

ВОДА КАК АКТИВНАЯ СРЕДА – СЕНСОР, ТРАНСФОРМАТОР И УСИЛИТЕЛЬ СЛАБЫХ ФИЗИЧЕСКИХ ВОЗДЕЙСТВИЙ

**В.И.Брусков, С.В.Гудков, А.В.Черников, М.Е.Асташев¹,
С.Д.Захаров², Л.С.Ягужинский³**

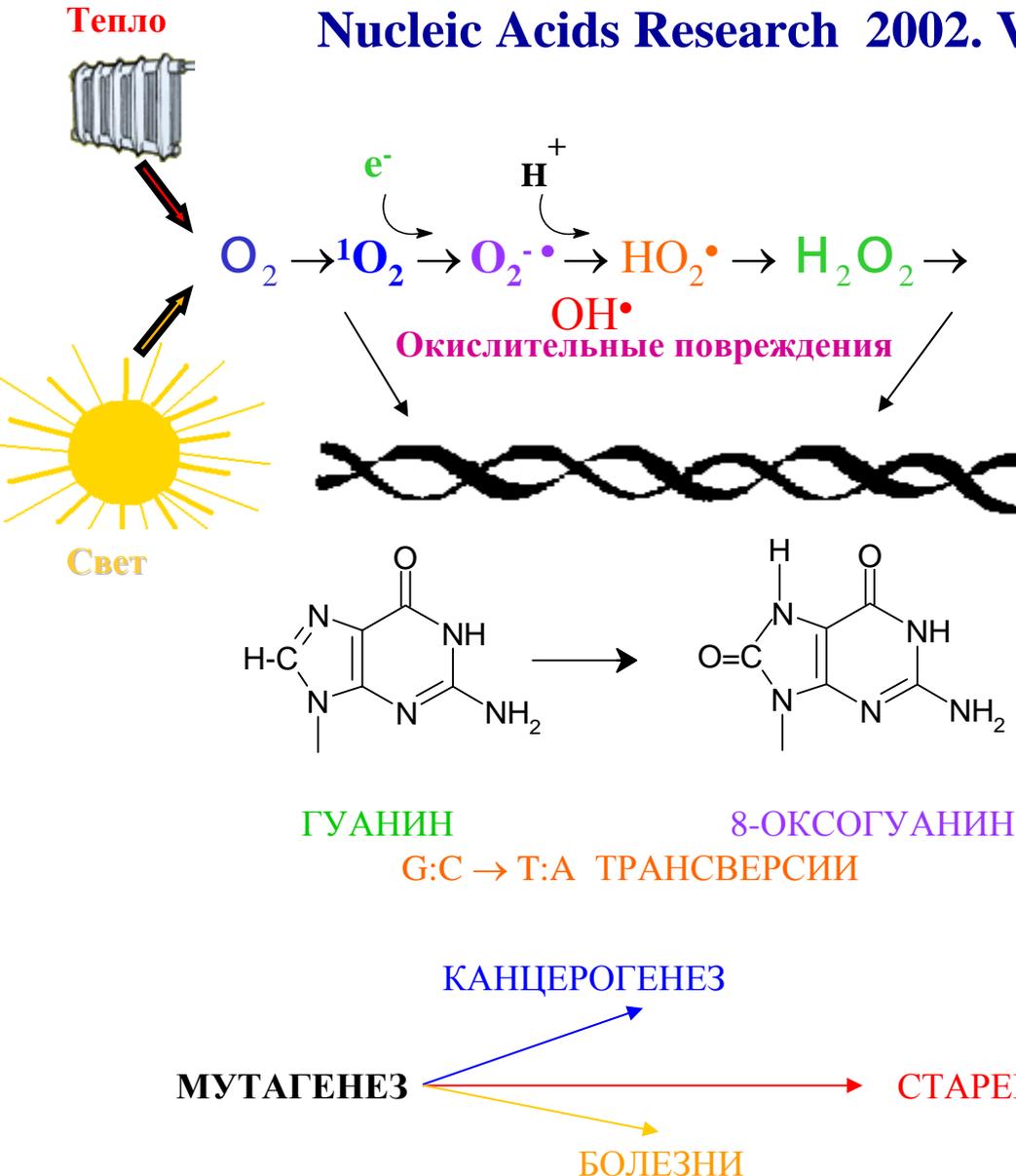
*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
г.Пущино, Московская обл.*

¹Институт биофизики клетки РАН, 142290 г.Пущино, Московская обл.

²Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН, Москва

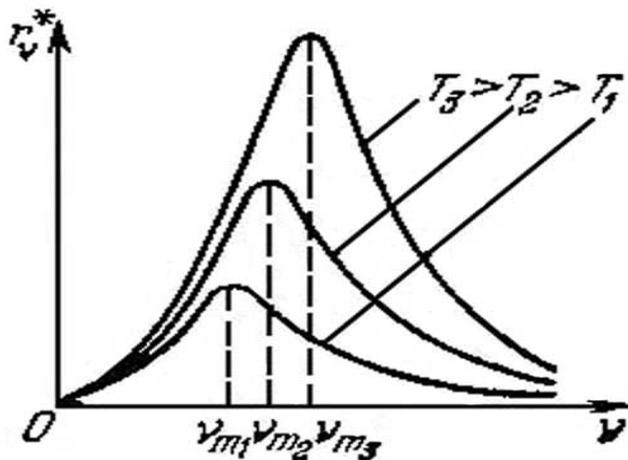
*³Институт физико-химической биологии им.А.Н.Белозерского
Московского государственного университета им.М.В.Ломоносова, Москва*

Bruskov V.I., Malakhova L.V., Masalimov Zk., Chernikov A.V.
 Nucleic Acids Research 2002. Vol 30. P. 1354-63.



Кислород под действием тепла в воде и водных растворах образует активные формы (АФК): синглетный кислород, супероксид радикалы, перекись водорода и гидроксильный радикал. АФК повреждают ДНК с образованием 8-оксогуанина, что ведет к мутационным заменам G:C → A:T, и может являться одной из причин канцерогенеза, старения и ряда заболеваний.

Наблюдается образование активных форм кислорода и азота в водной среде, насыщенной атмосферным воздухом в результате различных по величине энергии квантов электромагнитных воздействий: ионизирующего излучения, УФ-излучения, видимого света, теплового излучения. Эти воздействия приводят к радиолизу, фотолизу и термолизу воды, сопровождающейся разрывом химических связей в воде и образованием радикальных продуктов.



Формула Планка для испускательной способности абсолютно черного тела:

$$r_v^* = \frac{2\pi\nu^2}{c^2} \frac{h\nu}{\exp(h\nu/kT) - 1}$$

Вода – активная среда, способна накапливать дополнительно свободную энергию, которая под влиянием слабых воздействий может высвободиться в преобразованном виде стандартных высокоэнергетических процессов.

Одним из универсальных механизмов является накопление этой энергии в виде растворенных в воде микропузырьков воздуха и ее освобождение при их кавитационном схлопывании.

Установлено (ИОФАН), что в воде, насыщенной воздухом, содержатся бабстонные кластеры, состоящие из гроздей микропузырьков воздуха размером 10-100 нм. Бабстон - (bubble stabilized by ions).

Кавитационное схлопывание микропузырьков воздуха при воздействии ультразвука носит взрывной характер и сопровождается сонолюминесценцией, нагреванием до высоких температур (более 10000 К), высокими давлениями в микрообъеме и образованием АФК.

