



# Образование активных форм кислорода и возникновение колебаний люминесценции в воде под воздействием видимого и инфракрасного излучений в полосах поглощения молекулярного кислорода



*Гудков С.В., Черников А.В., Гармаш С.А, Иванов В.Е.,  
Карп О.Э., Манохин А.А., Асташев М.Е., Ягужинский Л.С.,  
Захаров С.Д., Брусков В.И.*

- Активными формами кислорода обычно называют: синглетный кислород ( $\text{^1O}_2$ ), супероксид анион радикал ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), гидроперекисный радикал ( $\text{HO}_2^{\bullet}$ ), гидроксильный радикал ( $\text{OH}^{\bullet}$ ), перекись водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) и другие.
- Известно, что при избыточном уровне активных форм кислорода возникает окислительный стресс. С другой стороны, небольшое изменение физиологического уровня активных форм кислорода играет важную сигнально-регуляторную роль, направленную на активизацию защитных клеточных систем и адаптацию, препятствующую возникновению окислительного стресса.
- Физиологическая концентрация  $\text{H}_2\text{O}_2$  в плазме крови человека оценивается в пределах 20-35 нМ, кратковременное изменение концентрации на сходные количества приводит к изменению ряда биологических процессов.



Известно, что образование АФК происходит в результате **радиолиза воды** под действием ионизирующих излучений.



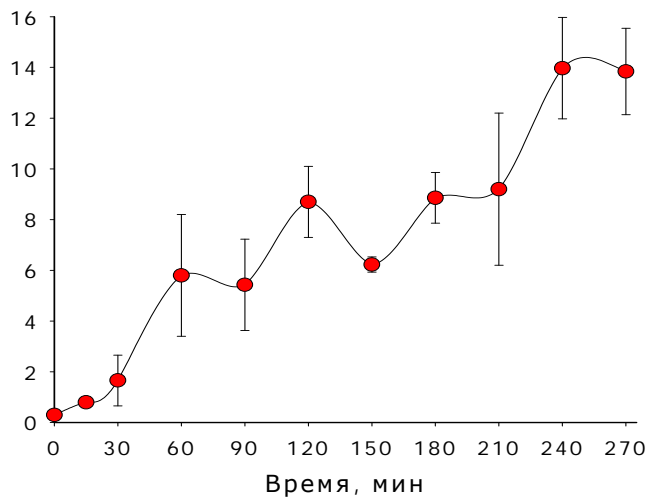
В данной работе показано, что образование АФК, также происходит в результате **термолиза и фотолиза воды.**

# МЕТОДЫ И ПОДХОДЫ

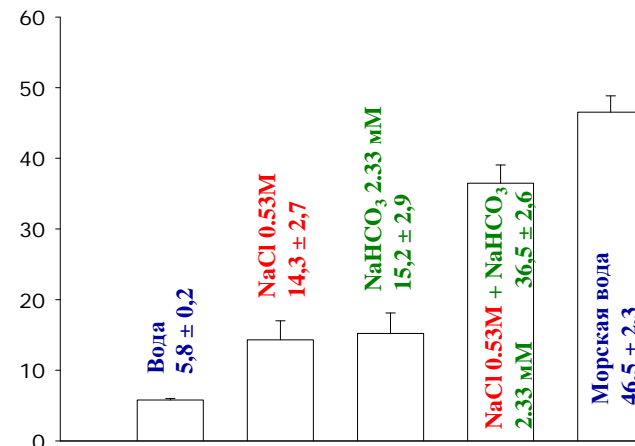
- 1. Концентрацию  $H_2O_2$  определяли методом усиленной хемилюминесценции** в системе: люминол-параиодофенол-пероксидаза. Люминесценцию регистрировали с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика для измерения бета излучения, работающего в режиме счета одиночных фотонов. Ряд модификаций метода и прибора позволяют в настоящий момент регистрировать **около 0.1 нМ перекиси водорода**.
- 2. Образование гидроксильных радикалов исследовали с помощью флуоресцентного зонда кумарин-3-карбоновой кислоты**, продукт гидроксирования которой – 7-ОН-кумарин-3-карбоновая кислота – обладает интенсивной флуоресценцией. **Изменения, внесенные нами ранее в методику, позволили существенно повысить ее чувствительность**.
- 3. Определение 8-оксогуанина**, ключевого биомаркера окислительных повреждений ДНК, **проводили методом иммуноферментного анализа** с применением полученных, очищенных и охарактеризованных в нашей лаборатории ранее моноклональных антител к этому повреждению.
- 4. Индуцированную люминесценцию воды** исследовали с помощью высокочувствительного хемилюминометра **BT USE (ultra sensitive edition)**, построенного для этих целей в АНО ИЦЭ, г. Москва (Российское аэрокосмическое агентство).
- 5. С помощью «ингибиторного анализа»** исследовали на качественном уровне реакции протекающие между различными АФК в водных растворах. Подход основан на использовании **различных перехватчиков, тушителей и усилителей ряда реакций**.

# Образование АФК при воздействии тепла

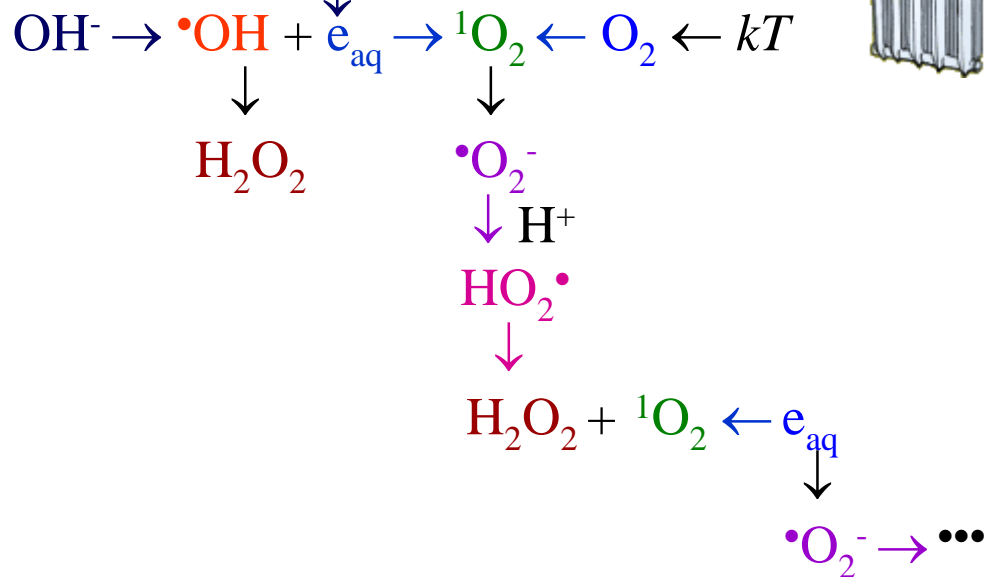
[H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>], нМ



