

ТОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ТИОФОСФАТА НАТРИЯ И ЕГО КОМПЛЕКСА С ЖЕЛЕЗОМ(II) ПРИ ОЦЕНКЕ КАЧЕСТВА ВОДЫ С ПОМОЩЬЮ МОДЕЛЬНОЙ ТЕСТ-РЕАКЦИИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛЕЦИТИНА И БАКТЕРИАЛЬНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ «ЭКОЛЮМ»

***В. О. Швыдкий^{1*}, А. Ю. Повх¹, Л. Н. Шишкина¹, Ю. И. Скурлатов²,
Е. В. Штамм²***

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия,
*e-mail: slavuta58@gmail.com

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук, Москва, Россия

Поступила в редакцию 20.04.2019 г.

Аннотация – Использованы три модельные системы для оценки свойств компонентов водной среды, способных обуславливать ее токсичность. Методом УФ-спектроскопии показано образование комплекса тиофосфата натрия с ионами двухвалентного железа. Экспериментально показано влияние тиофосфата натрия, ионов Fe^{2+} и их комплекса на интенсивность спонтанного окисления лецитина в водной среде. Обнаружено, что комплекс тиофосфата натрия с ионами Fe^{2+} вызывает существенный рост интенсивности биолюминесценции бактериального препарата «Эколюм». Следовательно, наличие в водной среде ионов железа (II), серо- и фосфорсодержащих органических соединений приводит к изменению баланса окислительно-восстановительных процессов, играющих важную роль в формировании токсических свойств водной среды.

Ключевые слова: ионы железа(II), тиофосфат натрия, окисление лецитина, стимуляция биолюминесценции, модель оценки качества воды.

TOXIC PROPERTIES OF SODIUM THIOPHOSPHATE AND ITS COMPLEX WITH IRON(II) WHEN ESTIMATING WATER QUALITY BY MEANS OF MODEL TEST REACTION OF LECITHIN PEROXIDAL OXIDATION AND BACTERIAL TEST SYSTEM ECOLUM

***V. O. Shvydkiy^{1*}, A. Yu. Povkh¹, L. N. Shishkina¹, Yu. I. Skurlatov², and
E. V. Shtamm²***

¹Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia,
*e-mail: slavuta58@gmail.com

²Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Received April 20, 2019

Abstract – Three model systems have been used for evaluating properties of aquatic environment ingredients which are capable to cause its toxicity. Formation of complex between sodium thiophosphate and Fe^{2+} ions has been confirmed by means of UV spectroscopy. An effect of sodium thiophosphate, Fe^{2+} ions and their complex on the intensity of lecithin

spontaneous oxidation in aqueous medium has been shown in experimental conditions. The complex of sodium thiophosphate with Fe^{2+} ions has been found to cause a significant increase in bioluminescence intensity of "Ecolum" bacterial test system. Thus, the presence of iron(II) ions, sulfur- and phosphorus-containing organic compounds in the aqueous medium leads to a change in total redox balance which plays an important role in forming toxic properties of aquatic environment.

Keywords: Fe^{2+} ions, sodium thiophosphate, lecithin oxidation, bioluminescence stimulation, water quality evaluation model.

ВВЕДЕНИЕ

Тяжелые металлы и другие загрязнители представляют опасность для нормального функционирования биологических объектов с разным уровнем организации, что обусловлено их способностью принимать участие в регуляции клеточного метаболизма при поступлении в организм [1, 2].