Одной из причин, приводящей к нестабильности микропузырька воздуха, вызывающего его кавитацию является переход кислорода в синглетное состояние.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Определение образования H_2O_2 под влиянием физических факторов среды методом усиленной хемилюминесценции в системе: люминол-параиодофенол-пероксидаза с регистрацией люминесценции жидкостным сцинтилляционным счетчиком для измерения бета – излучения работающим в режиме счета одиночных фотонов. Чувствительность метода определение концентраций H_2O_2 на уровне долей наномолей на литр.
2. Определение образования гидроксильных радикалов с использованием флуоресцентного зонда кумарин-3-карбоновой кислоты, продукт гидроксирования которой – 7-ОН-кумарин-3-карбоновая кислота обладает интенсивной флуоресценцией.
3. Использование различных перехватчиков, тушителей и усилителей для выявления образования синглетного кислорода, гидратированного электрона и супероксидрадикалов.
4. Определение образования окислов азота с помощью флуоресцентного зонда 1,3-диаминонафталина и реактива Грисса
5. Исследование собственной хемилюминесценции воды под влиянием лазерного излучения



| | Образец | H ₂ O ₂ , нМ | К |
|----|---|------------------------------------|------|
| 1 | 1 мМ ФБ рН 6,8 | 3,2 ± 0,2 | 1 |
| 2 | 1 мМ ФБ рН 6,8, насыщенный O ₂ (*) | 5,7 ± 0,5 | 1,78 |
| 3 | 1 мМ ФБ рН 6,8, насыщенный N ₂ (*) | 1,7 ± 0,7 | 0,53 |
| 4 | 1 мМ ФБ рН 6,8, насыщенный Ar (*) | 1,45 ± 0,3 | 0,45 |
| 5 | 1 мМ ФБ рН 6,8; 10 мМ NaN ₃ | 0,7 ± 0,1 | 0,2 |
| 6 | 1 мМ ФБ рН 6,8; 1 мМ гуанозин | 0 | 0 |
| 7 | 1 мМ ФБ рН 6,8; 50% D ₂ O | 22,4 ± 15,1 | 7 |
| 8 | 1 мМ ФБ рН 6,8; 100% D ₂ O | 96,6 ± 21,4 | 30,2 |
| 9 | 1 мМ ФБ рН 6,8; 0,1 мМ тирон | 0,4 ± 0,18 | 0,12 |
| 10 | 1 мМ ФБ рН 6,8; 0,1 мМ ЭДТА | 0,5 ± 0,1 | 0,15 |
| 11 | 1 мМ ФБ рН 6,8; 0,1 мМ 1,10 фенантролин | 3,25 ± 0,2 | 1 |
| 12 | 1 мМ ФБ рН 6,8; 0,1 мМ неocupроин | 0 | 0 |
| 13 | 1 мМ ФБ рН 6,8; 5 мкМ FeSO ₄ | 1,0 ± 0,2 | 0,3 |
| 14 | 1 мМ ФБ рН 6,8; 2 мкМ CuSO ₄ | 6,6 ± 0,5 | 2 |
| 15 | 1 мМ ФБ рН 6,8; 0,075ед. СОД | 5,3 ± 0,4 | 1,65 |

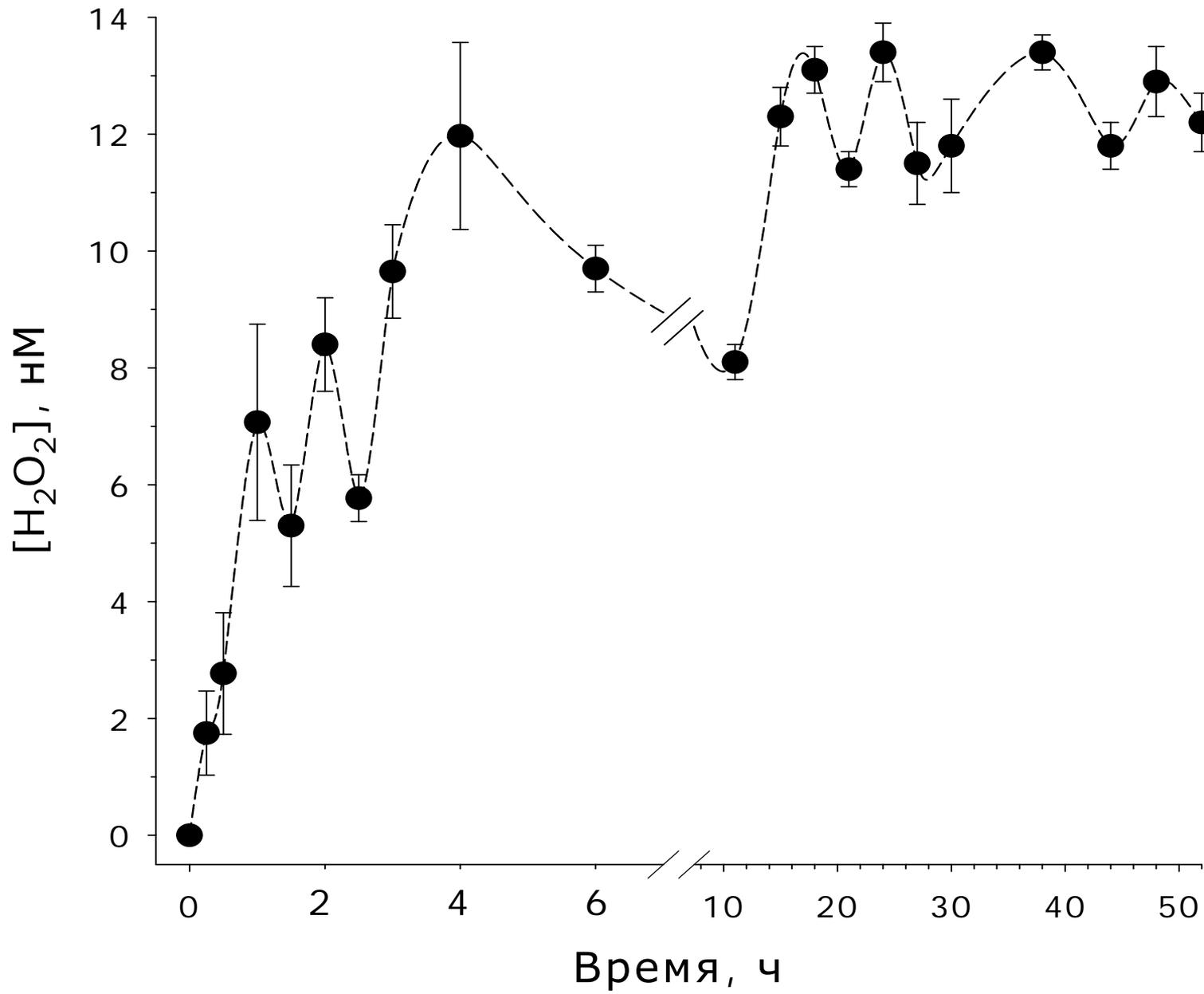
Влияние различных веществ на образование H₂O₂ под действием тепла. Нагревание ФБ 1 мМ, рН 6,8, 4 часа при 40°C.