[H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>], нМ



биологически значимые анионы

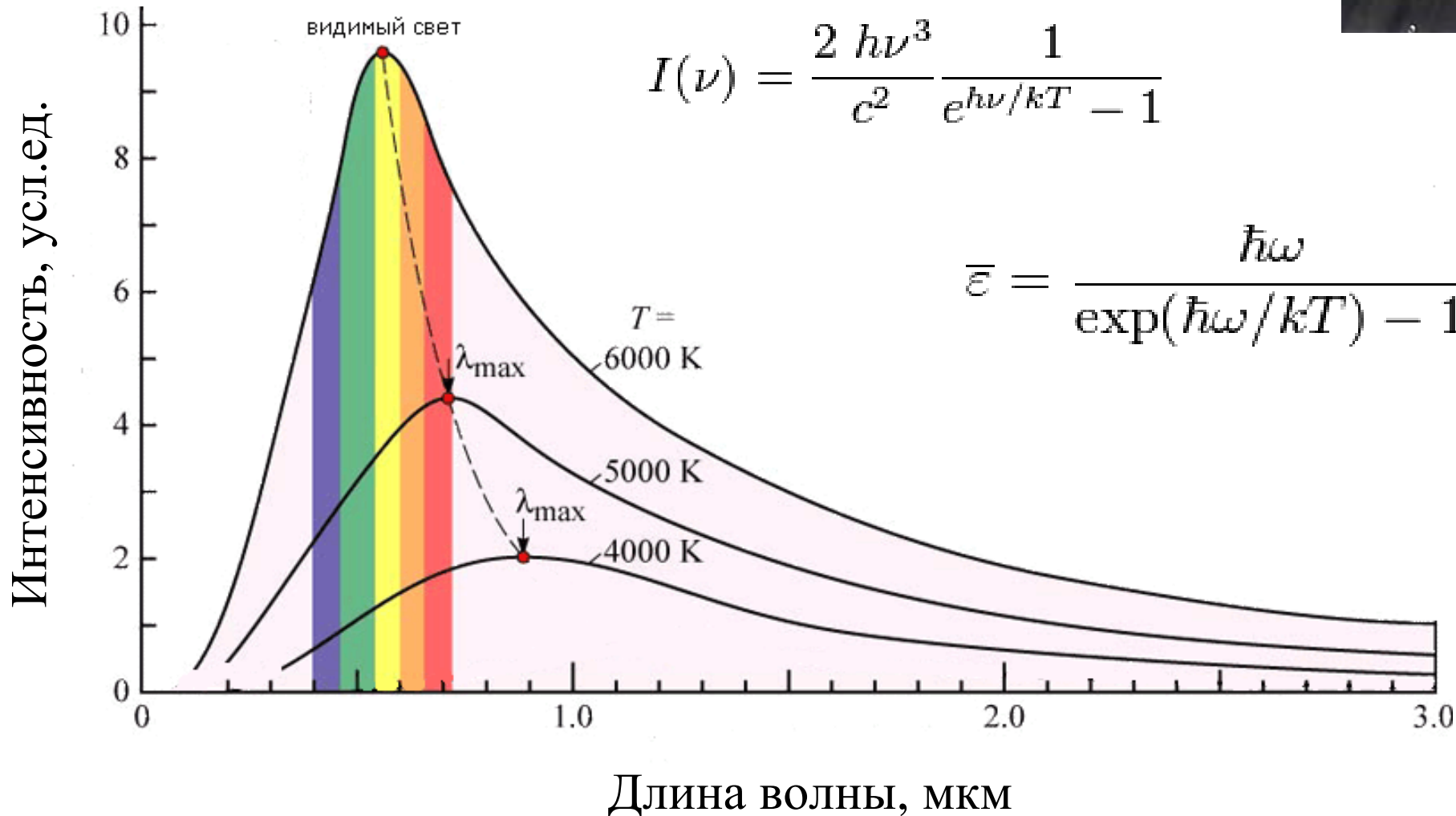


№	Образец	pH	[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ], нМ	K ***
1	Контроль	5,6	12,3 ± 1,4	—
2	Контроль	8,0	15,0 ± 1,7	—
3	Контроль	10,0	29,6 ± 1,9	—
4	Контроль	11,5	45,4 ± 4,1	—
5	O <sub>2</sub> *	5,6	16,1 ± 0,9	1,3
6	N <sub>2</sub> *	10,0	7,6 ± 0,3	0,6
7	Ag *	10,0	7,3 ± 0,4	0,6
8	Менадион	5,6	78,5 ± 9,5	6,4
9	NaN <sub>3</sub>	6,0	4,3 ± 1,1	0,3
10	Гуанозин	5,6	1,2 ± 0,3	0,1
11	D <sub>2</sub> O (50%)	5,6	60,3 ± 11,1	4,9
12	СОД	5,6	18,4 ± 1,1	1,5
13	Тирон	5,6	0,0 ± 0,0	0,0
14	D-маннит	5,6	4,0 ± 0,6	0,3
15	Этанол	5,6	2,6 ± 1,0	0,2

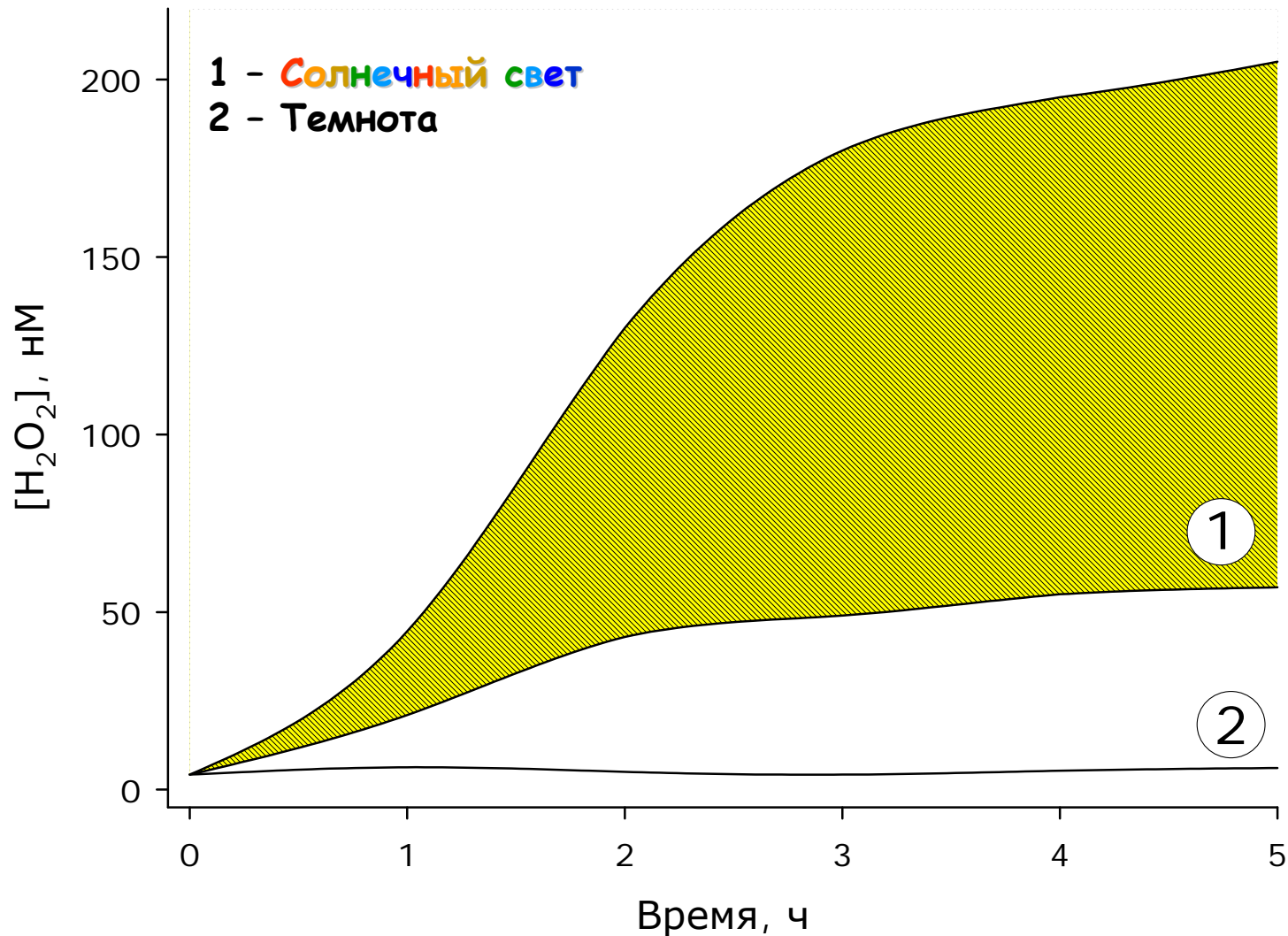
**Электромагнитное излучение**, испускаемое веществом и возникающее за счет его внутренней энергии, называется **тепловым, или температурным, излучением.**



Спектральная плотность излучения чёрного тела, нагретого до температуры  $T$   
(Закон Планка)



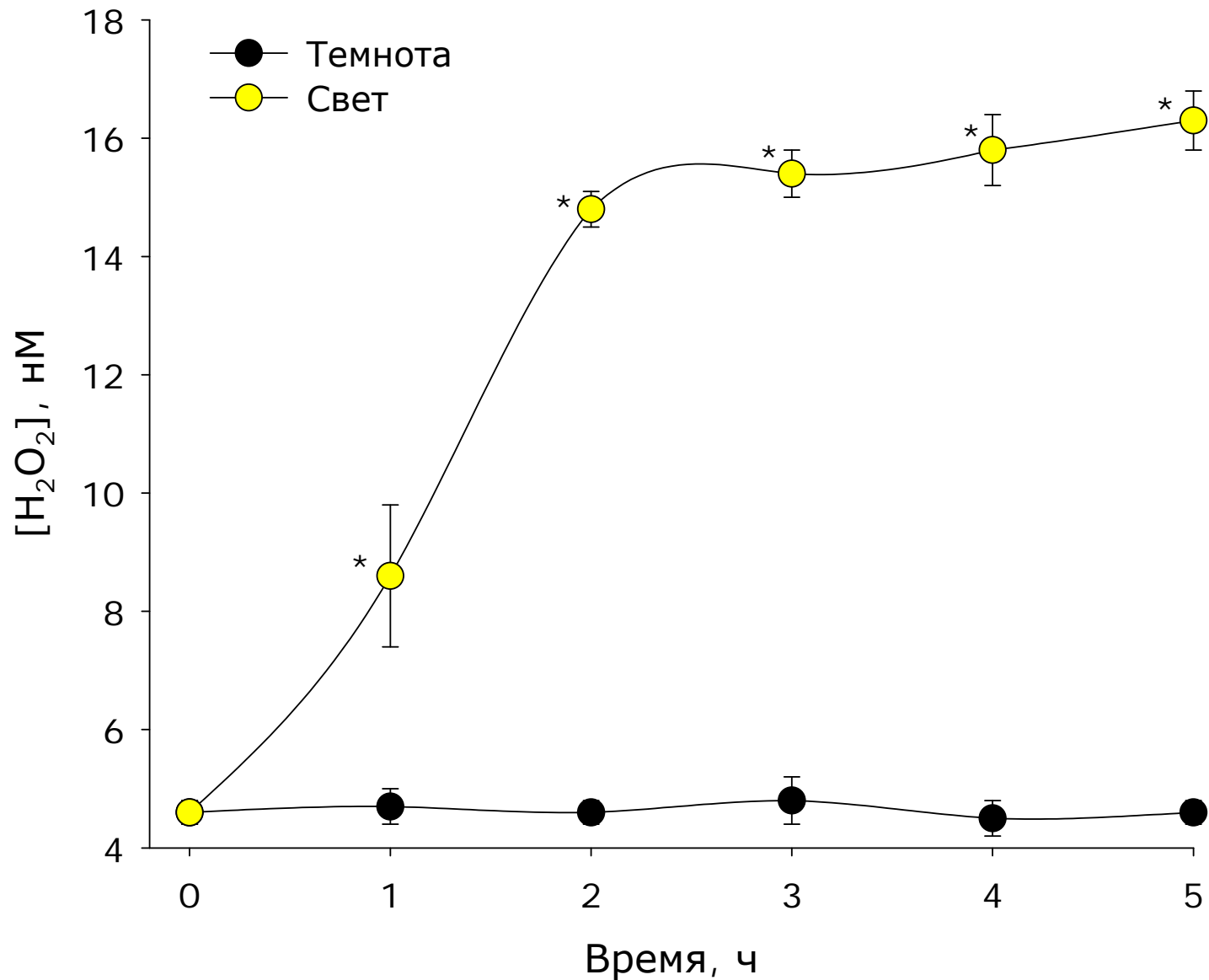
Кинетика образования  $\text{H}_2\text{O}_2$  в бидистиллированной воде при воздействии солнечного света ( $54^\circ 50'$  с.ш.,  $37^\circ 37'$  в.д. конец сентября). Средняя температура воды в экспериментах  $+5+9^\circ\text{C}$ . Показаны пределы изменения концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  в зависимости от условий освещения в солнечную и пасмурную погоду.