В настоящее время общепризнано, что важную роль в регуляции метаболизма в системах разной степени сложности играют окислительные процессы, как в норме, так и при действии повреждающих факторов [3]. Показано, что токсичность природной водной среды обусловлена существенными нарушениями внутриводоемного баланса окислительно-восстановительных процессов при повышении в воде концентрации веществ восстановительной природы [4, 5]. Необходимо обратить внимание на следующее обстоятельство: даже удаление значительных концентраций опасных загрязнителей не гарантирует детоксикацию водной среды в связи с непредсказуемостью последствий совместного действия факторов разной природы на биологические объекты, особенно в области малых доз и интенсивностей [6]. Это обуславливает необходимость разработки информативных тестов на основе экспрессных и эффективных модельных систем для оценки токсичности водной среды и последствий воздействия неблагоприятных экологических факторов на организм. Как показатель токсического воздействия компонентов водной среды на состояние клеточных мембран часто используется интенсивность биолуминесценции бактериального препарата «Эколюм» [7].

Целью работы было изучить взаимодействие компонентов водной среды разной природы, их влияние на спонтанное окисление лецитина и интенсивность биолуминесценции бактериального препарата «Эколюм».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объектов исследования были использованы растворы тиофосфата натрия $\text{Na}_3\text{PO}_3\text{S}$ с чистотой 95% фирмы Sigma (США). Для приготовления растворов $\text{Fe}(\text{II})$ использовали свежеперекристаллизованную соль Мора с чистотой не менее 99,7% (ООО ЗХР «Донецк-реактив», Украина). Исходные растворы тиофосфата натрия готовили в анаэробных условиях в фосфатном буфере (рН 7,1), используя трижды дистиллированную воду. Свежеприготовленные исходные растворы реагентов хранили в атмосфере аргона (ос.ч.) в склянках, снабженных резиновой мембраной. Отбор исходных растворов для приготовления реакционных смесей осуществляли с помощью

шприцев. В качестве источника фосфолипидов (ФЛ) использовали 10%-ный раствор соевого лецитина (Харьков, Украина) в этаноле.

Лецитин является смесью природных липидов, доля ФЛ в составе которых превышает 50%. После предварительной отгонки водного этанола готовили растворы лецитина в хлороформе или дистиллированной воде. Качественный и количественный состав ФЛ лецитина определяли методом тонкослойной хроматографии [8], используя хлороформный раствор лецитина, стеклянные пластины 90×120 мм и силикагель типа G (Sigma, США). В качестве подвижной фазы использовали смесь хлороформ : метанол : ледяная уксусная кислота : дистиллированная вода в соотношении 12,5 : 7,5 : 2 : 1 (v/v). Проявление пластин проводили в парах йода. Количественный анализ фракций ФЛ проводили на спектрофотометре ПЭ 5400-ВИ («ЭКРОС», Россия) при длине волны 815 нм по образованию фосфорно-молибденового комплекса в присутствии аскорбиновой кислоты. Подробности методики изложены в работе [9]. Спонтанное окисление водных растворов лецитина проводили при температуре 20°C . Содержание продуктов окисления, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активные продукты, ТБК-АП), определяли методом [10] при длине волны 532 нм на спектрофотометре ПЭ-5400-ВИ («ЭКРОС», Россия). УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV-1700 PharmaSpec (Shimadzu, Япония).

Структурная формула фосфатидилхолина, основного компонента фосфолипидов лецитина, и тиофосфата натрия представлены в таблице 1.