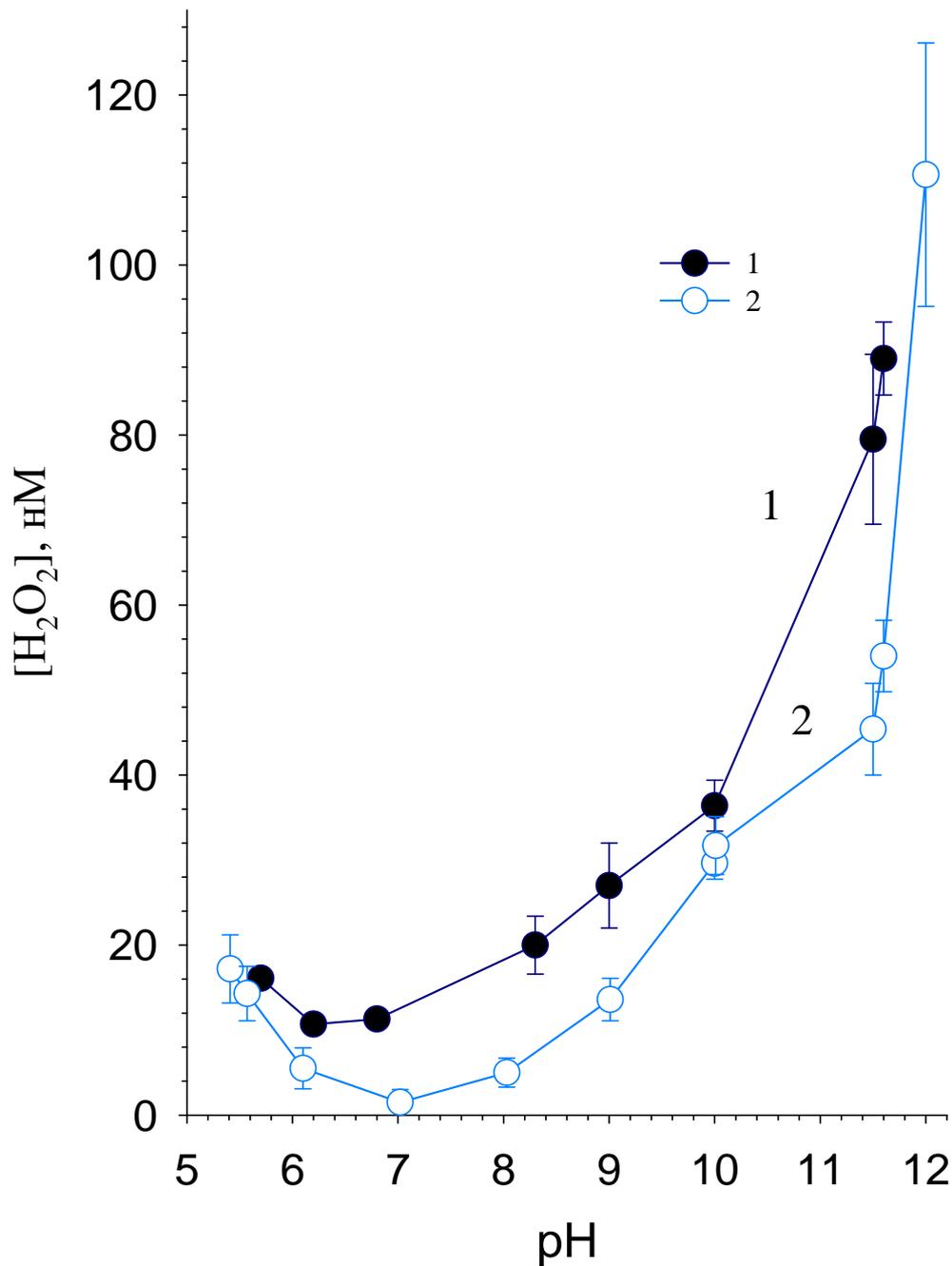
* Вода насыщалась 30 мин пробулькиванием газа перед нагреванием.

** СОД добавлялась сразу после нагревания.

К – относительное изменение величины H₂O₂ под действием данного вещества по отношению к контролю.

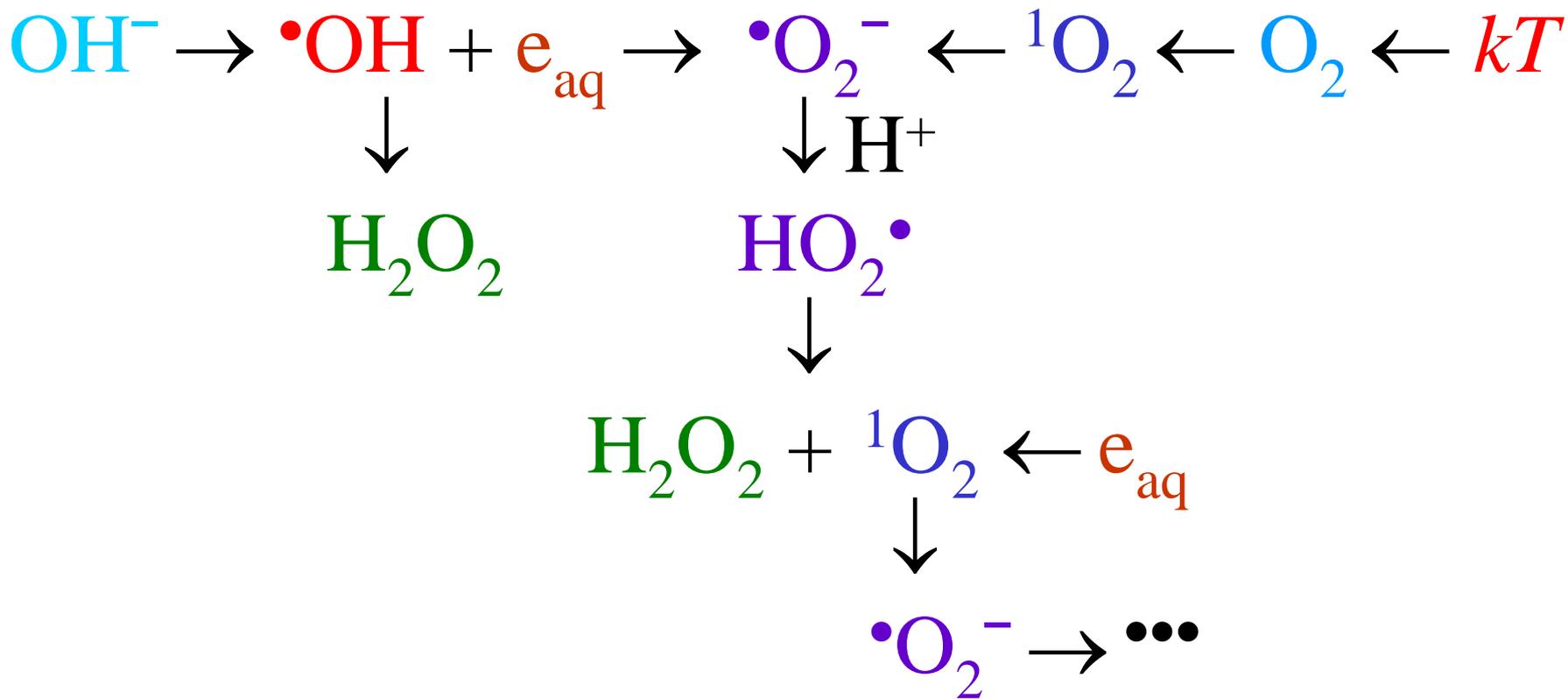
Содержание H_2O_2 в бидистиллированной воде при 37°C