Кинетика образования  $\text{H}_2\text{O}_2$  в бидистиллированной воде при воздействии видимого света (1200 Лм).

( $M \pm m$ ,  $n=3$ )



Влияние различных веществ на образование  $\text{H}_2\text{O}_2$  в бидистиллированной воде под воздействием видимого света (1200 Лм, 120 мин).

( $M \pm m$ ,  $n=3$ )



Воздействие	$\Delta[\text{H}_2\text{O}_2]$ , нМ	К
Вода, насыщенная воздухом	$10,2 \pm 0,2$	1,0
Вода, насыщенная $\text{Ar}^{**}$	$5,3 \pm 0,4^*$	0,5
Вода, насыщенная $\text{O}_2^{**}$	$18,4 \pm 0,6^*$	1,8
$\text{D}_2\text{O}$ (25%)	$18,2 \pm 1,2^*$	1,8
Азид $\text{Na}$ (0,1 мМ) $^{***}$	$3,5 \pm 0,3^*$	0,3
СОД ( $10^{-3}$ ед./мл)	$15,1 \pm 0,9^*$	1,5
Тиرون (100 нМ)	$2,0 \pm 0,1^*$	0,2
Этанол (1 М)	$6,1 \pm 0,3^*$	0,6
D-маннит (200 мМ)	$0,4 \pm 0,1^*$	$> 0,1$

\* - Достоверное отличие от контроля ( $P < 0,05$ ).

\*\* - Вода насыщалась в течение 30 мин газом перед световым воздействием путем барботирования.

\*\*\* - В указанной концентрации азид  $\text{Na}$  не оказывал ингибирующего влияния на активность пероксидазы

К – относительное изменения концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  под влиянием изучаемого агента.

Исходные значения перекиси водорода в воде вычтены из получаемых значений.

Зависимость образования  $\text{H}_2\text{O}_2$  от pH в бидистиллированной воде при воздействии видимого света (1200 Лм, 120 мин). ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )

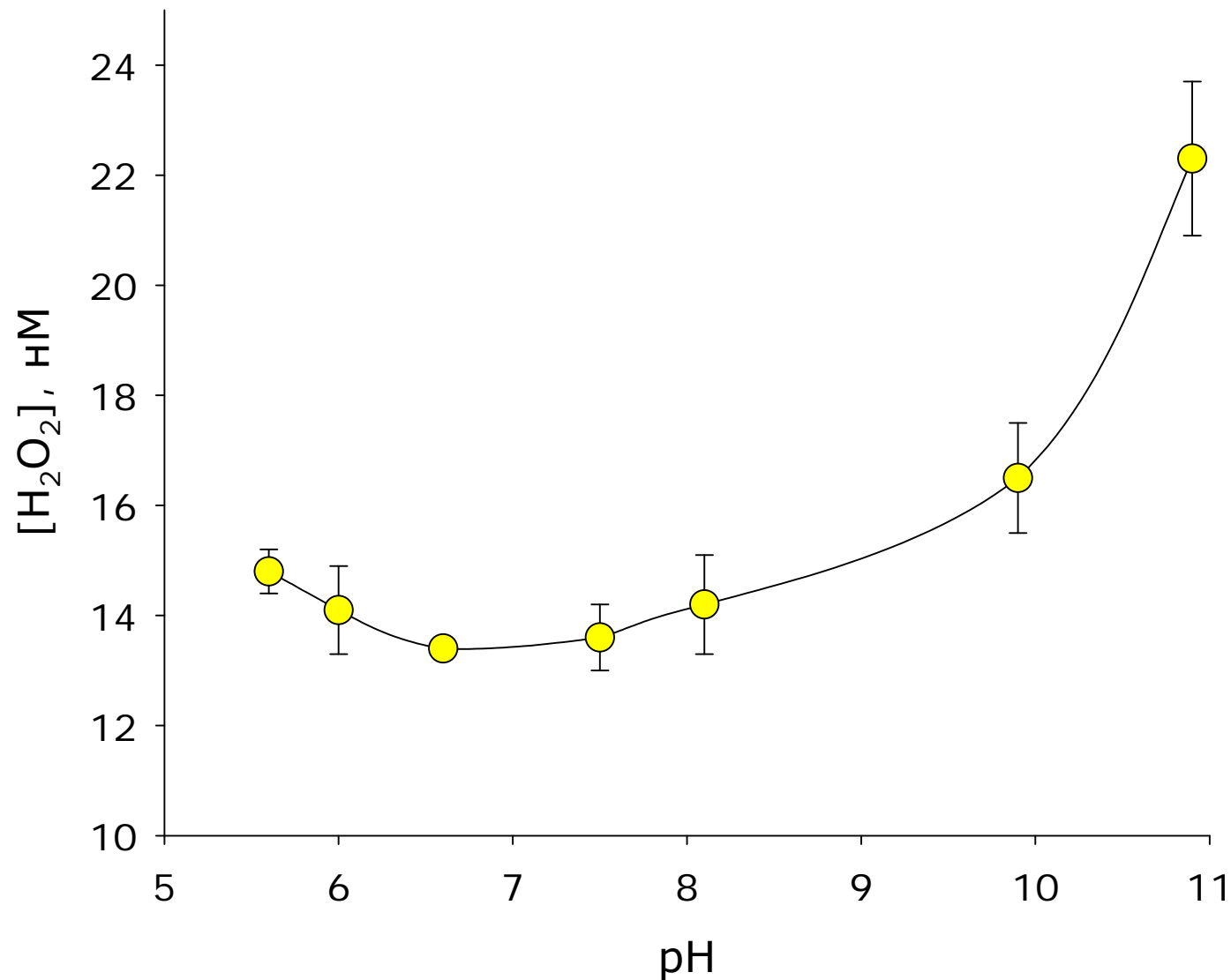
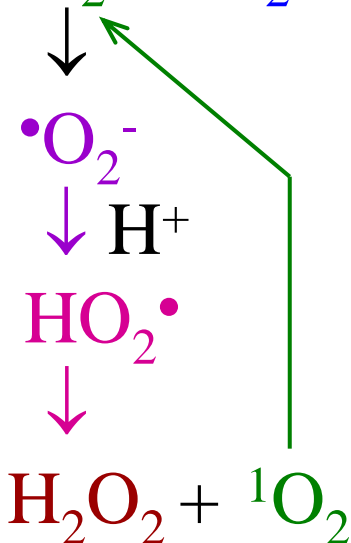
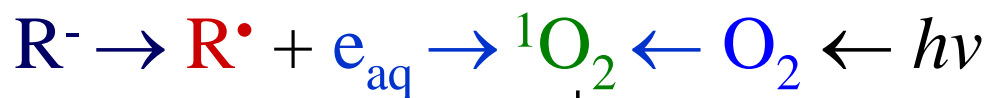
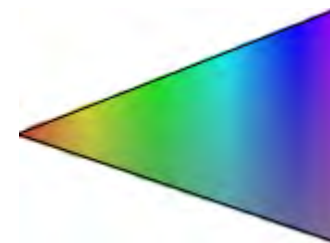


Схема совокупности реакций, происходящих при образовании  $\text{H}_2\text{O}_2$  под действием света.  $h\nu$  – означает действие света.