Таблица 1. Структурные формулы используемых реагентов

Фосфатидилхолин	Тиофосфат натрия

Для определения интегральной токсичности водной среды использовали лиофилизированные светящиеся бактерии в виде препарата «Эколюм», интенсивность биолюминесценции которого регистрировали биолюминометром марки 8801 (СКТБ «Наука», Россия). Биотестирование проводили в 1,5%-ном растворе NaCl в дистиллированной воде (pH 7,1). Количественную оценку параметра тест-реакции выражали в виде безразмерной величины, равной отношению $100(I_0 - I)/I_0$, где I_0 и I – интенсивность биолюминесценции контрольной и опытной пробы, соответственно, спустя 30 мин после начала экспозиции исследуемого раствора с тест-объектом. Экспериментальные данные обрабатывали стандартными методами вариационной статистики, используя Microsoft Office Excel. Результаты представлены в виде среднеарифметических величин с указанием их средних квадратичных ошибок ($M \pm m$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В природных водах наряду с ионами металлов переменной валентности присутствуют серосодержащие соединения, одним из источников которых являются донные отложения. Среди органических соединений особое место занимают фосфорсодержащие вещества как природного (фосфолипиды – одни из основных структурных компонентов биологических мембран), так и техногенного происхождения (например, пестициды и гербициды, попадающие в водоемы с поверхностными дождевыми стоками и подземными водами). Как следует из рис. 1, спектр УФ-поглощения тиофосфата натрия в присутствии ионов двухвалентного железа в эквимольных концентрациях достоверно отличается от суммы спектров компонентов, что свидетельствует об образовании комплекса состава 1:1 между ионами Fe(II) и тиофосфатом натрия.

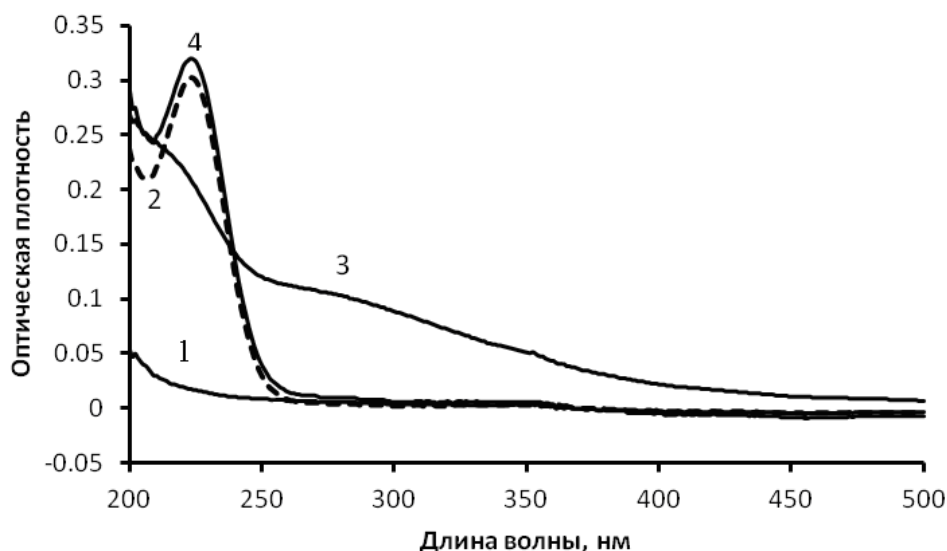


Рис. 1. УФ-спектры эквимольных водных растворов в концентрациях $3,87 \cdot 10^{-5}$ моль/л: 1 - Fe²⁺, 2 - тиофосфат натрия, 3 – после смешения реагентов; 4 - арифметическая сумма УФ-спектров 1 и 2.

Присутствие в реакционной смеси лецитина вызывает существенные изменения характера УФ-спектров ее компонентов, что свидетельствует об образовании комплексов лецитина с каждым из компонентов среды. На рисунке 2 приведены УФ-спектры лецитина и его смесей с комплексом, образованным ионами Fe(II) и тиофосфатом натрия. Аналогичные результаты получены и для других вариантов экспериментов.

Окисление индивидуальных органических соединений представляет собой сложный многостадийный процесс, подробно изученный сотрудниками школы академика Н.М. Эмануэля и характеризующийся большим количеством промежуточных стадий. Предложенная ими кинетическая схема процесса окисления [11] широко используется для описания процесса перекисного окисления липидов в биологических системах.