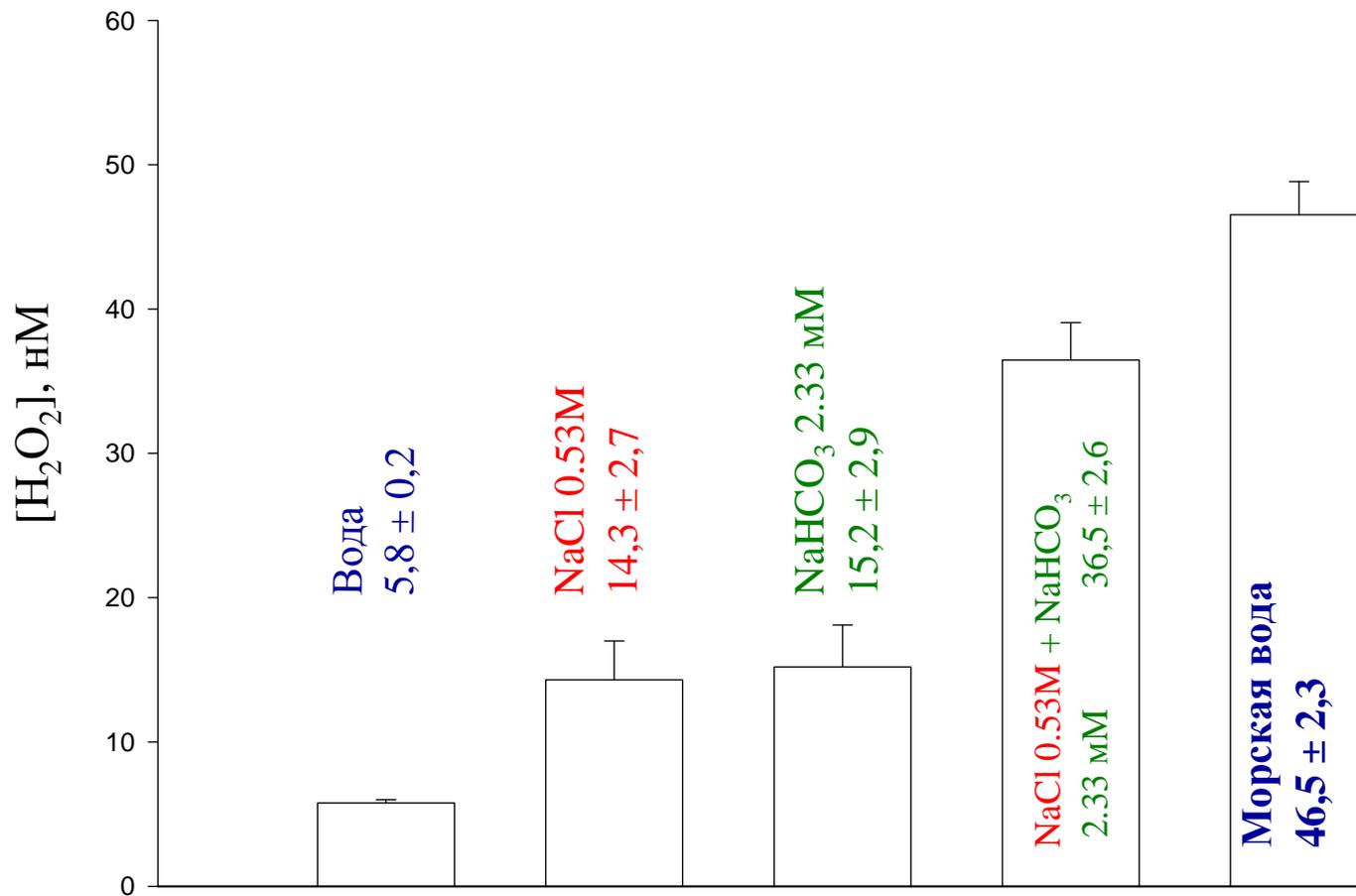




Зависимость от рН величины образования H_2O_2 в бидистиллированной воде насыщенной воздухом (2) и дополнительно кислородом (1) при нагревании 40°C в течение трех часов. Вода насыщалась кислородом в течение 30 мин пробулькиванием газа перед нагреванием. Изменение рН осуществляли добавлением NaOH . Приведены средние значения не менее трех независимых экспериментов и их стандартные отклонения.

Схема последовательности реакций образования
активных форм кислорода
в воде под действием тепла





Образование H₂O₂ под действием тепла при нагревании растворов в течение 3 часов при 40°C, pH воды и растворов 8,5.

А: - вода (n=8); Б: - NaCl 0,53 М (n=2), В: - NaHCO₃ 2,33 мМ (n=2), Г: NaCl 0,53 М и NaHCO₃ 2,33 мМ (n=3), Д: - морская вода (n=5).

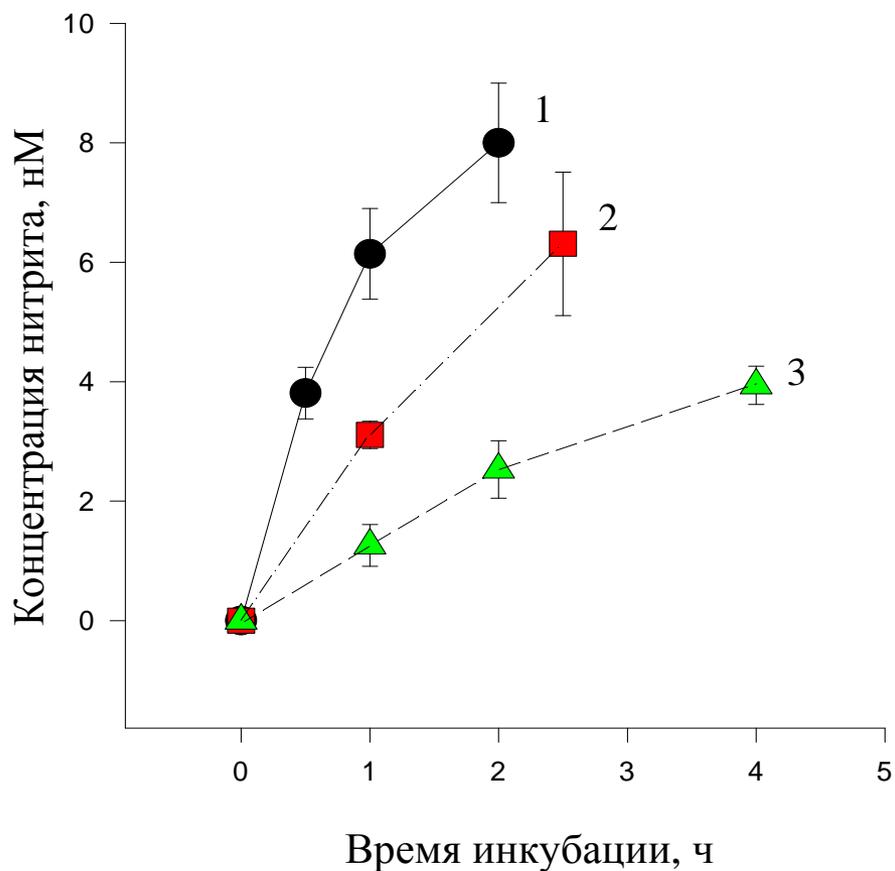
Целый ряд анионов таких как Cl^- , Br^- , I^- , OH^- , PO_4^{2-} , CO_3^{2-} продуцируют гидратированный электрон при их флеш-фотолизе в процессе:



Можно полагать, что тепловое воздействие, подобно квантам света, также приводит к аналогичному процессу:



где kT означает действие теплового электромагнитного излучения. Радикалы, в свою очередь, рекомбинируют с образованием молекулярных форм: $A_{\text{aq}}^\bullet + A_{\text{aq}}^\bullet = A_2$, или, если присутствует ряд различных радикалов, то с дополнительным образованием их перекрестных форм.



