

## АКТИВАЦИЯ ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ СВОЙСТВ АНИОНОВ МОРСКОЙ ВОДЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ТЕПЛА

© 2003 г. В.И. Брусков, А.В. Черников, С.В. Гудков, Ж.К. Масалимов

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, Пущино Московской области*

*E.mail: bruskov\_v2000@mail.ru*

Поступила в редакцию 11.06.03 г.

В системе жизни незаметный атом,  
В тоскливой ежедневной суете  
Не потеряй свою координату,  
Не покоришься жестокому кТ.

*Л.А. Блюменфельд*

С помощью реактива Эллмана (5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислоты)) показано, что в морской воде восстановителями, активируемыми теплом, являются бикарбонат- и хлорид-анионы, а их совместное действие носит сверхаддитивный характер. Сульфат-анионы такие свойства не обнаруживают. Методом усиленной хемилюминесценции в системе люминол-п-иодофенол-пероксидаза исследовано образование перекиси водорода и влияние анионов морской воды на ее продукцию под действием тепла. В растворах NaCl и NaHCO<sub>3</sub> при концентрациях и рН морской воды при нагревании происходит увеличение продукции H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> по сравнению с водой, а сульфат-анионы подавляют образование H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. С помощью кумарин-3-карбоновой кислоты, флуоресцентного детектора гидроксильных радикалов, показано существенное увеличение продукции OH<sup>•</sup> в присутствии хлорид- и бикарбонат-анионов под действием тепла. Оно обусловлено электрон-донорными свойствами этих анионов в реакции разложения образующейся перекиси водорода. Полученные результаты рассмотрены с позиций эквивалентности теплоты и электромагнитного излучения абсолютно черного тела. Предполагается, что в его спектре присутствуют высокоэнергетические кванты, вызывающие диссоциацию анионов с образованием гидратированных электрона и радикалов. Эти радикалы затем рекомбинируют с образованием различных молекулярных продуктов.

*Ключевые слова: вода, восстановительные свойства анионов, гипертермия, гидроксильные радикалы, перекись водорода, гидратированный электрон, тепловое электромагнитное излучение, образование и рекомбинация радикалов.*

Природные воды с физико-химической точки зрения представляют собой сложную нестационарную многокомпонентную окислительно-восстановительную систему [1,2]. Общепринято считать, что природные воды, в том числе и морская вода, являются окислительной средой [3]. Однако редокс-состояние водной среды определяется совокупностью протекающих в ней химических реакций (часть из которых продуцирует вещества восстановительной природы), а потому подвержено изменениям в зависимости от времени суток, сезона, биогенной активности и изменяется вплоть до квазивосстановитель-

ного состояния [3]. Окислительные свойства природных вод определяются в значительной мере растворенным атмосферным кислородом. Одноэлектронное восстановление кислорода приводит к генерации активных форм кислорода (АФК), которые могут оказывать повреждающее действие на биологические молекулы, вследствие чего возникает необходимость защиты от таких повреждений [4]. Ранее было показано, что под действием тепла происходит активация окислительно-восстановительных процессов в воде и водных растворах [5–8]. В чистой воде, насыщенной атмосферными газами, в качестве донора электронов могут выступать гидроксильные ионы [7]. Впервые экспериментально открытие электронодонорных свойств гидроксильных ионов было сделано методом ЭПР Л.А. Блюменфельдом и сотр. почти 40 лет тому назад [9]. Однако это дос-

Сокращения: АФК – активные формы кислорода, ДТНБ – 5,5'-дитиобис(2-нитробензойная кислота), ТНБ – 5-тио-2-нитробензойная кислота, 3-ККК-кумарин-3-карбоновая кислота.

тижение не было по достоинству оценено в то время, подверглось сомнению и оказалось преданным забвению. Впоследствии принципиальная возможность образования электрон-радикальной пары  $\text{OH}^\cdot + e_{\text{aq}}^-$  – из гидроксильного иона была обоснована теоретически в работе А.И. Клосса [10] без упоминания результатов, полученных Л.А. Блюменфельдом и сотр. [9].