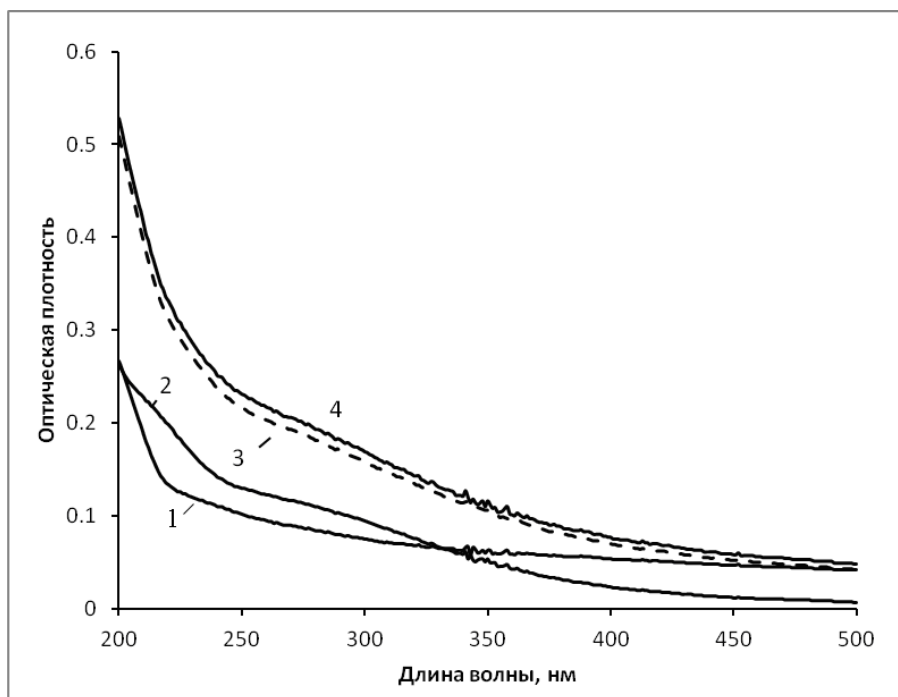


Рис. 2. УФ-спектры: 1 - лецитин (1), 2 - комплекс [Fe(II) + тиофосфат натрия] (2), 3 - смесь лецитина с комплексом [Fe(II) + тиофосфат натрия]; 4 - арифметическая сумма спектров 1, 2. Конечная концентрация всех компонентов $3,87 \cdot 10^{-5}$ моль/л.

Однотипность функционирования системы регуляции перекисного окисления липидов на разных уровнях организации биообъектов [12] позволяет предложить использование в качестве модельной системы спонтанное низкотемпературное окисление лецитина в водной фазе для выявления способности компонентов среды участвовать в процессах окисления. Липидная компонента любых природных объектов чрезвычайно лабильна, что обуславливает значительную вариабельность состава ФЛ коммерческих препаратов [13].

В следующей серии экспериментов использованная партия лецитина содержала долю ФЛ в составе общих липидов $58,9 \pm 4,1$, а относительное содержание основной фракции ФЛ большинства клеточных мембран фосфатидилхолина составляет $83,6 \pm 0,6\%$. Среди минорных фракций ФЛ преобладал фосфатидилэтанолламин ($6,30 \pm 0,55\%$). Было обнаружено, что сразу после добавления тиофосфата натрия количество ТБК-активных продуктов в водном растворе лецитина уменьшается практически на 50%, достоверно не отличается от контрольного уровня в присутствии ионов Fe(II) и возрастает в 1,4 раза в присутствии их комплекса с тиофосфатом натрия (рис. 3). При этом рост интенсивности окисления смеси лецитина с комплексом [Fe(II) + тиофосфат натрия] сопровождался уменьшением полосы поглощения в области длины волны 240–250 нм, характерной для полосы поглощения комплекса [Fe(II) + тиофосфат натрия] в анаэробных условиях [14].