биологически значимые анионы

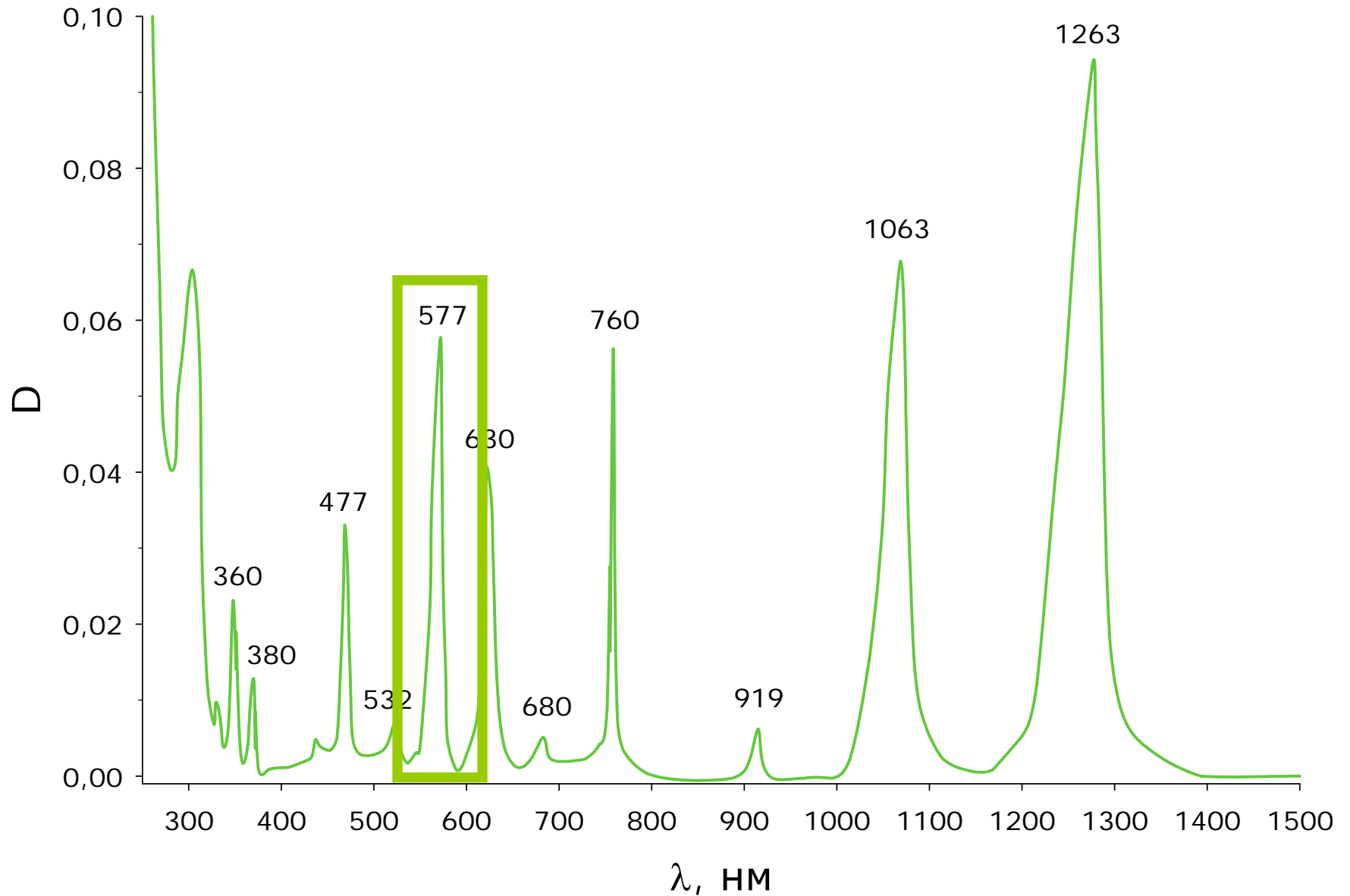


Видимый свет

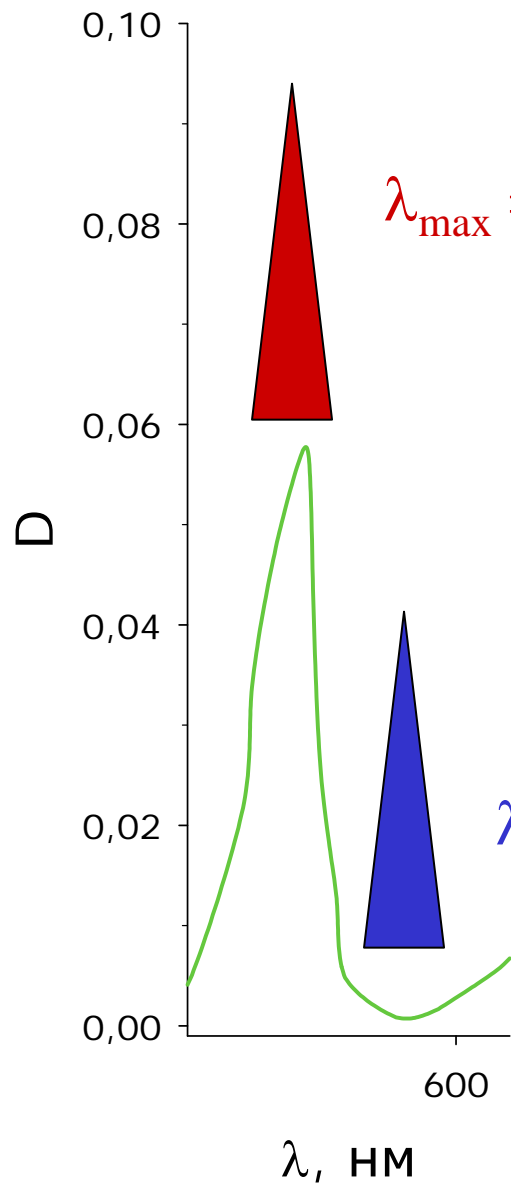


# Спектр поглощения молекулярного кислорода

*Джагаров и др., 2004 (ЖПС)*



# Эффекты дифракционных фильтров $\lambda_{\max}$ 577 и 595 нм



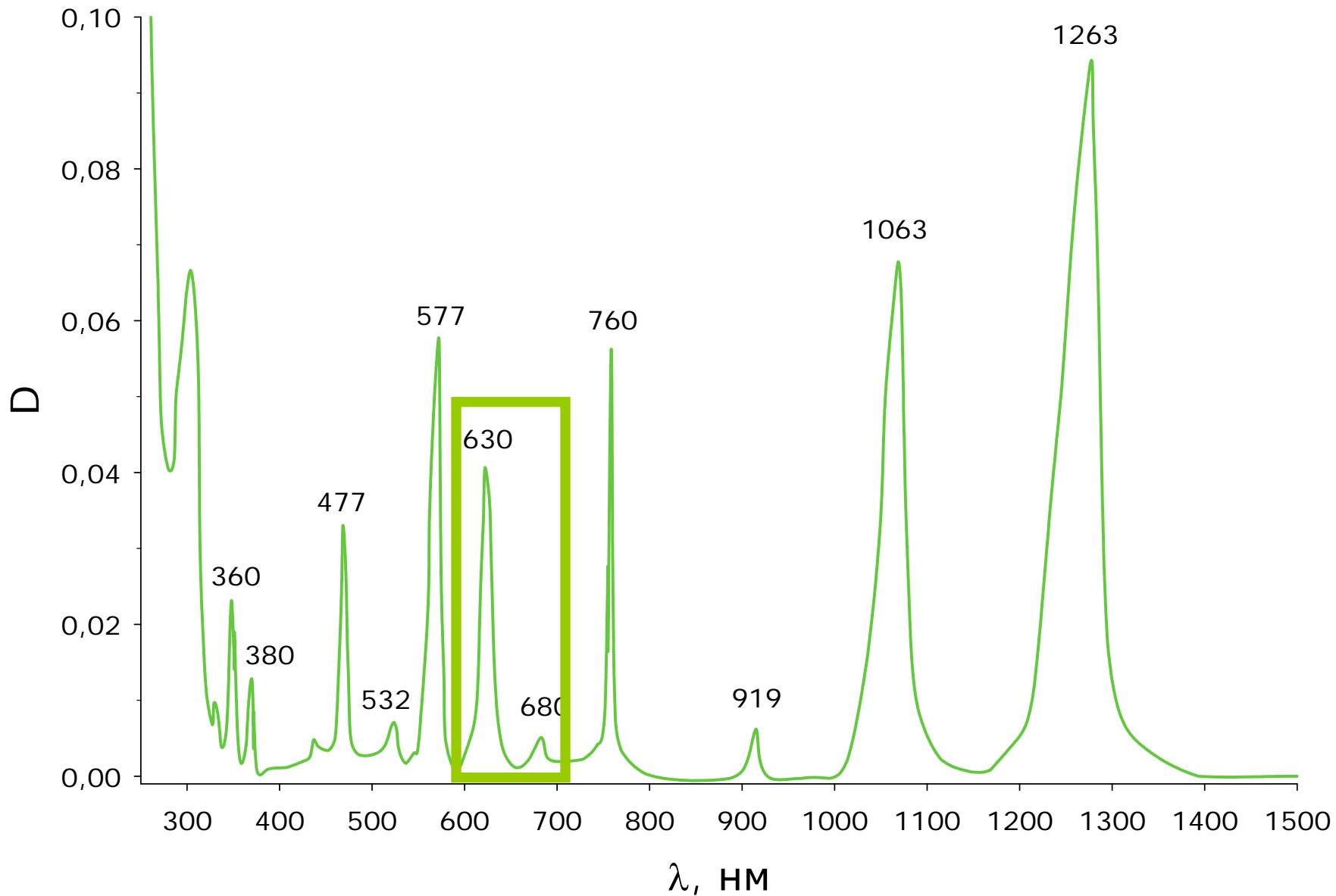
$\lambda_{\max} = 577$  нм, (572-582 нм)