Недавно было показано, что под действием тепла в морской воде происходит как генерация гидроксильных радикалов, так и продукция соединений восстановительной природы [8]. Принято считать, что донорами электронов в биологических системах являются преимущественно катионы металлов переменной валентности, такие как железо и медь. В данной работе нами показано, что наряду с гидроксильными ионами [7–10] восстановительными свойствами обладают бикарбонат-анионы и хлорид-анионы, содержащиеся в морской воде, которые могут активироваться под действием тепла, выступая в роли доноров электронов, тогда как сульфат-анионы такие свойства не обнаруживают. Исследовано влияние восстановительных свойств бикарбонат- и хлорид-анионов на продукцию перекиси водорода и гидроксильных радикалов под действием тепла.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Морскую воду готовили растворением морской соли (Tropical Marine, Англия) в насыщенном воздухом в течение суток бидистиллированной воде в концентрации 34 г/л (рН 8,5). Использовали растворы солей NaCl (осч, Bio-Chemica, Германия) и/или  $\text{NaHCO}_3$  (USP Grade, Solvey, Франция),  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  осч, Реахим, Россия, а также *n*-иодофенол (ICN, США), пероксидазу и супероксиддисмутазу (Sigma, США).

В качестве детектора образования в среде доноров электронов использовали реактив Элмана (5,5'-дитиобис(2-нитробензойную кислоту) (ДТНБ)) (Sigma, США) [11,12], восстановленная форма которого – 5-тио-2-нитробензойная кислота (ТНБ) имеет характерный спектр поглощения. Оптическую плотность определяли при 412 нм на спектрофотометре Uvikon 923 В (Kontron Instruments, Италия). Концентрацию ТНБ рассчитывали, используя коэффициент молярного поглощения  $12000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  при 412 нм [12].

Для изучения восстановительных свойств анионов, входящих в состав морской воды, готовили 1 мМ раствор ДТНБ в бидистиллированной воде. В эксперименте его разбавляли бидистиллятом до конечной концентрации 50

мкМ (рН 4) и добавляли NaCl и/или  $\text{NaHCO}_3$  до концентрации 30,97 г/л (0,53 М) и 0,196 г/л (2,33 мМ), соответствующей их содержанию в морской воде [12]. Затем 1 М NaOH доводили рН раствора до 8,5–8,7 и в полипропиленовых флаконах прогревали в ультратермостате U-10 (Германия).

Определение гидроксильных радикалов осуществляли с помощью реакции с кумарин-3-карбоновой кислотой (3-ККК) (Aldrich, США), продукт гидроксирования которой – 7-гидроксикумарин-3-карбоновая кислота – является удобным флуоресцентным зондом для определения образования этих радикалов [8]. Условия проведения эксперимента детально описаны ранее [8]. Определение перекиси водорода осуществляли с помощью усиленной хемиллюминесценции в системе люминол-*n*-иодофенол-пероксидаза, как описано в работе [6]. Свежеперегнанная бидистиллированная вода имела проводимость 1,7 мкСм. В опытах использовали воду, насыщенную атмосферными газами в течение 1 сут. При этом проводимость увеличивалась до 4 мкСм, а значение рН составляло 5,6. Для устранения влияния возможных микропримесей металлов переменной валентности воду и растворы солей дополнительно обрабатывали хелатором Челекс-100 (Bio-Rad, США). Такая обработка не влияла на результаты опытов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Прогревание образцов морской воды, содержащих ДТНБ, в интервале температуры от 40 до 60°C, приводит к увеличению поглощения растворов  $A_{412}$ , обусловленному восстановлением ДТНБ в ТНБ [8]. Кинетика этого процесса описывается уравнением реакции (псевдо)первого порядка, о чем свидетельствует линеаризация кинетических графиков в полулогарифмических координатах. Энергия активации процесса образования вещества-восстановителя при нагревании морской воды составляла 20 ккал/моль. Внесение ДТНБ в морскую воду через различные промежутки времени после нагревания позволило определить время полужизни восстанавливающего агента, составившее около 4 мин. Ионы металлов переменной валентности в составе морской воды находятся в основном в своих высших степенях окисления [14], и поэтому их участие в наблюдаемой реакции в качестве доноров электронов маловероятно [8]. Морская вода содержит значительное количество двуокиси углерода, растворимость которой многократно превышает растворимость азота и кислорода. Растворенный  $\text{CO}_2$