Кинетика образования NO_2^- в бидистиллированной воде при нагревании при различных температурах ($^{\circ}\text{C}$):
 1 – 80, 2 – 70, 3 – 60. (n = 2-6)

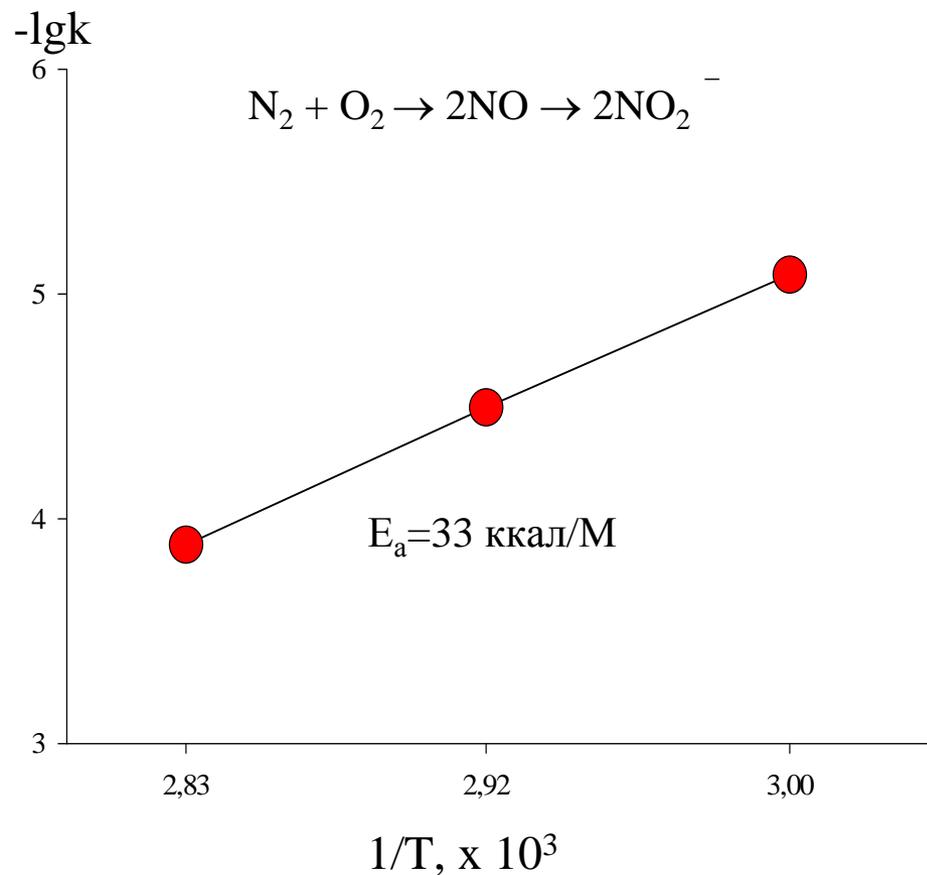
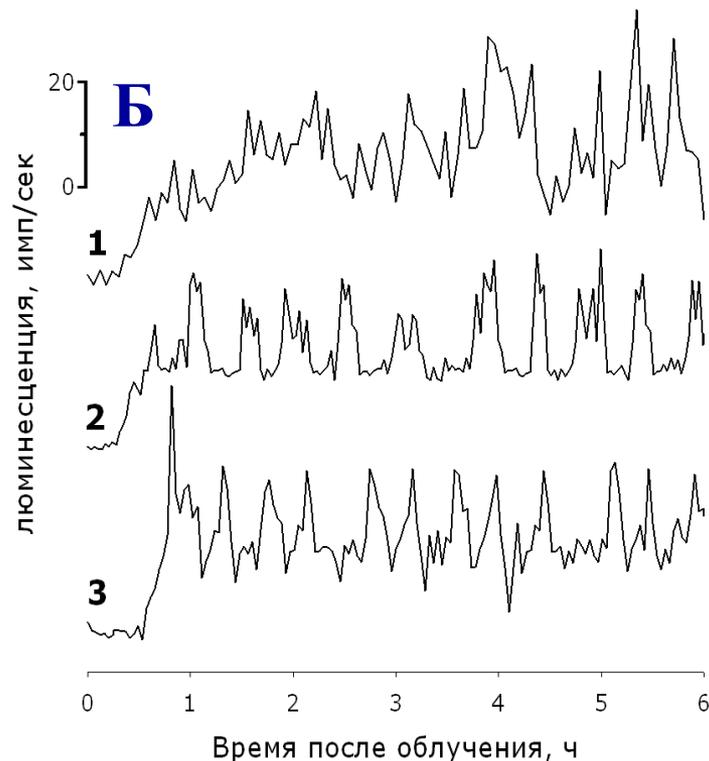
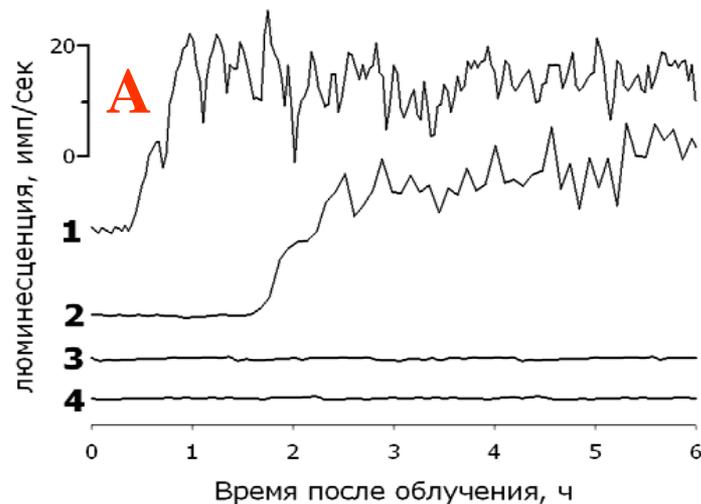


График Аррениуса зависимости $-\lg k$ от обратной температуры для определения энергии активации образования NO_2^- в бидистиллированной воде при нагревании (k – константа скорости генерации NO_2^- ($\text{M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$), T – температура (K)).

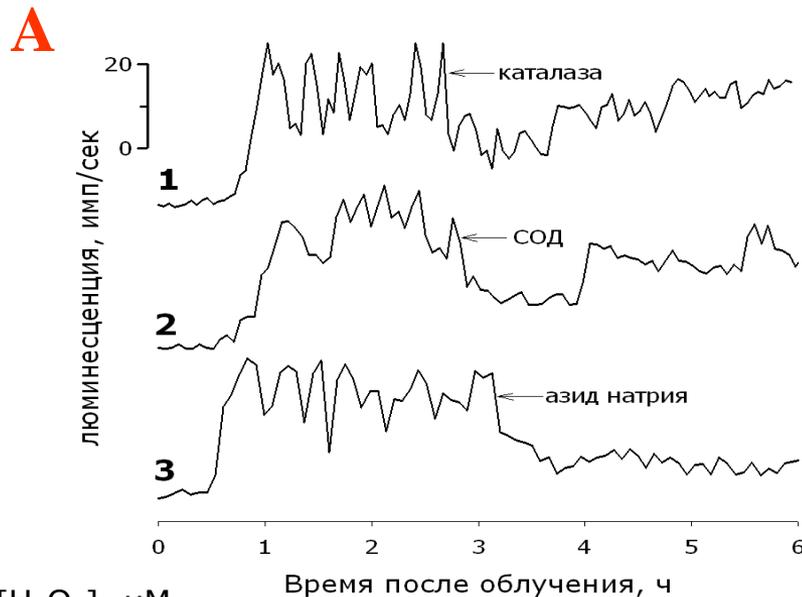
В.И.Брусков, С.В.Гудков, С.Ф.Чалкин, Е.Г.Смирнова, Л.С.Ягужинский // Докл. РАН. 2009. Т. 425, С. 827-829.