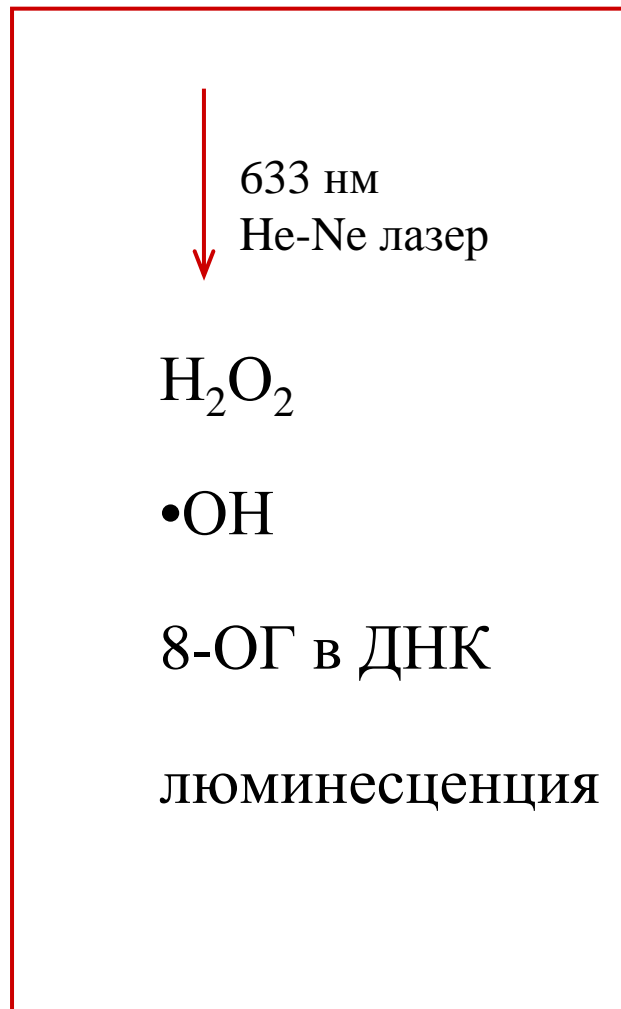
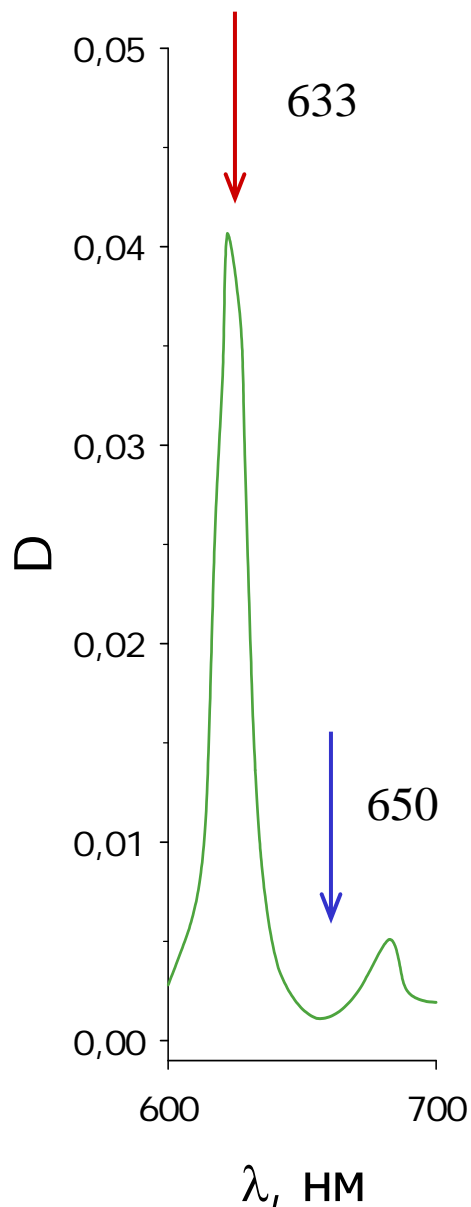
$[\text{H}_2\text{O}_2] \gg [\text{H}_2\text{O}_2]$

$\lambda_{\max} = 595$  нм, (590-600 нм)