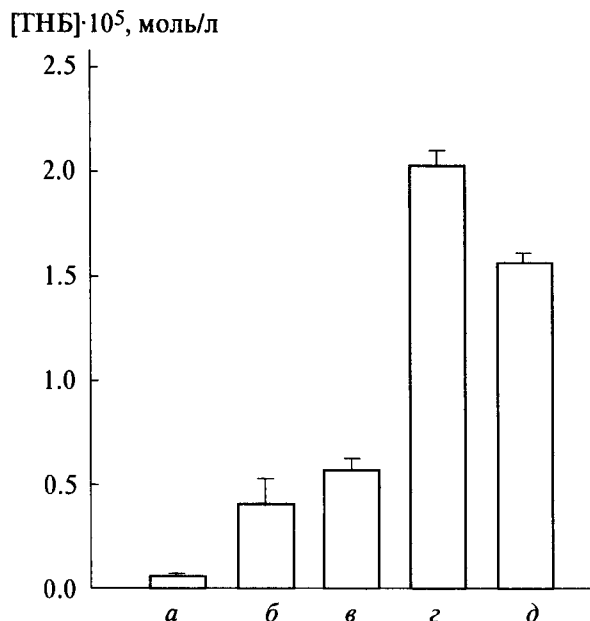


Рис. 1. Влияние анионов  $\text{Cl}^-$  и  $\text{HCO}_3^-$ , присутствующих в 50 мкМ водном растворе ДТНБ, 50 мкМ, рН 8,75, на образование ТНБ по поглощению раствора  $A_{412}$  после нагревания (50°C, 20 мин); а – контроль; б –  $\text{NaCl}$ , 0,53 М; в –  $\text{NaHCO}_3$ , 2,33 мМ; г –  $\text{NaCl}$ , 0,53 М и  $\text{NaHCO}_3$ , 2,33 мМ; д – морская вода, рН 8,7. Приведены средние значения и их стандартные ошибки ( $n = 4-6$ ).

находится в морской воде при ее значениях рН преимущественно в форме бикарбонат-аниона  $\text{HCO}_3^-$  [14]. Полагают, что ион  $\text{HCO}_3^-$  способен к одноэлектронному окислению, проявляя свойства восстановителя, с образованием бикарбонат-анион радикала [15].

Для проверки способности бикарбонат-аниона, а также других неорганических анионов, содержащихся в морской воде, выступать в роли восстановителя, исследовали восстановительные свойства отдельных ее компонентов. Концентрация солей в образцах (0,53 М  $\text{NaCl}$ , 2,33 мМ  $\text{NaHCO}_3$ ) соответствовала их содержанию в морской воде [13], а рН образцов (8,5–8,7) устанавливали равным рН использованной искусственной морской воды. На рис. 1 видно, что присутствие в нагреваемых образцах водного раствора ДТНБ как хлорид-аниона (рис. 1б), так и бикарбонат-аниона (рис. 1в) в указанных концентрациях приводит к восстановлению ДТНБ и увеличению содержания ТНБ по сравнению с контрольными пробами, не содержащими неорганических анионов (рис. 1а). При совместном действии хлорида и бикарбоната натрия (рис. 1г) концентрация образующейся ТНБ превышает таковую, наблюдаемую в морской воде при прогревании при

той же температуре и продолжительности (рис. 1д). Следует отметить, что сочетанное действие  $\text{Cl}^-$  и  $\text{HCO}_3^-$  имеет при этом сверхаддитивный характер. Аналогичные эксперименты, проведенные с сульфат-анионом в концентрации 28,87 мМ, присущей в морской воде [13], дали отрицательный результат.