А. Влияние длительности лазерного облучения на люминесценцию воды. Воздействие облучения гелий-неоновым лазером на воду в течение 5 мин (1), 3 мин (2) и 1 минуты (3). Люминесценция воды без облучения (4).

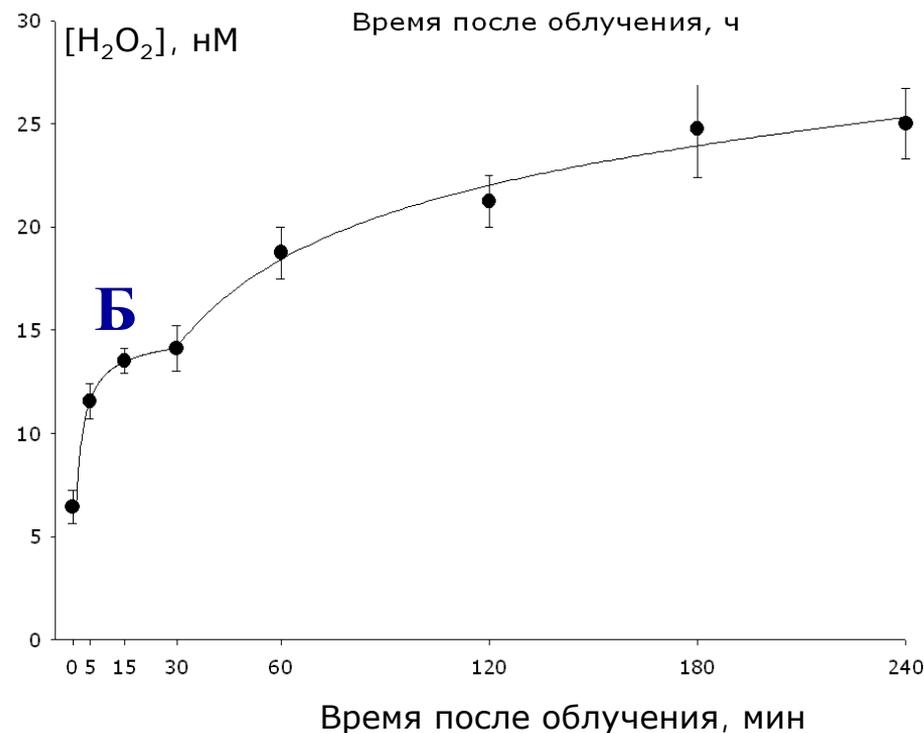
Б. Основные типы автоколебаний люминесценции воды индуцированные облучением лазера в течение 5 мин. Нерегулярные колебания люминесценции воды (1), колебания типа пакета импульсов (2), колебания люминесценции воды типа регулярные пики (3).

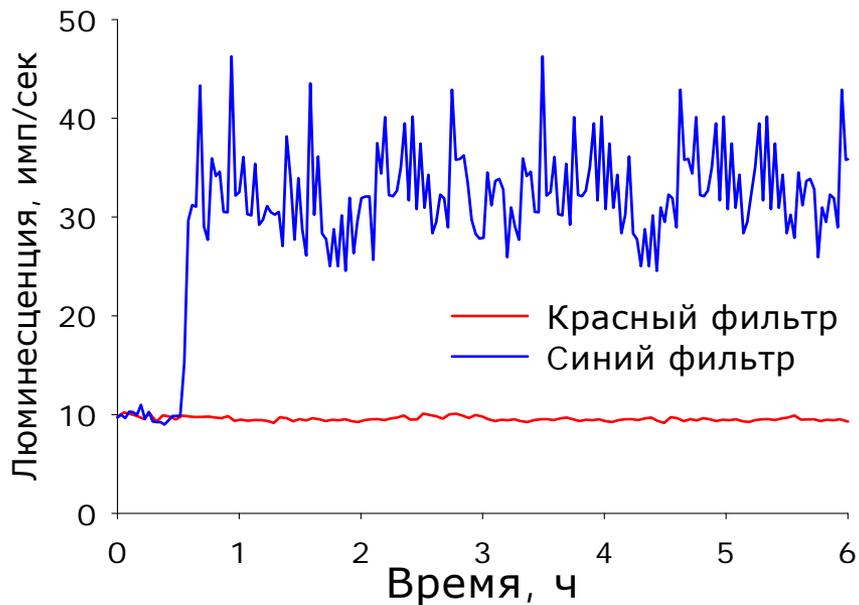


А. Влияние на колебательный процесс люминесценции воды каталазы (1), СОД (2) и азида натрия (3) после воздействия лазерного излучения в течение 5 мин. Момент внесения этих веществ показан стрелками.

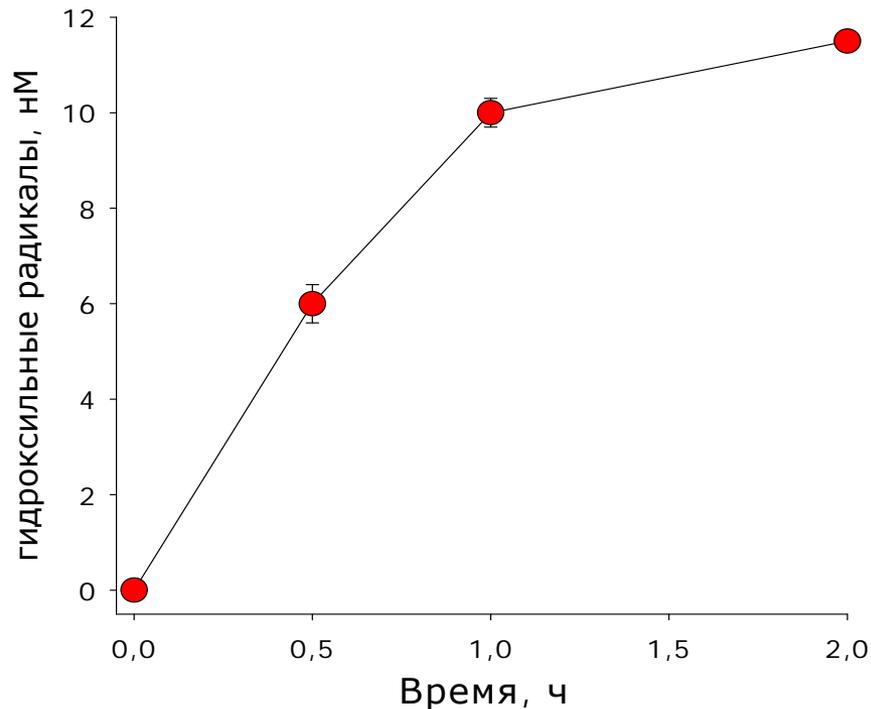
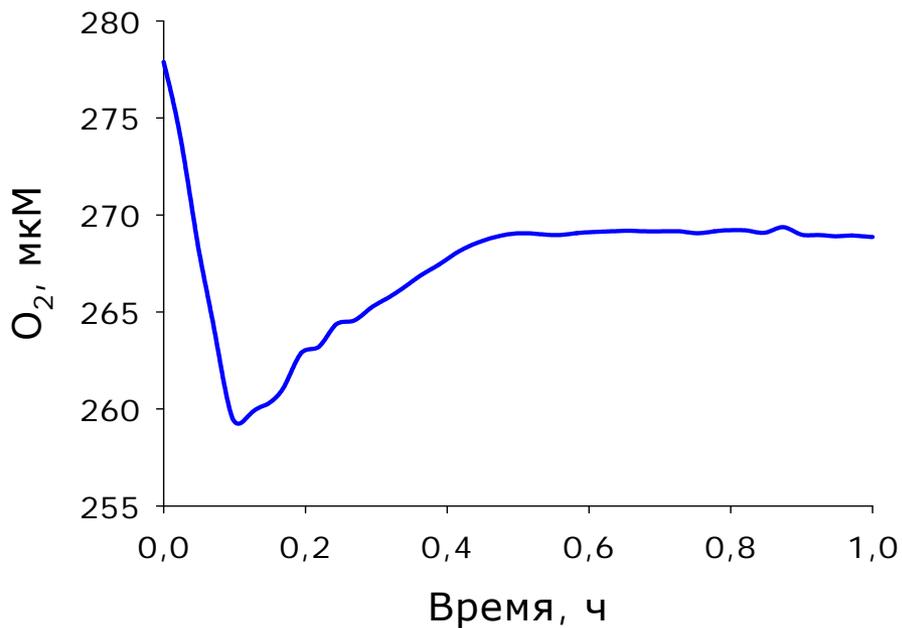


