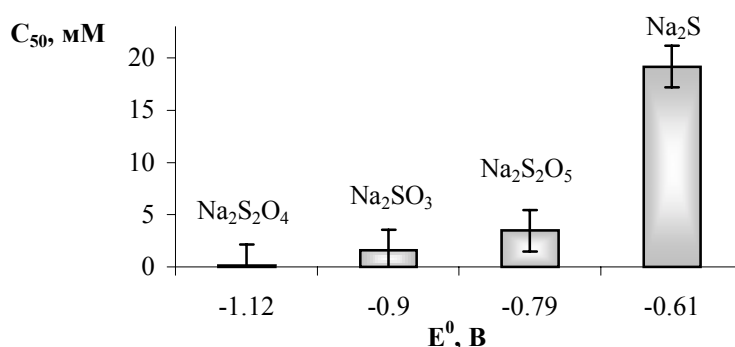


Рис.4. Концентрация серосодержащего соединения, при которой наблюдается уменьшение содержания растворенного кислорода в системе на 50 % (C_{50}) и соответствующие стандартные редокс-потенциалы (E^0 , В) соединений серы

Таким образом, содержание растворенного в воде кислорода определяется концентрацией серосодержащего соединения и его стандартным редокс потенциалом.

Для соединений $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, Na_2SO_3 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, Na_2S , оказывающих влияние на содержание растворенного в воде кислорода, коэффициент корреляции между величинами C_{50} и максимальной активацией биолюминесценции $(I/I_k)_{\max}$ составляет 0.98. Высокое значение коэффициента корреляции между этими величинами свидетельствует, что максимальная активация биолюминесценции определяется (лимитируется) эффективностью редокс-процессов взаимодействия серосодержащих соединений с растворенным в воде кислородом – субстратом реакции светоизлучения. Это подтверждают и результаты расчетов коэффициентов корреляции между зависимостями ингибирования интенсивности биолюминесценции и содержания растворенного в воде кислорода в присутствии соединений серы (табл. 1).

Таблица 1

Коэффициенты корреляции между участком ингибирования биолюминесценции и соответствующей зависимостью изменения содержания растворенного кислорода

№ п/п	Соединение	Коэффициент корреляции
1	Na_2SO_4	0.96
2	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$	0.94
3	Na_2SO_3	0.77
4	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$	0.94
5	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	нет эффекта
6	Na_2S	0.97

Достоверные значения коэффициентов корреляции указывают на прямую связь процессов уменьшения содержания растворенного кислорода в биферментной системе и ингибирования биолюминесценции при влиянии соединений серы.

Таким образом, на основе установленных корреляций показана прямая зависимость между максимальной активацией, ингибированием интенсивности биолюминесценции и уменьшением концентрации растворенного в воде кислорода в присутствии соединений серы. Эффект определяется концентрацией и стандартным редокс-потенциалом серосодержащего соединения.

Влияние серосодержащих соединений на процесс восстановления ФМН

Несмотря на уменьшение содержания кислорода в системе при малых концентрациях неорганических соединений серы наблюдается активация биолюминесценции (рис. 1).

Активация биолюминесценции в присутствии экзогенного соединения серы, вероятно, связана с их влиянием на процессы переноса электрона в реакциях восстановления ФМН.

В работе исследованы спектры окисленного ФМН и ФМН в присутствии соединения серы. На рис. 5 представлены спектры поглощения ФМН при различных концентрациях сульфита натрия (Na_2SO_3). Аналогичные изменения спектров зафиксированы и для других исследованных соединений.