Ранее нами было показано, что нагревание воды и водных растворов приводит к образованию перекиси водорода [5–7]. Методом усиленной хемилюминесценции в системе люминол-*n*-иодофенол-пероксидаза [5–7] исследовано образование перекиси водорода под действием тепла в морской воде и влияние анионов морской воды на ее продукцию. Кинетика реакции образования  $\text{H}_2\text{O}_2$  в морской воде носит сложный квазиколесательный характер, как и в случае воды [7] и фосфатного буфера [5,6]. На начальном линейном участке она описывается уравнением реакции псевдопервого порядка. На этом участке при температурах 40+65°C значение константы скорости меняется от  $1,42 \cdot 10^{-8}$  (40°C) до  $1,96 \cdot 10^{-7}$  (65°C). Энергия активации этого процесса, определенная с помощью графика Аррениуса, равна 21 ккал/моль (рис. 2). Время полужизни  $\text{H}_2\text{O}_2$  при концентрации  $10^{-7}$  М и температуре 25°C в морской воде равно примерно двум часам. Добавление супероксид-дисмутазы [5–7] после прогрева в течение четырех часов при температуре 50°C приводит к увеличению содержания  $\text{H}_2\text{O}_2$  в 1,5 раза, что свидетельствует об образовании супероксид-радикалов при нагревании морской воды. При инкубации прогретой морской воды с каталазой, как и следовало ожидать, содержание  $\text{H}_2\text{O}_2$  уменьшается до фоновых значений.

Результаты исследования влияния отдельных солей на образование  $\text{H}_2\text{O}_2$  представлены на рис. 3. Как 0,5 М  $\text{NaCl}$  (рис. 3б), так и 2,33 мМ  $\text{NaHCO}_3$  (рис. 3в) при рН 8,5 приводят к увеличению продукции перекиси водорода при нагревании в стандартных условиях в 2,5–2,6 раза, тогда как их сочетанное действие (рис. 3г) приводит к сверхаддитивному усилению эффекта до величины, составляющей 80% от образования  $\text{H}_2\text{O}_2$  в морской воде (рис. 3д). Сульфат-анионы в концентрации 28,87 мМ, характерной для морской воды, и соответствующей ей рН, существенно снижали стандартный уровень образования перекиси в воде вплоть до нулевых значений.

Известно, что перекись водорода может восстанавливаться с образованием гидроксильных радикалов в присутствии ионов переменной валентности, таких как  $\text{Fe(II)}$  и  $\text{Cu(I)}$ , являющихся

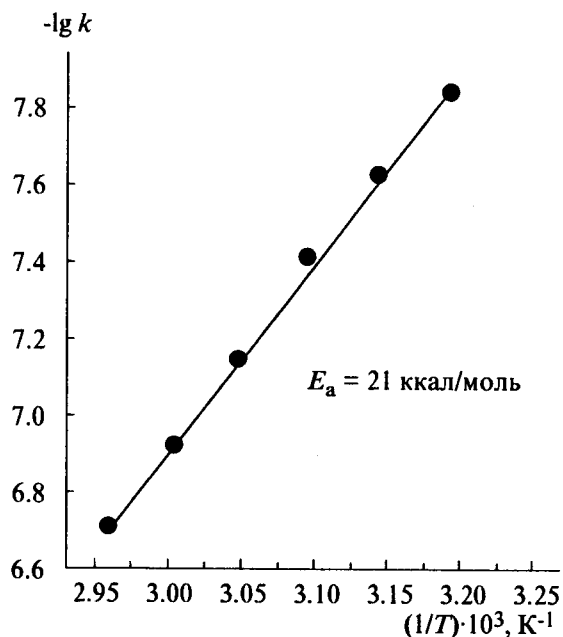


Рис. 2. График Аррениуса (зависимость  $-\lg k$  от обратной температуры) для определения энергии активации начального процесса образования  $H_2O_2$  в морской воде при нагревании ( $k$  – константа скорости реакции псевдопервого порядка,  $s^{-1}$ ,  $T$  – температура, К).