Б. Кинетика увеличения средней концентрации H_2O_2 индуцируемой лазерным облучением воды в течение 5 мин.



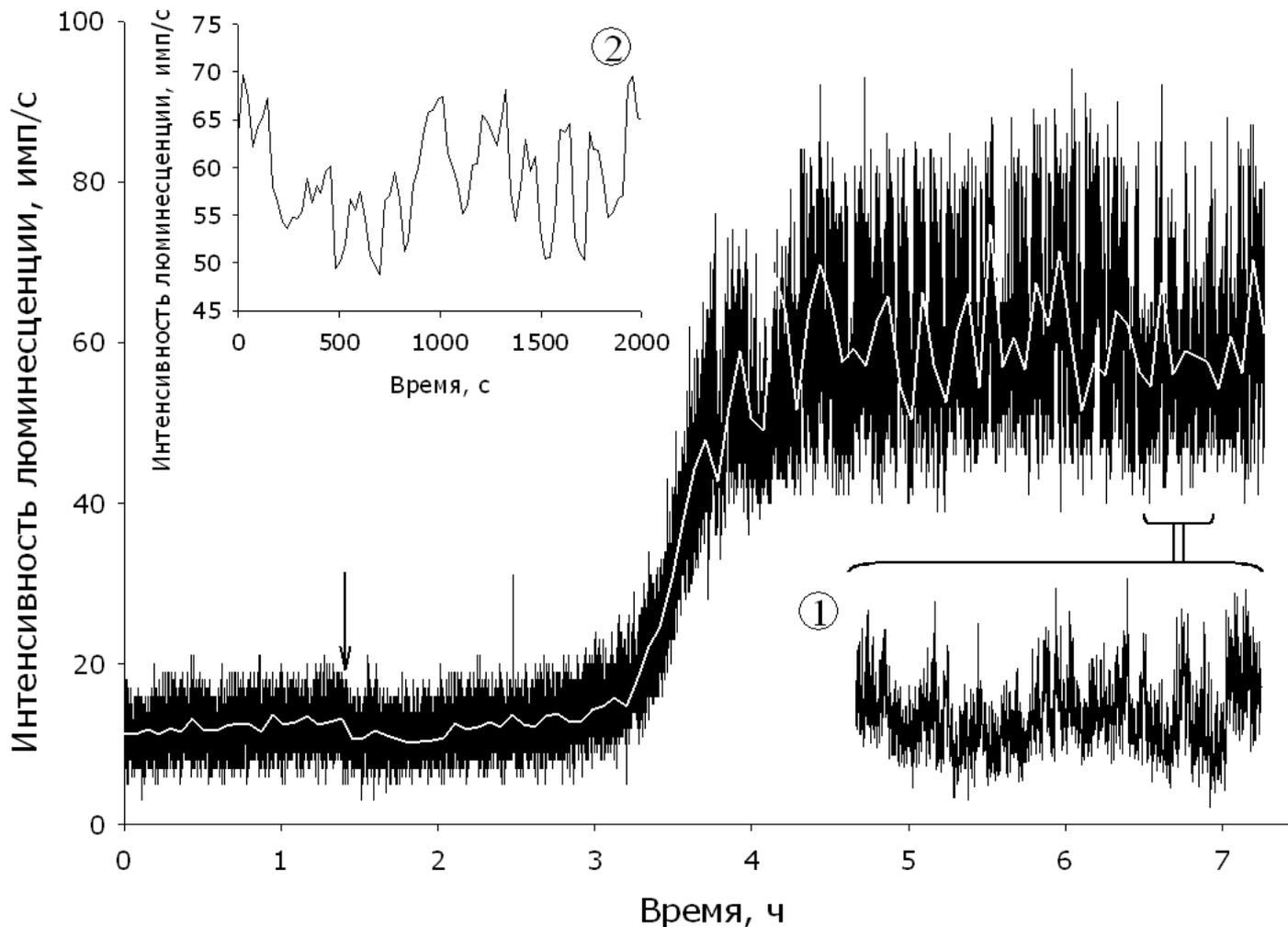


**Облучение He-Ne лазером
с длиной волны 633 нм
мощностью 1,7 мВт
в течение 5 мин**



Влияние ИК лазерного излучения ($\lambda=1,26$ мкм, мощность 5 кВт, 5 мин) на интенсивность люминесценции воды.

На вкладке 1 представлена микроструктура изменения люминесценция воды. На вкладке 2 представлена интегральная интенсивность люминесценции воды с вкладки 1.