# Спектр поглощения молекулярного кислорода

*Джагаров и др., 2004 (ЖПС)*



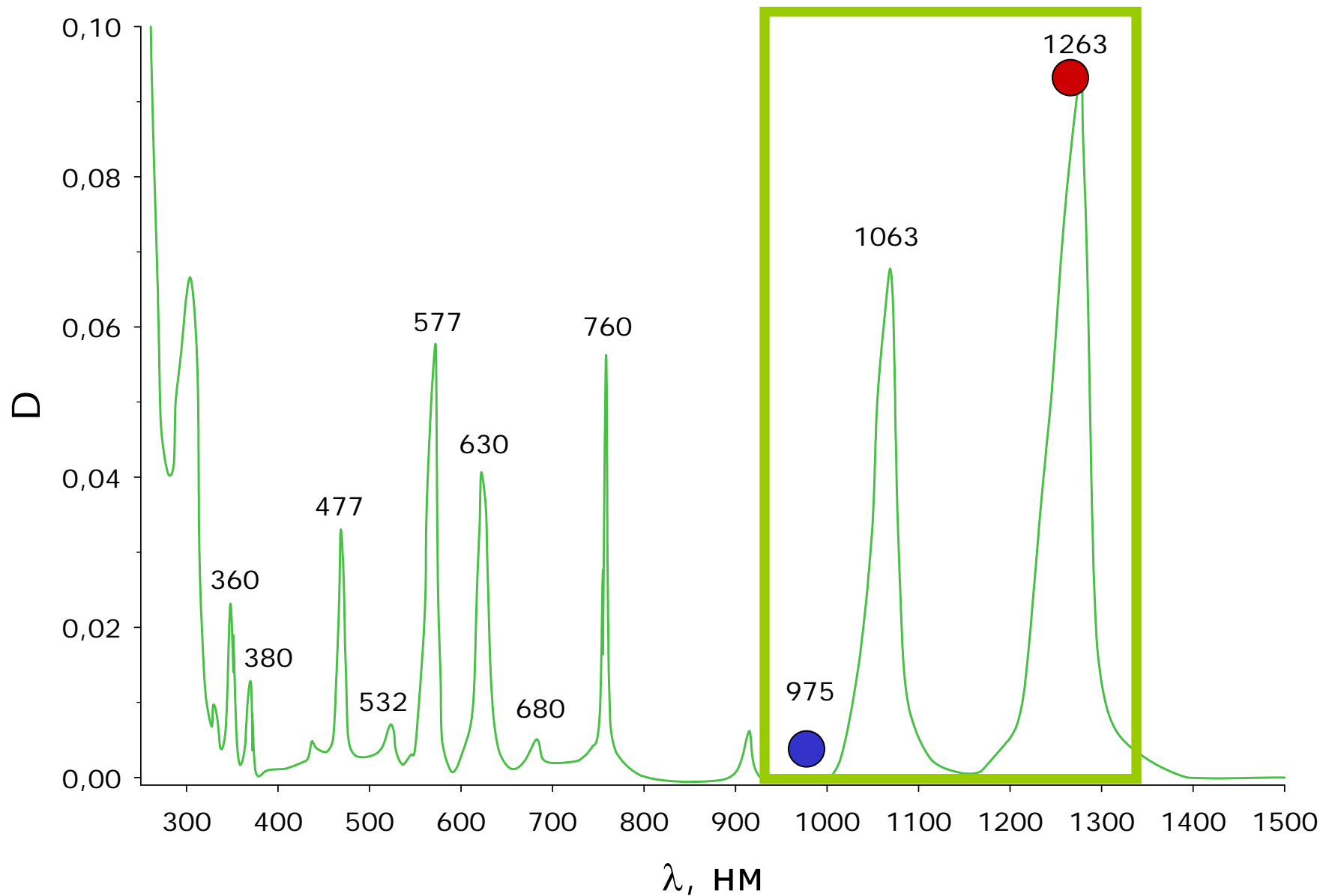


Эффекты лазерных излучений  
с длинами волн 632 и 650 нм

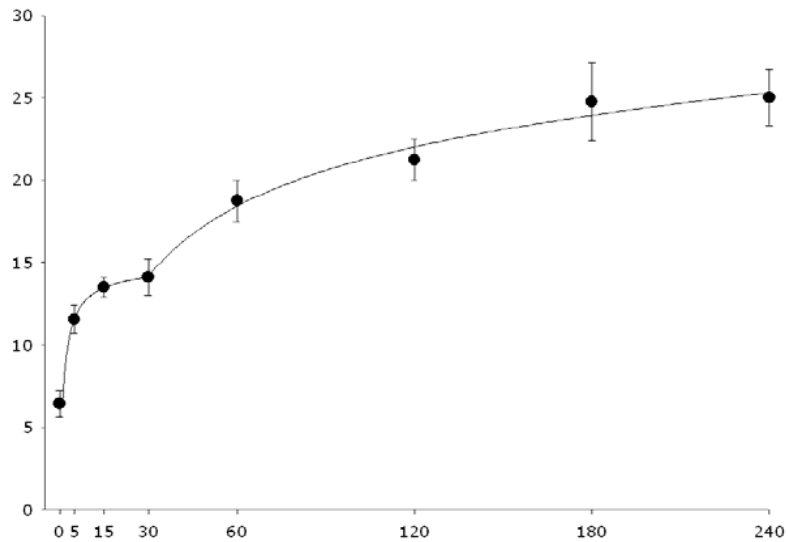


# Спектр поглощения молекулярного кислорода

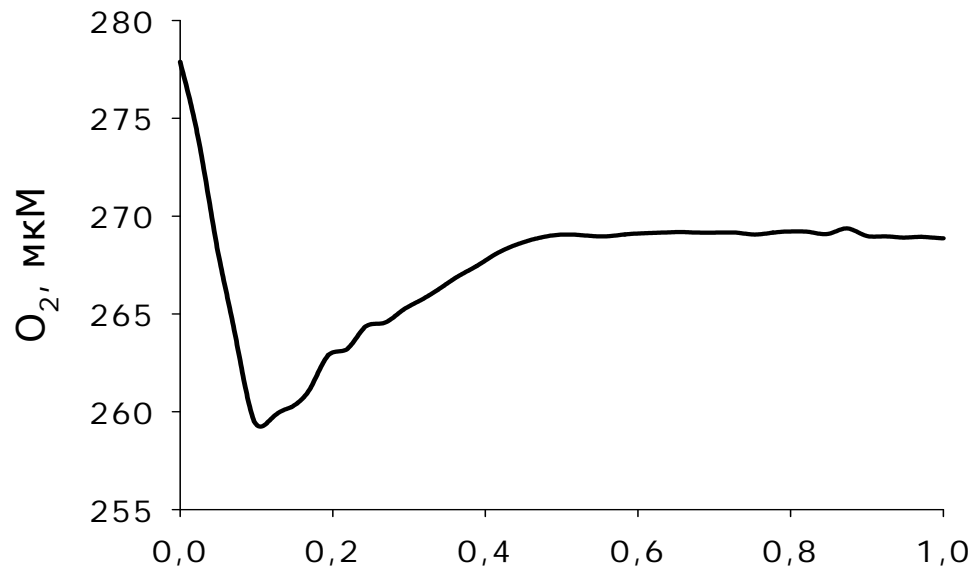
*Джагаров и др., 2001 (ЖПС)*



$[H_2O_2]$ , нМ

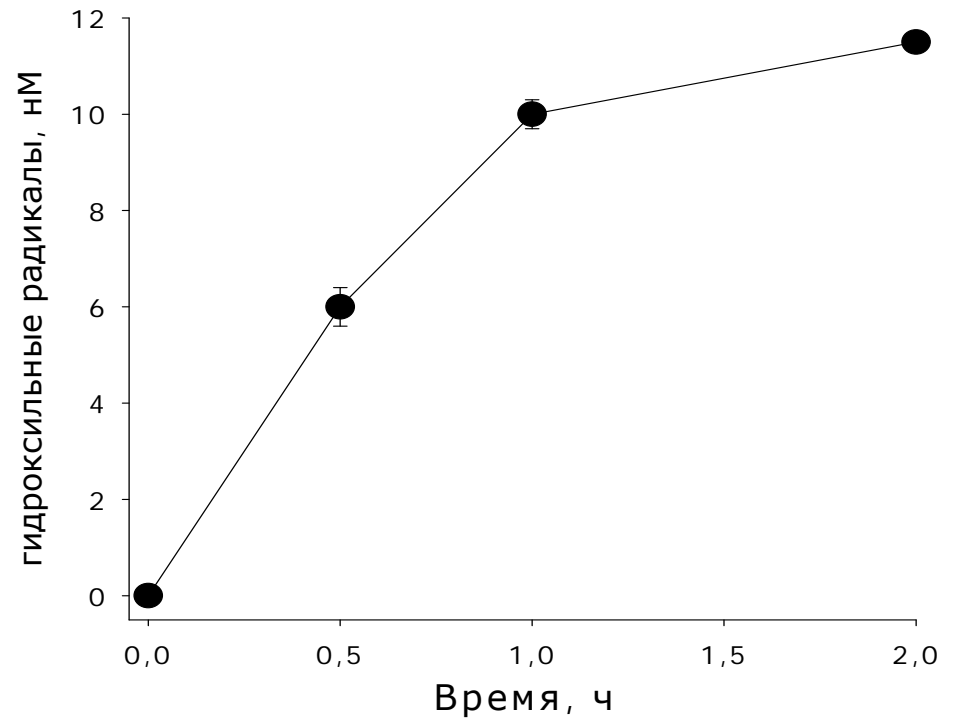


Время, мин



Время, ч

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



Образование АФК при воздействии на воду тепла, видимого света, лазерных излучений (633 и 1263 нм) происходит сходным образом.

Пусковым этапом является переход молекулярного кислорода из триплетного в синглетное состояние.

Во всех случаях показан «кислородный эффект» - зависимость скорости образования АФК от концентрации кислорода в воде

Биологически значимые анионы в существенной мере влияют на образование АФК под действием вышеперечисленных факторов.

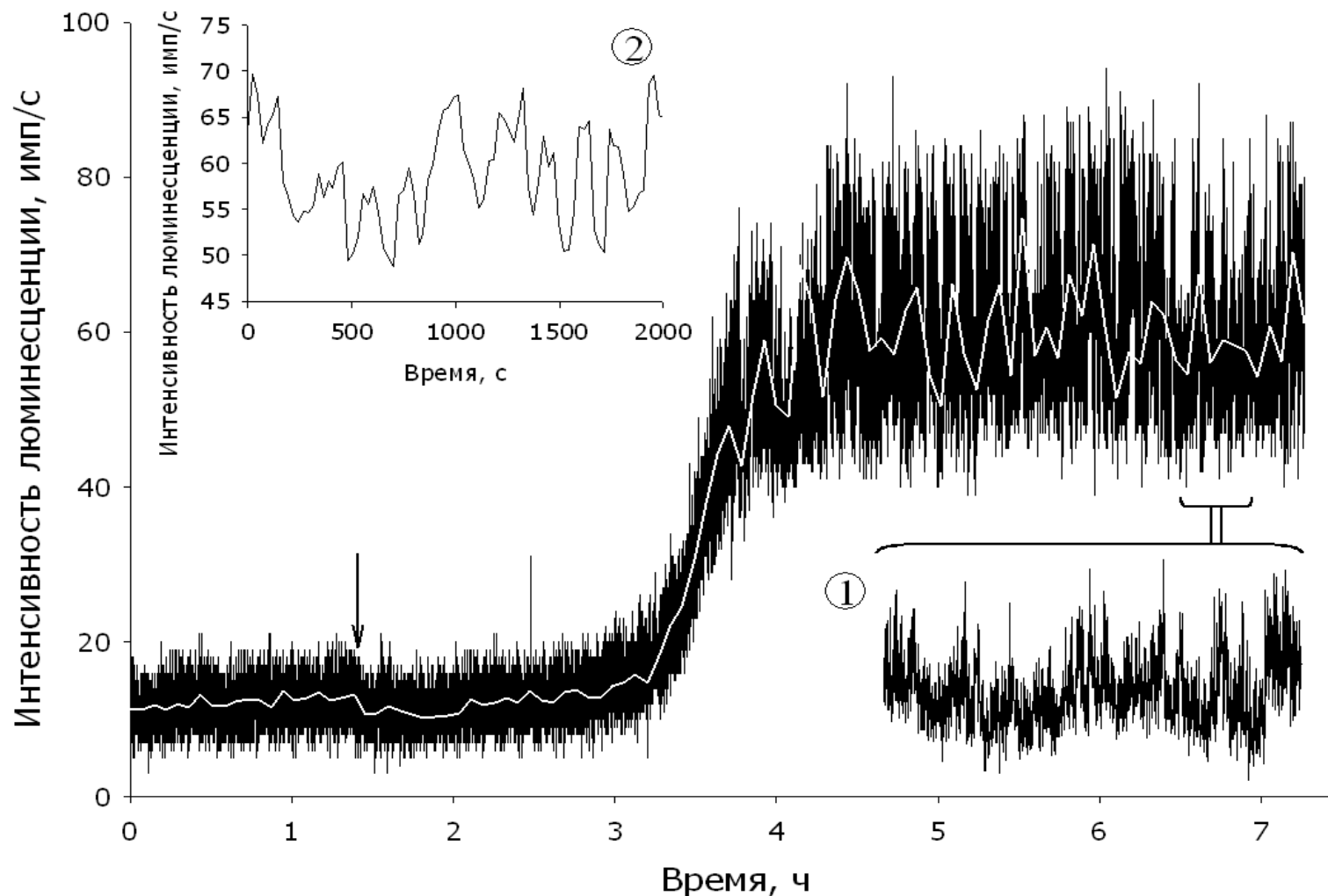
*Под действием импульсного электромагнитного КВЧ излучения так же наблюдаются вышеперечисленные обобщения (Гудкова О.Ю., Гудков С.В., Гапеев А.Б., Брусков В.И., Рубаник А.В., Чемерис Н.К. Исследование механизмов образования активных форм кислорода в водных растворах под действием импульсного электромагнитного излучения крайне высоких частот с большой пиковой мощностью. // Биофизика. 2005. том 50. выпуск 5, с. 773-779).*

Одним из интересных феноменов обнаруженных в работе является развитие люминесценции в воде однократно облученной лазерными излучениями с длинами волн соответствующими максимумам поглощения молекул кислорода. Изначально обнаружено возникновение колебаний люминесценции в воде под действием He-Ne лазера с длиной волны 633 нм, которая соответствует полосе поглощения молекулярного кислорода.