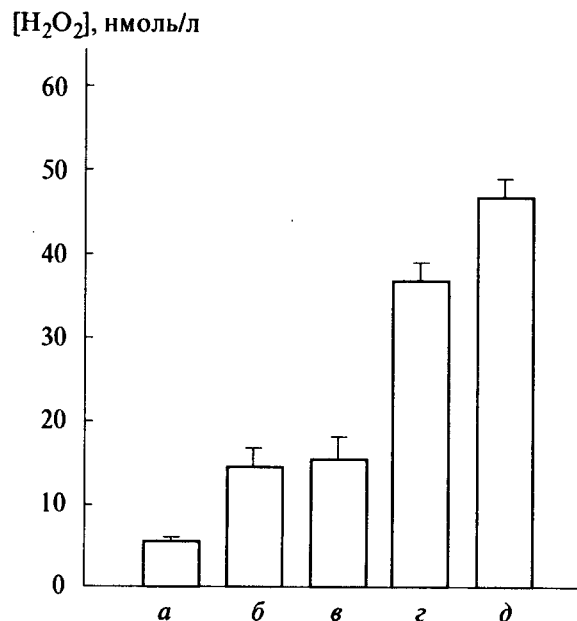
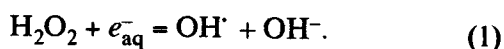


Рис. 3. Образование  $H_2O_2$  под действием тепла при нагревании растворов в течение трех часов при  $40^\circ C$ , pH воды и растворов 8,5; а – вода ( $n = 8$ ); б – NaCl, 0,53 М ( $n = 2$ ); в –  $NaHCO_3$ , 2,33 мМ ( $n = 2$ ); г – NaCl, 0,53 М и  $NaHCO_3$ , 2,33 мМ ( $n = 3$ ); д – морская вода ( $n = 5$ ).

донорами электронов, в реакции Фентона. Принципиально возможно образование гидроксильных радикалов и при восстановлении перекиси водорода в результате электрон-донорных свойств бикарбонат- и хлорид-анионов в реакции:



Для исследования такой возможности была использована высокоэффективная ловушка ОН-радикалов кумарин-3-карбоновая кислота, продукт гидроксирования которой – 7-гидроксикумарин-3-карбоновая кислота – является специфичным флуоресцентным зондом для определения этих радикалов [8]. Исследуемые образцы содержали 2,33 мМ бикарбоната натрия и 0,53 М NaCl. Результаты по кинетике реакции в воде и растворе хлорид- и бикарбонат-анионов в концентрациях и pH, характерных для морской воды, представлены на рис. 4. Из рис. 4 видно, что происходит существенное (в 1,75 раза) увеличение продукции гидроксильных радикалов в присутствии хлорид- и бикарбонат-анионов. Добавление экзогенной  $H_2O_2$  в концентрации 1 мкМ к раствору 3-ККК, содержащему NaCl и  $NaHCO_3$  в соответствующих морской воде концентрациях и pH, при нагревании при  $80^\circ C$  в течение до 1 часа приводит к

дополнительному увеличению скорости тепловой генерации ОН-радикалов в среднем в 1,5 раза.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, помимо гидроксильных ионов [7–10], анионы  $Cl^-$  и  $HCO_3^-$ , активируясь при нагревании раствора, проявляют свойства восстановителя, усиливая при совместном действии суммарный эффект, который по величине превышает эффект, характерный для морской воды. Под действием тепла активируются восстановительные свойства анионов морской воды  $HCO_3^-$  и  $Cl^-$ , что приводит к увеличению образования перекиси водорода и гидроксильных радикалов. Восстановительные свойства бикарбонат-аниона в ~250 раз выше, чем хлорид-аниона, о чем свидетельствуют величина эффекта и соотношение концентраций хлорид- и бикарбонат-анионов.