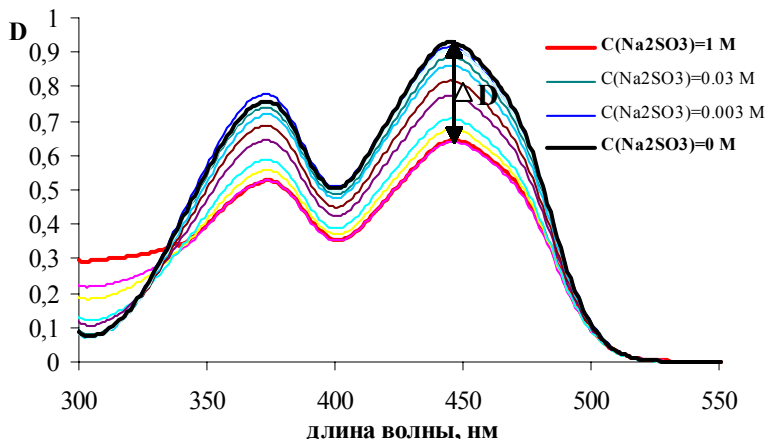


Рис.5. Спектры поглощения ФМН при различных концентрациях сульфита натрия (Na_2SO_3)

Из рис. 5 видно, что с ростом концентрации серосодержащего соединения происходит уменьшение интенсивности полос поглощения спектра ФМН в области 373 и 445 нм. Такие изменения спектра поглощения ФМН [9] свидетельствуют о процессе его восстановления в присутствии данных соединений. Эффективность процессов восстановления ФМН в присутствии соединений серы характеризовали изменением оптической плотности ΔD спектра ФМН на длине волны 445 нм. В соответствие с законом Бугера-Ламберта-Бера

$$\Delta D_{445} = \varepsilon_{445} \cdot l \cdot \Delta C, \tag{5}$$

где ε – коэффициент молярной экстинкции, l – длина пути, ΔC – изменение концентрации восстановленного ФМН в присутствии неорганического соединения серы, ΔD_{445} – изменение оптической плотности образца на длине волны 445 нм в присутствии исследуемых соединений, ε_{445} – молярный коэффициент экстинкции ФМН на длине волны 445 нм, равный $\sim 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, l – оптический путь образца ($l = 1 \text{ cm}$).

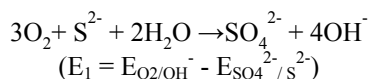
Таким образом, с ростом концентрации соединения серы в биферментной системе увеличивается концентрация восстановленного ФМН – субстрата реакции светоизлучения, что может быть причиной активации биолюминесценции.

Сравнение различных механизмов влияния неорганических серосодержащих соединений на биолюминесценцию биферментной системы

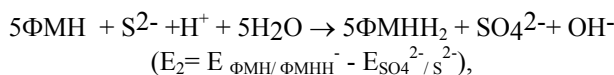
На рис. 6 для примера представлены характерные зависимости интенсивности биолюминесценции I/I_k , содержания растворенного в воде кислорода $C(\text{O}_2)$, а также изменения оптической плотности ΔD_{445} , характеризующие эффективность восстановления ФМН, от концентрации $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ в системе.

Из рисунка видно, что процессы уменьшения содержания растворенного в воде кислорода и увеличения эффективности восстановления ФМН в системе протекают одновременно и являются конкурирующими.

Необходимо отметить, что потенциал реакции окисления E_1 серосодержащего соединения молекулярным кислородом



выше, чем соответствующий потенциал реакции окисления E_2 за счет ФМН



где $E_{\text{O}_2/\text{OH}^-} = 0,82 \text{ В}$, $E_{\text{ФМН}/\text{ФМНН}_2} = 0,206 \text{ В}$, $E_{\text{SO}_4^{2-}/\text{S}^{2-}}$, – окислительно-восстановительные потенциалы соответствующих полуреакций.