*Брусков В.И., Гудков С.В., Чалкин С.Ф., Смирнова Е.Г., Ягужинский Л.С.  
Автоколебательный процесс люминесценции воды, индуцированный лазерным облучением. // ДАН. 2009. Т. 425, №6, С. 827-829.*

# *Влияние ИК лазерного излучения ( $\lambda=1,26$ мкм, в течение 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.*



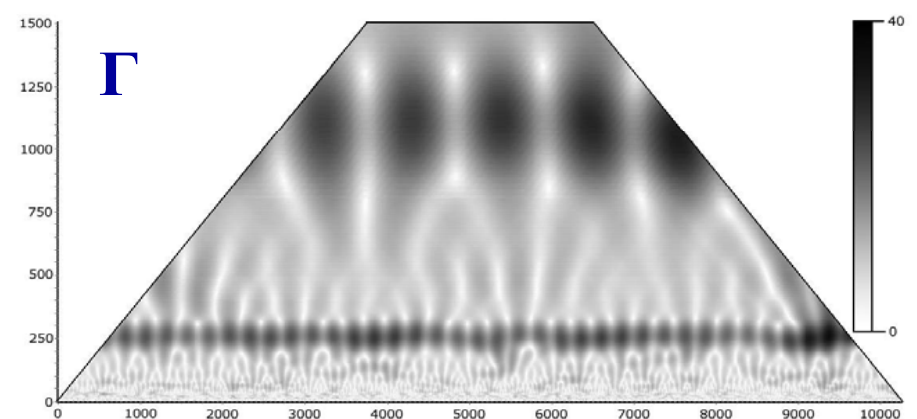
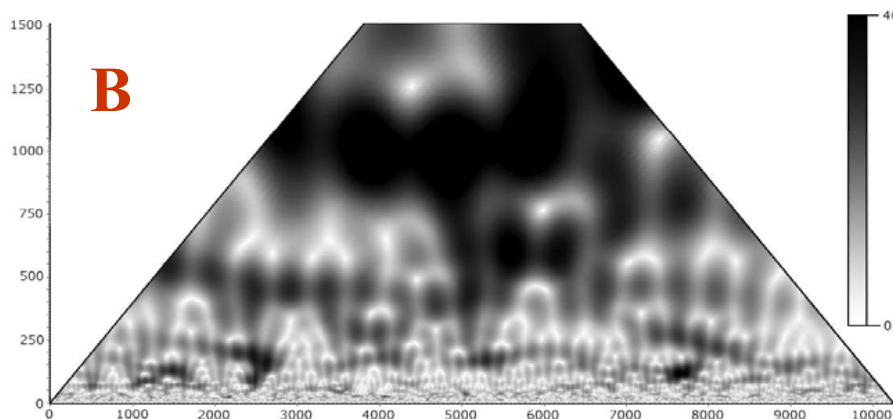
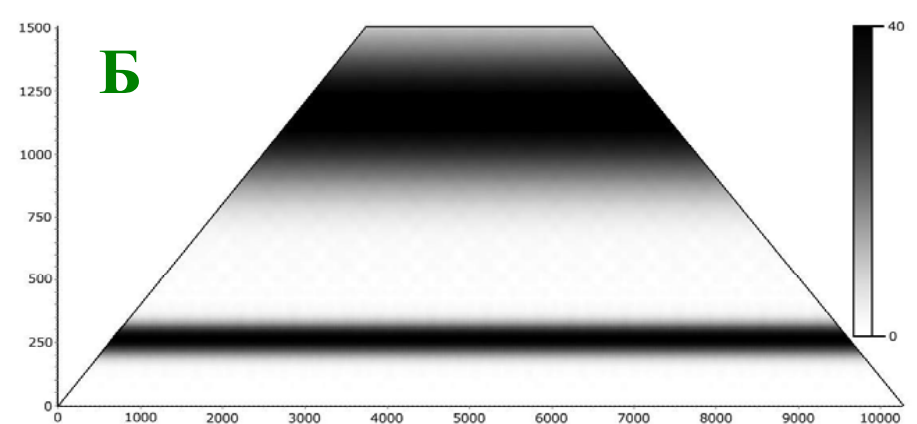
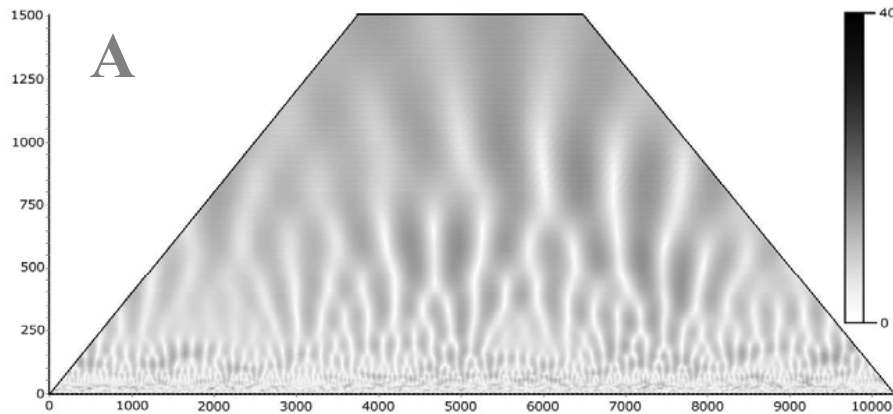
# Анализ временных рядов с помощью вейвлет-преобразования

А – при отсутствии ИК лазерного воздействия

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

В – наблюдаемый результат после воздействия ИК лазера

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



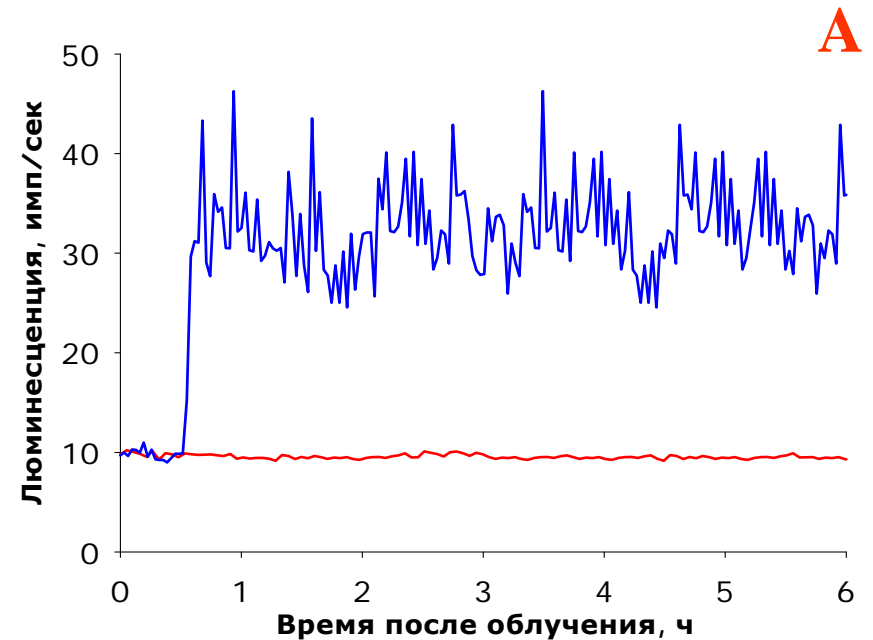
Какова же природа свечения?

**При удалении большей части кислорода  
из воды развитие индуцированной  
лазерным излучением люминесценции  
НЕ НАБЛЮДАЕТСЯ**

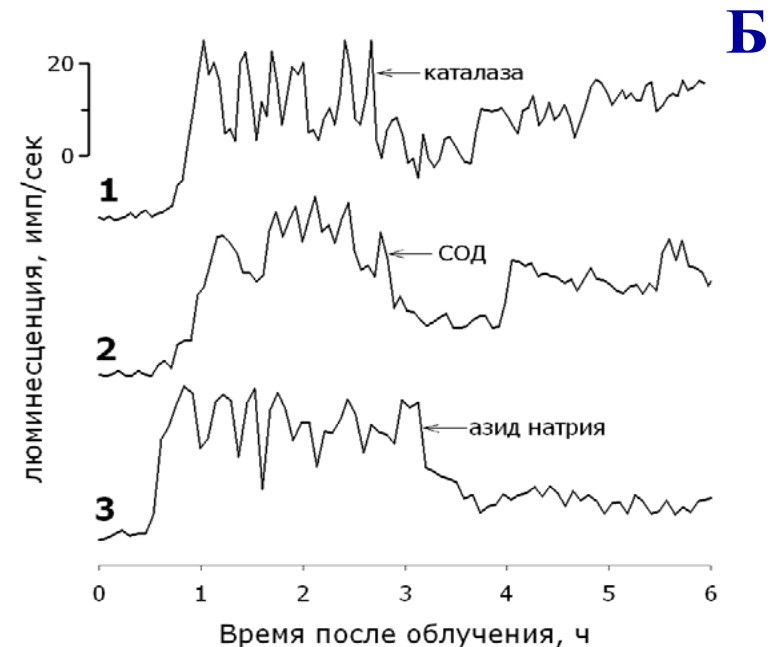
*Gudkov S.V., Bruskov V.I., Astashev M.E., Chernikov A.V., Yaguzhinsky L.S., Zakharov S.D. Oxygen-dependent auto-oscillations of water luminescence triggered by the 1264 nm radiation. // J. Phys. Chem. B. 2011. Vol. 115 (23), P. 7693–7698.*



**А.** Процесс изменения интенсивности люминесценции воды после воздействия лазерного излучения в течение 5 мин. Регистрация через **синий** или **красный** светофильтры



**Б.** 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.



## **Таким образом:**

Обнаружено новое явление – длительные автоколебания люминесценции воды, запускаемые под влиянием кратковременного воздействия низкоинтенсивных лазерных излучений - инфракрасного при 1264 нм и видимого излучения гелий-неонового лазера при 633 нм. Этот процесс происходит после длительного индукционного периода. Излучение люминесценции находится в сине-зеленой области спектра. Данные свидетельствуют о запуске автоколебаний люминесценции в воде синглетным кислородом и тесной связи этого процесса с образованием перекиси водорода.