Следует подчеркнуть неравновесный характер исследуемых процессов. В период нагрева поступает дополнительная энергия, а затем, при возвращении системы к исходной температуре, система релаксирует к исходному энергетическому состоянию. Как было показано в работе [8], восстановительные свойства анионов бикарбоната и хлора, активируемые тепловым воз-

[7-ОН-3-ККК], мкмоль/л

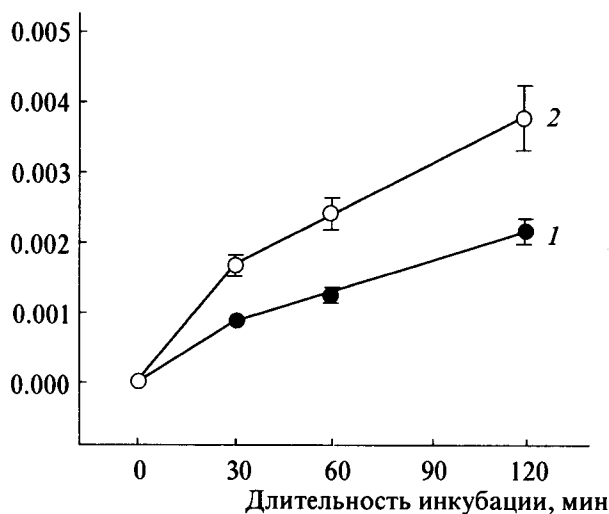


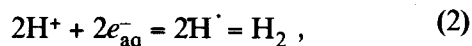
Рис. 4. Кинетика реакции образования гидроксильных радикалов в 0,5 мМ растворе кумарин-3-карбоновой кислоты (рН 8,7) в бидистиллированной воде (1) и в солевом растворе NaCl, 0,53 М и NaHCO<sub>3</sub>, 2,33 мМ (2) при нагревании при 80°C. Указаны средние значения и их стандартные ошибки ( $n = 3$ ).

действием, носят достаточно кратковременный характер со временем полужизни около 4 мин.

Восстановительная «активность» анионов морской воды при нагреве значительна и составляет от 5 до 20 мкМ (рис. 1), что свидетельствует о том, что эти эффекты не могут быть обусловлены примесями металлов переменной валентности в используемой нами воде и растворах солей. Кроме того, дополнительная обработка хелатором Челекс-100 воды и растворов солей не влияла на результаты опытов.

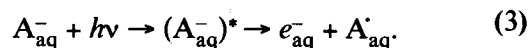
Полученные ранее данные по тепловой генерации перекиси водорода в бидистиллированной воде свидетельствуют об образовании из гидроксильных ионов пары из гидроксильного радикала и гидратированного электрона  $\text{OH}^- \rightarrow \text{OH}^\cdot + e_{\text{aq}}^-$  и двух взаимосвязанных путей образования H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> под действием тепла [7]. Первый состоит в рекомбинации ОН-радикалов. Этой реакции способствует присутствие в воде акцепторов электронов, одним из которых обычно является растворенный в воде кислород. Необходимым этапом для образования H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> под действием тепла является переход кислорода в синглетное состояние [5–7]. В результате присоединения электрона к синглетному кислороду образуются супероксид-анион-радикалы, дисмутация которых приводит к образованию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. При этом кинетика реакции

образования H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> носит квазиколлебательный характер [5,7]. Кроме синглетного кислорода, другим наиболее существенным акцептором гидратированного электрона в воде и водных растворах являются ионы водорода H<sup>+</sup> в реакции:

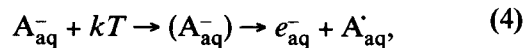


с образованием молекулы водорода.