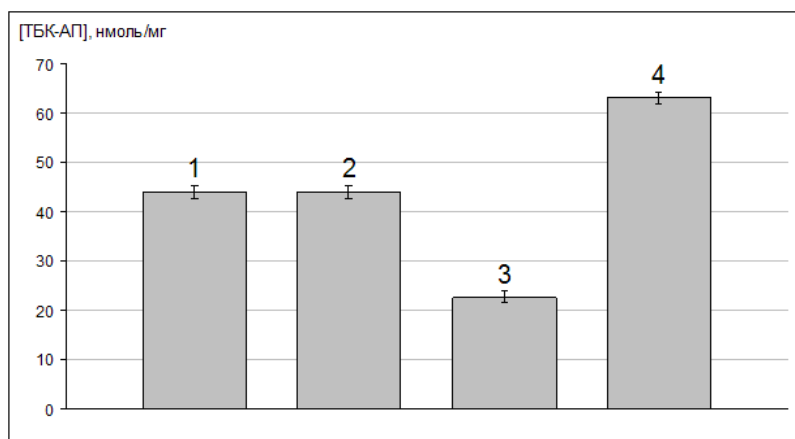


Рис. 3. Влияние ионов Fe(II) (2), тиофосфата натрия (3) и комплекса [Fe(II) + тиофосфат натрия] (4) на содержание ТБК-активных продуктов в водном растворе лецитина (1); концентрация всех компонентов $4,3 \cdot 10^{-5}$ моль/л, температура окисления 20°C .

Столь существенные изменения в качественном составе водной среды сопровождаются изменениями в интенсивности биолюминесценции бактериального препарата «Эколюм» в присутствии изученных компонентов среды. Масштаб эффекта может зависеть не только от концентрации компонентов (рис. 4), но и от интенсивности окислительных процессов в среде, поскольку в литературе имеются данные о том, что интенсивность биолюминесценции бактериальной люциферазы обусловлена продуктами Fe^{2+} -индуцированного перекисного окисления липидов [15]. Как видно из данных, представленных на рисунках 3 и 4, в отсутствие инициатора ионы Fe(II) практически не оказывают влияния на интенсивность ни спонтанного окисления лецитина в первые минуты процесса, ни биолюминесцентной реакции. При этом рост содержания продуктов окисления лецитина в реакционной среде в присутствии комплекса ионов Fe(II) с тиофосфатом натрия сопровождается интенсификацией биолюминесценции бактерий при увеличении его концентрации.

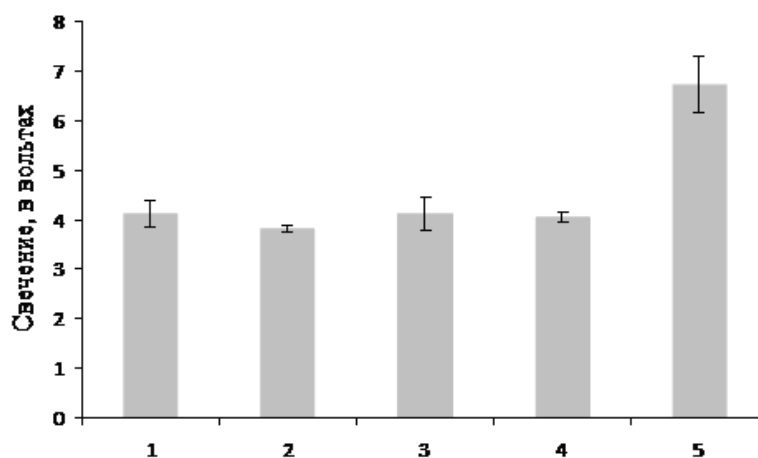


Рис. 4. Интенсивность биолюминесценции суспензии бактерий «Эколюм» в контроле (1), в присутствии ионов Fe(II) в концентрациях 10^{-6} моль/л (2) и $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л (3), комплекса [Fe(II) + тиофосфат натрия] в концентрациях 10^{-6} моль/л (4) и $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л (5). Время экспозиции 30 мин.