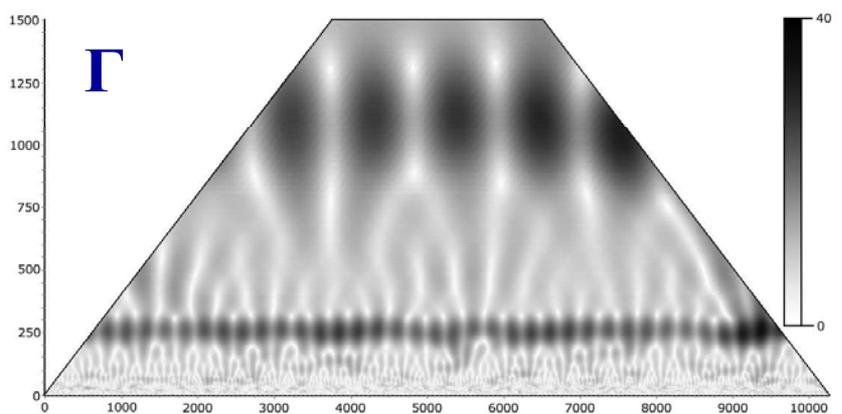
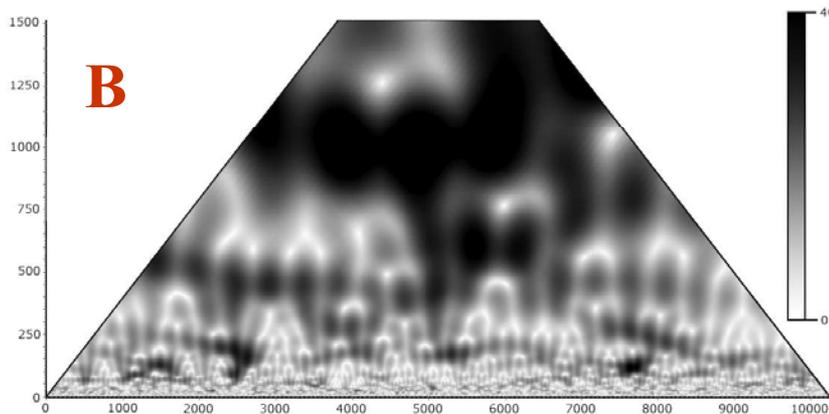
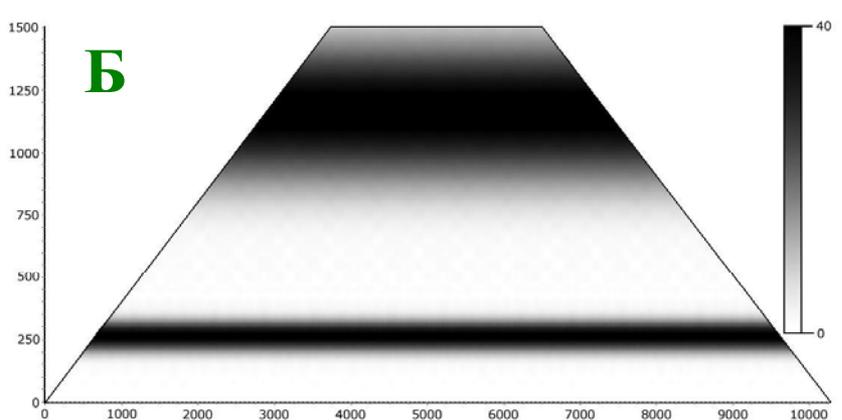
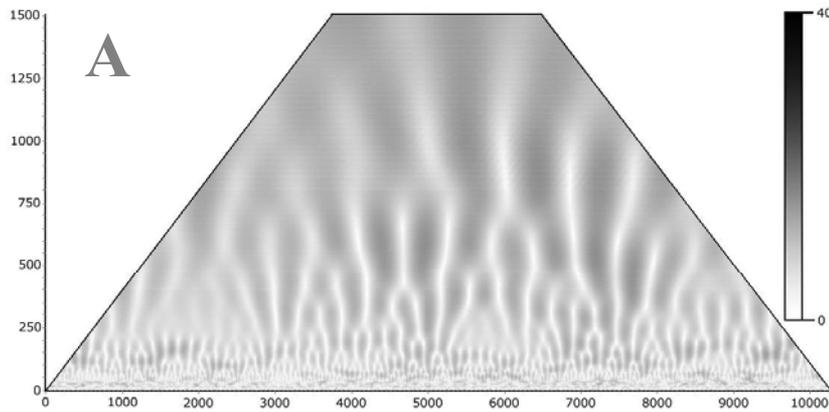
Анализ временных рядов с помощью вейвлет-преобразования

А – при отсутствии ИК лазерного воздействия

Б – модельный сигнал $y = \sin(x) + \sin(5x)$

В – стандартный результат после воздействия ИК лазера

Г – наиболее четкий результат выявленной периодичности (~5 и 19 мин)



Экспериментальные свидетельства наличия кавитационного процесса при облучении воды гелий-неоновым и инфракрасным (1260 нм) лазером:

1. Преобразование энергии низкой плотности в энергию высокой плотности, как основной критерий кавитации.

2. Образование АФК (перекиси водорода, гидроксильных радикалов и др. радикальных продуктов) и окислов азота (15 мин облучение He-Ne лазером приводит к образованию $2,4 \pm 0,2$ нМ NO_2^-)

3. Уменьшение концентрации кислорода.

Оценки величин энергии активации образования перекиси водорода и оксида азота при тепловых воздействиях дают величину, соответствующую возбуждению кислорода при переходе его в синглетное состояние.

Не исключено, что биологические эффекты воздействия слабых магнитных полей на ядерные спины биологически важных ионов могут реализовываться путем усилительного процесса, связанного с кавитационным схлопыванием бабстонов.

Благодарю за внимание

ЛИТЕРАТУРА:

1. Брусков В.И., Масалимов Ж.К., Черников А.В. Образование активных форм кислорода под действием тепла при восстановлении растворенного кислорода воздуха. **Доклады РАН** 2001 т. 381, №2, с.262-264.
2. Bruskov V. I., Malakhova L. V., Masalimov Zh. K., Chernikov A.V. Heat-induced formation of reactive oxygen species and 8-oxoguanine, a biomarker of damage to DNA. **Nucleic Acids Res.** 2002, Vol.30, No 6. P.1354-1363.
3. Брусков В.И., Масалимов Ж.К., Черников А.В. Образование активных форм кислорода в воде под действием тепла. **Доклады РАН** 2002 т. 384, №6, с.821-824.
4. Черников А.В., Брусков В.И. Генерация гидроксильных радикалов и других редокс-активных соединений в морской воде под действием тепла. // **Биофизика.** 2002. Т.47. С.773-781.
5. Брусков В.И., Черников А.В., Гудков С.В., Масалимов Ж.К. Активация восстановительных свойств анионов морской воды под действием тепла. **Биофизика.** 2003.Т.48, №6, с.1022-11029.
6. Черников А.В., Брусков В.И. Фиксация атмосферного азота под действием тепла и света в воде с образованием оксидов азота. **Доклады РАН** 2005, т. 400, №2, с.279-282.
7. Смирнова В.С., Гудков С.В., Черников А.В., Брусков В.И. Образование 8-оксогуанина и его окисленных продуктов в ДНК *in vitro* под действием температуры при 37°C. **Биофизика.** 2005.Т.50, №2, С. 243-252.
8. Смирнова В.С., Гудков С.В., Штаркман И.Н., Черников А.В., Брусков В.И. Генотоксическое действие ионов уранила на ДНК *in vitro*, обусловленное генерацией активных форм кислорода. **Биофизика** 2005.Т.50, №3, С.456-463.
9. Гудкова О.Ю., Гудков С.В., Гапеев А.Б., Брусков В.И., Рубаник А.В., Чемерис Н.К. Исследование механизмов образования активных форм кислорода в водных растворах под действием импульсного электромагнитного излучения крайне высоких частот с большой пиковой мощностью. **Биофизика** 2005. Т.50, №5, С.773-779.
10. Черников А.В., Гудков С.В., Штаркман И.Н., Брусков В.И. Кислородный эффект при тепловых повреждениях ДНК. **Биофизика.** 2007. Т.52, вып 2, с.244-251.
11. Штаркман И.Н., Гудков С.В., Черников А.В., Брусков В.И. Образование перекиси водорода и гидроксильных радикалов в водных растворах L-аминокислот при воздействии рентгеновского излучения и тепла. // **Биофизика.** 2008. Т. 53, № 1, с. 5-13.
12. В.И.Брусков, С.В.Гудков, С.Ф.Чалкин, Е.Г.Смирнова, Л.С.Ягужинский Автоколебательный процесс люминесценции воды, индуцированный лазерным облучением. // **Доклады РАН.** 2009. Т. 425, №6. С. 827-829.