Известно, что под действием квантов света ряд анионов в полярных растворах переходят в возбужденное состояние и затем диссоциируют с образованием сольватированного электрона и анион-радикалов [16]. Ранее установлено, что фотовозбужденное (A<sub>aq</sub><sup>-</sup>)<sup>\*</sup> состояние анионов (A<sub>aq</sub><sup>-</sup>) может приводить к активируемому теплом процессу диссоциации с образованием электрон-радикальной пары – гидратированного электрона (e<sub>aq</sub><sup>-</sup>) и окисленного (радикального) продукта (A<sub>aq</sub><sup>·</sup>) [16]:



Показано, что целый ряд анионов, таких как Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, OH<sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, продуцируют гидратированный электрон в процессе (3) при их флеш-фотолизе [17,18]. Поскольку вещество при данной температуре обладает тепловым электромагнитным излучением, аналогичным абсолютно черному телу, во всем спектре электромагнитных частот [19,20], 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:  $\text{A}_{\text{aq}}^\cdot + \text{A}_{\text{aq}}^\cdot = \text{A}_2$ , или если присутствует ряд различных радикалов, то с дополнительным образованием их перекрестных форм. Процесс образования электрон-радикальной пары (4) под влиянием теплового воздействия был установлен ранее для гидроксильных ионов [8].

Таким образом, анионы могут выступать в роли восстановителя за счет реакции образования электрон-радикальных пар и последующей рекомбинации радикалов. Причем перекрестная рекомбинация радикалов от разных анионов может быть причиной синергического

сверхаддитивного эффекта, который наблюдается в наших экспериментах.

Наши результаты позволяют полагать, что образование радикальных продуктов под действием тепла носит универсальный характер и на качественном уровне сходно с действием ультрафиолетового и ионизирующего излучений. Сходство действия тепла и ионизирующего излучения на воду, включая наличие «кислородного эффекта» в обоих случаях, показано в работе [7]. Был сделан вывод, что термолиз воды под действием тепла приводит к образованию тех же радикалов и молекулярных продуктов, что и радиолит под действием ионизирующего излучения. Гипертермия, с учетом ее особенностей, может в ряде случаев рассматриваться как модель окислительного стресса, аналогичного действию ионизирующей радиации. Следует отметить, что именно термолизом воды обусловлено образование ионов  $\text{OH}^-$  и  $\text{H}^+$ , сопровождающееся разрывом ковалентной связи в молекуле воды, о чем свидетельствует сильная температурная зависимость этого процесса [21]. Увеличение диссоциации воды на ионы с увеличением температуры должно способствовать протеканию реакции (4).

Термолиз воды с физических позиций может быть объяснен следующим образом. Тепловое электромагнитное излучение, наряду с усредненными энергиями порядка  $kT$ , содержит малые количества высокоэнергетических квантов, намного превышающих величины  $kT$ . Поскольку таких квантов мало, эти высокоэнергетические процессы, способные приводить к разрыву ковалентных связей, происходят медленно. Кроме того, необходимы весьма чувствительные методы для обнаружения продуктов таких реакций.

Следует отметить твердо установленное существование физико-химического механизма трансформации энергий слабых воздействий в высокоэнергетические процессы с помощью газовых пузырьков атмосферного воздуха в воде при сонолюминесценции [22–24]. В составе природных вод содержится значительное количество микропузырьков растворенного воздуха диаметром порядка 1–30 мкм [2], что обусловлено гидрофобностью растворенных газов в такой полярной жидкости, как вода.

При сонолюминесценции в газовых пузырьках растворенного в воде воздуха происходит концентрирование энергии ультразвукового поля на несколько порядков величины и преобразование ее в видимое или УФ-излучение. При этом газовые пузырьки являются сенсорами и

преобразователями – усилителями и трансформаторами – относительно слабой энергии УЗ-поля в гигантские флуктуации – «сгустки» энергии электромагнитного поля. Нестабильность воздушных пузырьков проявляется в первоначальном расширении, а затем быстром сжатии взрывного характера – «коллапсе», сопровождающемся резким повышением температуры (до  $\sim 10^5$  К) и давления внутри пузырька. При этом, помимо того, что газовый пузырек излучает фотоны, он является микрореактором, в котором образуются радикальные продукты, такие как гидроксильные радикалы, и происходят химические процессы, сопровождающиеся образованием нитрит-ионов [24]. Более того, в определенных условиях схлопывание газового пузырька приводит к такому локальному повышению температуры, что становится возможным осуществление реакции термоядерного синтеза [25].