Влияние лецитина на интенсивность биолюминесценции определяется также степенью его окисленности. В экспериментах использовали партию лецитина, содержащую $64,1 \pm 2,7\%$ ФЛ в составе общих липидов, $80,9 \pm 0,8\%$ фосфатидилхолина в составе ФЛ. Среди минорных фракций ФЛ преобладали лизоформы ФЛ ($3,66 \pm 0,04\%$), сфингомиелин ($4,47 \pm 0,36\%$) и фосфатидилэтаноламин ($3,90 \pm 0,36\%$). После 30 мин экспозиции препарата «Эколюм» в присутствии лецитина при концентрации ТБК-активных продуктов окисления $2,7$ нмоль/мг лецитина интенсивность свечения возрастала на 32% , в то время как уменьшение продуктов окисления до $1,45$ нмоль/мг липидов не оказывало достоверного влияния на интенсивность свечения.

ВЫВОДЫ

1. Методом УФ спектроскопии обнаружено образование комплекса [Fe(II) + тиофосфат натрия] состава 1 : 1.
2. Показано, что тиофосфат натрия и его комплекс с ионами железа(II) участвуют в регуляции спонтанного низкотемпературного автоокисления лецитина в водной среде.
3. Экспериментально установлено увеличение интенсивности биолюминесценции суспензии бактерий «Эколюм» при концентрации комплекса Fe(II)-ТФ $5 \cdot 10^{-6}$ М.
4. Использование физико-химических модельных систем для оценки качества водной среды позволяет достаточно быстро следить за происходящими в ней процессами и минимизировать негативные последствия для биообъектов, основываясь на понимании механизма появления токсичности среды.

Работа выполнена в рамках гос. задания 46.10. Физико-химические основы рационального природопользования и охраны окружающей среды. № гос. регистрации 0120125330.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was performed in accordance with Government Task No. 46.10. Physical and chemical bases of environmental management and environmental protection. Government Registration No. 0120125330.

Список литературы:

1. Agrawal A. // Advances in Life Sciences. 2012. V. 2. No. 2. P. 29. DOI: 10.5923/j.als.20120202.06.
2. Heavy Metals and Other Pollutants in the Environment: Biological Aspects. Toronto: Apple Academic Press. Inc., 2017.
3. Chemical and Biochemical Kinetics. New Horizons. V. 2. Biological Kinetics. Leden, Boston: VSP, 2005.
4. Штамм Е.В., Скурлатов Ю.И., Козлова Н.Б., Зайцева Н.Д., Александрова Е.В. // Водные ресурсы. 2011. Т. 38. № 2. С. 232.
5. Швыдкий В.О., Штамм Е.В., Скурлатов Ю.И. и др. // Химическая физика. 2017. Т. 36. № 8. С. 23. DOI: 10.7868/S0207401X15060072.

6. *Petin V.G., Morozov I.I.* Синергетика факторов окружающей среды. М.: ГЕОС, 2015.
7. ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.11-04; Т 16.1:2.3:3.8-04. Токсикологические методы контроля. Методика определения интегральной токсичности поверхностных, в том числе морских, грунтовых, питьевых, сточных вод, водных экстрактов почв, отходов, осадков сточных вод по изменению интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-системой ЭКОЛЮМ. М., 2004 (издание 2010).
8. Биологические мембраны. Методы. М.: Мир, 1990.
9. *Shishkina L.N., Kushnireva E.V., Smotryaeva M.A.* // *Oxidation Commun.* 2001. V. 24. No. 2. P. 276. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02540959>.
10. *Asakawa T., Matsushita S.* // *Lipids.* 1980. V. 15. No. 3. P. 137. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02540959>.
11. *Emanuel N.M., Zaikov G.E., Maizus Z.K.* Oxidation of organic compounds. Effect of medium. Oxford: Pergamon Press, 1984. 650 p.
12. *Shishkina L.N., Klimovich M.A., Kozlov M.V.* Functioning similarity of the physicochemical regulatory system of the lipid peroxidation in the membrane and organ levels. In: Orlicki R., Cienciala C., Krylova L., Pielichowski J., Zaikov G.E. eds.. *Pharmaceutical and Medical Biotechnology. New Perspectives.* New York: Nova Science Publishers, Inc. 2013. P. 151.
13. *Hielscher R., Hellwig P.* // *Spectroscopy: Int. J.* 2012. V. 27. No. 5-6. P. 525. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/279650>.
14. *Шушкина Л.Н., Козлов М.В., Повх А.Ю., Швыдкий В.О.* // Сборник статей по материалам международной научно-практической конференции «Экологическая, промышленная и энергетическая безопасность – 2018». Севастополь, 2018. С. 1302.
15. *Берия Л.В., Исмаилов А.Д., Данилов В.С.* // *Биохимия.* 1991. Т. 56. № 3. С. 477.