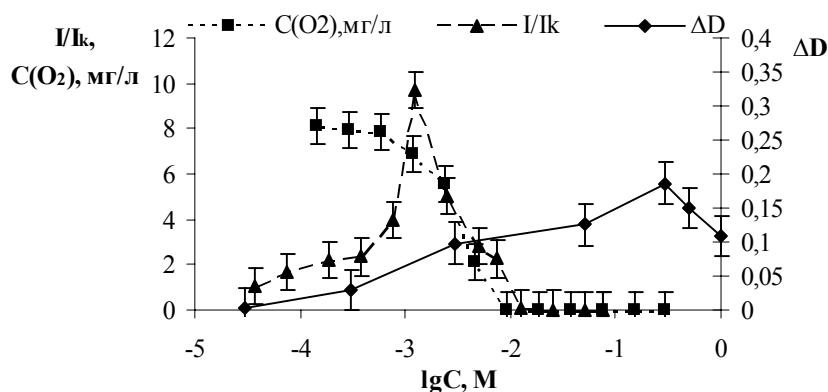


Рис.6. Зависимость интенсивности биолуминесценции I/I_0 , концентрации растворенного в воде кислорода $C(O_2)$, изменения оптической плотности ΔD ($\lambda=445$ нм) от концентрации $Na_2S_2O_5$

Поэтому реакции с участием кислорода, определяющие ингибирование биолуминесценции в присутствии серосодержащего соединения, являются доминирующими по сравнению с процессами восстановления ФМН и определяют эффективность формирования электронно-возбужденного состояния в биолуминесцентной системе. Соотношение эффективности указанных процессов определяет интенсивность биолуминесценции биферментной системы в присутствии неорганических соединений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kurfürst M., Hastings J.W. Identification of the luciferase-bound flavin-4A-hydroxide as the primary emitter in the bacterial bioluminescence reaction // *Flavin and Flavoproteins*, Walter de Gruyter&Co., Berlin-New York, 1984 – P.657-667.
2. Гительзон И.И. Светящиеся бактерии / И.И. Гительзон, Э.К. Родичева, С.Е. Медведева и др. – Новосибирск: Наука, 1984. – 280 с.
3. Кудряшева Н.С. Электронно-возбужденные состояния при биолуминесценции / Н.С. Кудряшева, П.И. Белобров, В.А. Кратасюк и др. // Докл. АН СССР-1991. – Т. 321. – 4. – С. 837-841.
4. Гительзон И.И. Светящиеся бактерии / И.И. Гительзон, Э.К. Родичева, С.Е. Медведева и др. – Новосибирск: Наука, 1984. – 280 с.
5. I.Suzuki Oxidation of inorganic sulfur compounds: chemical and enzymatic reactions // *Can. J. Microbiol.* – 1999. – Vol.45 – P.97-105.
6. Kudrysheva N.S, Kratasyuk V.A, and Belobrov P.I Bioluminescent analysis. The action of toxicants: Physical-chemical regularities of the toxicants effects // *Anal. Lett.* - 1994. – Vol. 27. – P. 2931-2938.
7. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии / Ю.Ю. Лурье. – М.: Химия, 1989. – 448с.
8. Краснов К.С. Физическая химия: в 2-х т. / К.С. Краснов, Н.К. Воробьев, И.Н. Годнев. - М.: Высшая школа, 1995.
9. Heelis P.F. The photophysical and photochemical properties of flavins (isoalloxazines) // *Chem. Soc. Rev.* – 1982. – 11. – P.15-39.

THE INFLUENCE OF INORGANIC SULFUR COMPOUNDS VARYING IN OXIDATION DEGREE ON A BIOLUMINESCENT COUPLED SYSTEM

E.V. Vetrova, E.V. Prohorova

The influence of the sulfur compounds varying in oxidation degree on a bioluminescent coupled system NAD(P)H:FMN-oxidoreductase-luciferase were investigated. The dependences in changes of kinetic parameters of a bioluminescence with the redox characteristics of the model solutions were found. Mechanisms of sulfur-containing compound influence on redox process in the bioluminescent system are discussed. The changes in concentration of oxygen dissolved in aquatic medium of the bioluminescent system in the presence of sulfur-containing reducing compound were studied. A dependence of inhibition coefficients of bioluminescence on the oxygen consumption by reducing compounds was established. One of the modes of bioluminescence activation is the increase of FMNH formation in the bioluminescent system. The increases of the rate of FMNH reduction in the presence of the sulfur compounds were studied. Summarizing, possible mechanisms of the effect of sulfur-containing compound on the bioluminescence of the coupled enzyme system were compared. It was established physicochemical grounds for bioluminescent testing of the sulfur compounds.