# ОБОБЩЕНИЕ ВЫШЕ СКАЗАННОГО И РАССУЖДЕНИЯ



При воздействии неионизирующих физических излучений в полосах поглощения молекулярного кислорода на воду наблюдается:

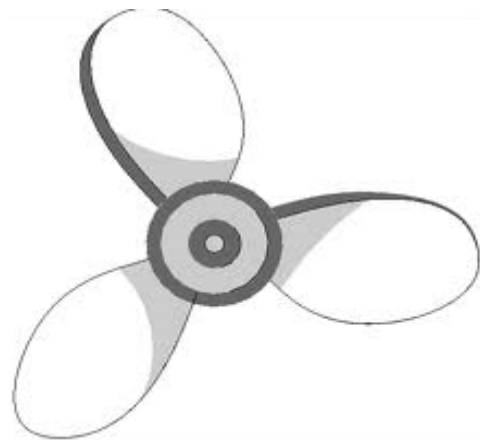
1. Преобразование энергии низкой плотности в энергию высокой плотности.
2. Образование АФК (перекиси водорода, гидроксильных радикалов и др. радикальных продуктов)
3. Изменение концентрации кислорода

Что лежит в основе ЭТИХ явлений?

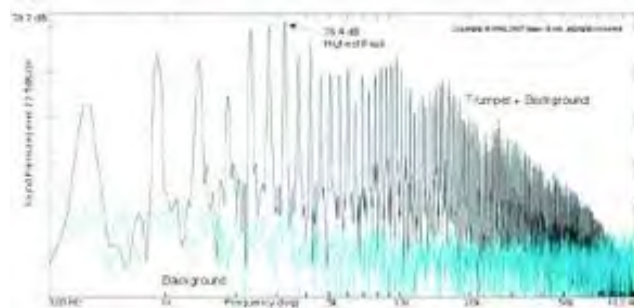
*Кавитация — (от лат. cavitas — пустота) — образование газовых пузырьков в жидкости. Кавитация возникает если давление в какой-либо точке жидкости становится равным давлению насыщенного пара этой жидкости, жидкость в этом месте испаряется и образуется паровой пузырек.*

## КАВИТАЦИЯ

гидродинамическая



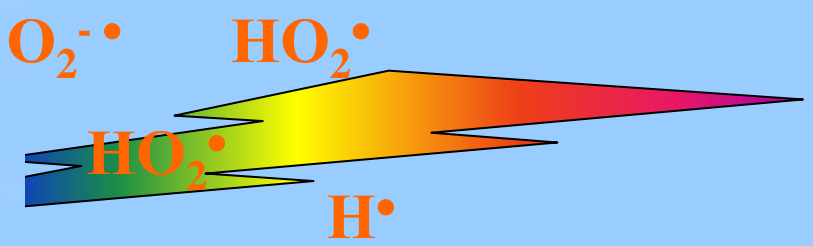
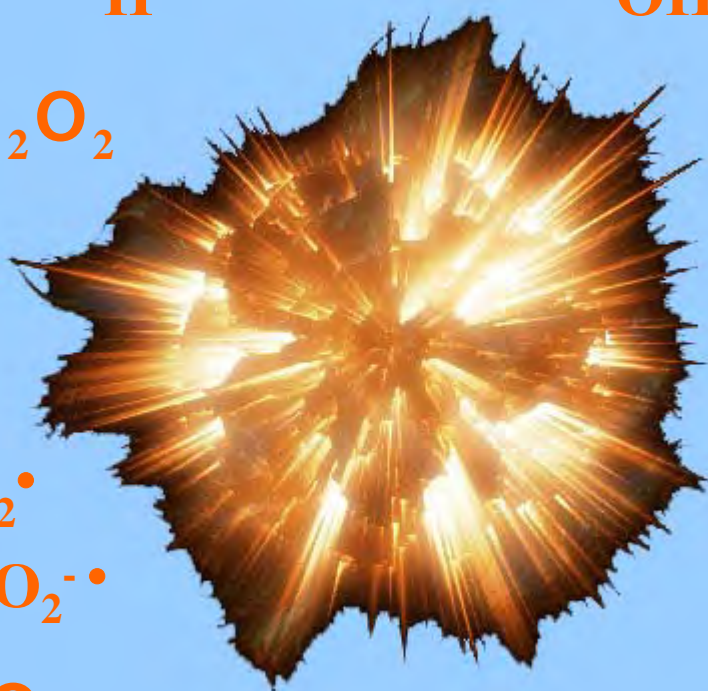
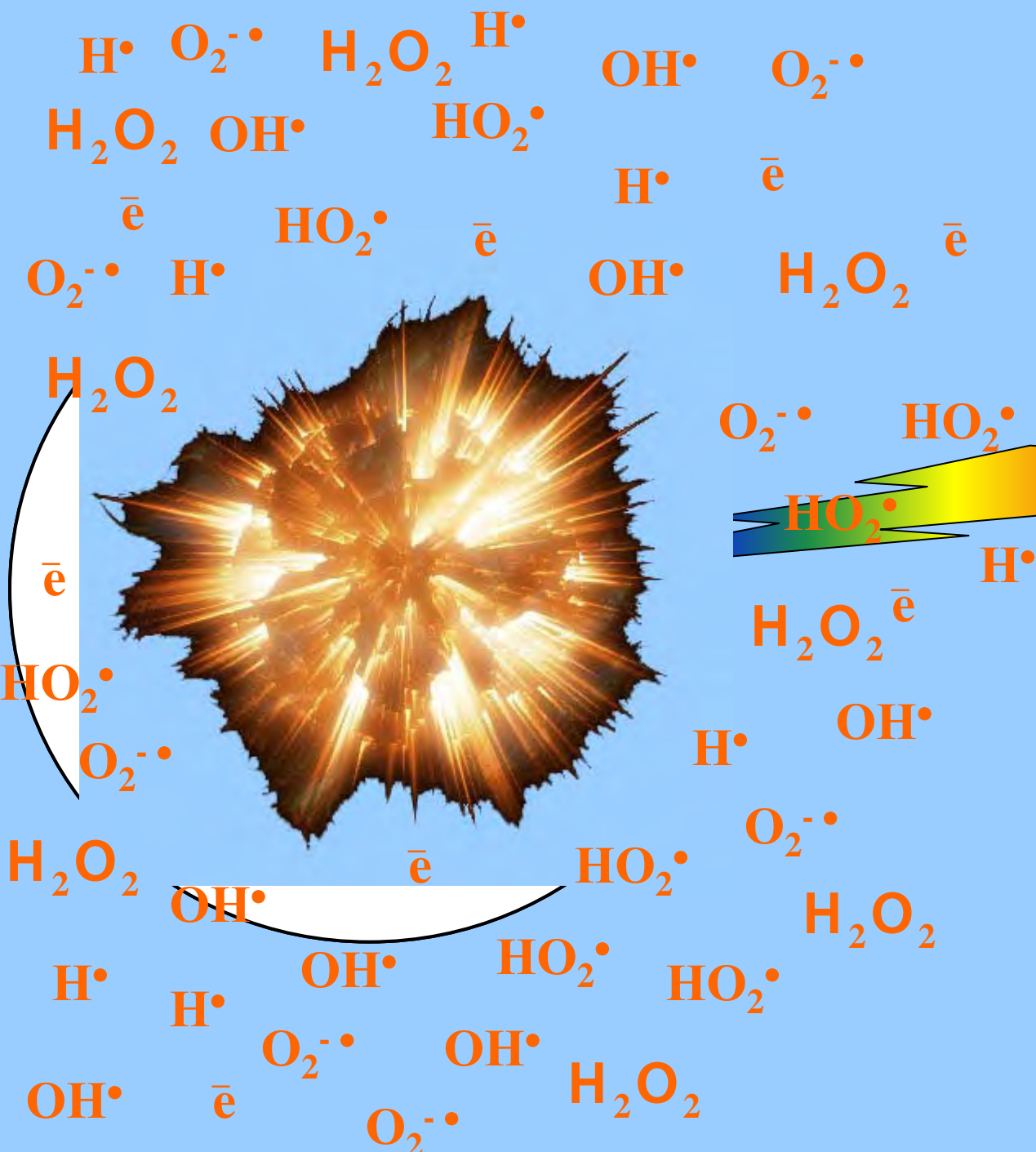
акустическая



тепловая



# КАВИТАЦИЯ



## Обобщение рассуждений:

Вода, насыщенная атмосферными газами, является неравновесной, активной средой, чувствительной к различным слабым физико-химическим воздействиям. Согласно этой концепции, в открытой системе вода-воздух вероятно происходит накопление дополнительной энергии в виде воздушных пузырьков субмикронных размеров. В результате коллапса таких пузырьков энергия может высвободиться в виде стандартных высокоэнергетических процессов. За счет этого может происходить генерация активных форм кислорода. Одной из причин, запускающих кавитационный процесс вероятно, является переход кислорода в синглетное состояние.



**БЛАГОДАРЮ  
ЗА  
ВНИМАНИЕ**