References:

1. *Agrawal A.* // *Advances in Life Sciences.* 2012. V. 2 (2). P. 29. DOI: [10.5923/j.als.20120202.06](https://doi.org/10.5923/j.als.20120202.06).
2. *Heavy Metals and Other Pollutants in the Environment: Biological Aspects.* Toronto: Apple Academic Press. Inc., 2017.
3. *Chemical and Biochemical Kinetics. New Horizons.* V. 2. Biological Kinetics. Leden, Boston: VSP, 2005.
4. *Shtamm E.V., Skurlatov Yu.I., Kozlova N.B. et al.* // *Vodnye resursy [Water resources].* 2011. V. 38. No. 2. P. 232 [in Russian].
5. *Shvydkii V.O., Shtamm E.V., Skurlatov Yu.I. et al.* // *Russian J. Phys. Chemistry B.* 2017. V. 11. No. 4. P. 643. DOI: [10.1134/S1990793117040248](https://doi.org/10.1134/S1990793117040248).
6. *Petin V.G., Morozov I.I.* Sinergetics of the environmental factors. М.: ГЕОС, 2015 [in Russian].
7. Toxicological methods of analysis. Method for determining integral toxicity of surface water, including seawater, groundwater, drinking water, wastewater, water extracts of soil, waste, sewage sludge by changing intensity of bacterial bioluminescence by ECOLUM test system. ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.11-04; Т 16.1:2.3:3.8-04. М., 2004 (2010 edition) [in Russian].
8. *Biological Membranes: A Practical Approach.* Eds. J.B.C. Findlay and W.H. Evans. М.: Mir, 1990 [in Russian].
9. *Shishkina L.N., Kushnireva E.V., Smotryaeva M.A.* // *Oxidation Commun.* 2001. V. 24. No. 2. P. 276. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02540959>.
10. *Asakawa T., Matsushita S.* // *Lipids.* 1980. V. 15. No. 3. P. 137. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02540959>.
11. *Emanuel N.M., Zaikov G.E., Maizus Z.K.* Oxidation of organic compounds. Effect of medium. Oxford: Pergamon Press, 1984. 650 p.
12. *Shishkina L.N., Klimovich M.A., Kozlov M.V.* Functioning similarity of the physicochemical regulatory system of the lipid peroxidation in the membrane and organ levels. In: Orlicki R.,

- Cienciala C., Krylova L., Pielichowski J., Zaikov G.E. eds.. *Pharmaceutical and Medical Biotechnology. New Perspectives*. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2013. P. 151.
13. *Hielscher R., Hellwig P.* // *Spectroscopy: Int. J.* 2012. V. 27. No. 5-6. P. 525. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/279650>.
 14. *Shishkina L.N., Kozlov M.V., Povkh A.Yu., Shvydkii V.O.* // *Proc. Int. Conf. Ecological, Industrial and Energy Security-2018*. Sevastopol, 2018. P. 1302 [in Russian].
 15. *Beriya L.V., Ismailov A.D., Danilov V.S.* // *Biokhimiya [Biochemistry]*. 1991. V. 56. No. 3. P. 477 [in Russian].