Можно полагать, что небольшая часть естественных газовых микропузырьков в растворах способна к аналогичному схлопыванию под действием тепла, что приводит к образованию тех же радикальных и молекулярных продуктов в растворе, которые возникают под действием ионизирующего излучения [7]. Ранее было обнаружено механохимически активируемое разложение воды под действием звука с образованием перекиси водорода в отсутствие кавитации и при прокачивании воды через фильтр и тонкие капилляры [26]. Обнаружено, что электромагнитное излучение КВЧ-диапазона вызывает образование перекиси водорода в 50 мМ карбонатном буфере [27]. Установлено, что для этого процесса характерно наличие кислородного эффекта – участие растворенного кислорода воздуха в образовании  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Показано, что в присутствии простых катализаторов из окислов металлов происходит расщепление молекул воды с образованием кислорода и водорода при освещении видимым светом и даже в темноте при энергичном перемешивании [28].

В работе [29] показано, что  $\text{OH}$ -радикалы, взаимодействуя с карбонат-ионом, продуцируют карбонат-радикалы. Карбонат-радикалы, в свою очередь, рекомбинируют с излучением квантов света. Об этом свидетельствует квадратичная зависимость интенсивности этого излучения от концентрации карбонат-ионов [29]. Можно полагать, что продуктами рекомбинации (би)карбонат-радикалов являются пероксикарбонаты [30]. Ранее в работе [31] было показано, что бикарбонат может служить донором электронов при окислении воды в фотосистеме II водно-окисляющего комплекса хлоропластов.

Предполагается также, что бикарбонат является более предпочтительным, по сравнению с водой, восстановителем и неотъемлемым компонентом в процессе эволюции кислородного фотосинтеза в архейский период [32].

В случае хлорид-радикалов продуктами комбинации должен быть молекулярный хлор, а продуктом перекрестной с ОН-радикалами реакции – гипохлорит. Возможность реакции окисления хлорид-иона перекисью водорода с образованием гипохлорита в воде, насыщенной аргоном, показана недавно в работе [33]. Электрохимическое окисление хлорид-ионов в растворах NaCl с образованием молекулярного хлора, хлорноватистой кислоты и гипохлорита натрия показано в работе А.И. Мирошниковой [34]. При образовании радикальных продуктов из хлорид- и бикарбонат-анионов под действием тепла необходимо также учитывать возможность их реакции с супероксид-радикалами в результате присоединения гидратированного электрона к синглетному кислороду [5–7].

Известно, что хлорид-ионы в окисгенированных водных растворах защищают ДНК от деструктивного воздействия ионизирующей радиации [35]. Эти данные согласуются с недавно опубликованными результатами [6], показавшими, что в присутствии NaCl в растворе уменьшается окислительное повреждение гуанина в ДНК активными формами кислорода при нагревании. Установлено также, что углекислый газ при парциальном давлении, близком к напряжению в крови теплокровных животных, существенно ингибирует генерацию супероксид-анион-радикалов клетками теплокровных, холоднокровных и одноклеточных организмов [36]. Из других ранее исследованных анионов следует отметить фосфат. В работе [37] показана возможность участия неорганического фосфата как донора электронов в первичных реакциях фотосинтеза.

Тепловые процессы, связанные с образованием радикальных продуктов, протекающие в морской воде и в плазме крови теплокровных животных, могут быть аналогичны ввиду значительной близости их химического состава. Поэтому возможные биологические последствия тепловой генерации активных форм кислорода и влияние различных анионов на генерацию гидроксильных радикалов и перекиси водорода могут быть существенны и многообразны. Прежде всего это процессы, обусловленные внутриклеточным окислительным стрессом – повышенной продукцией АФК, связанные со многими патофизиологическими последствиями

для организма [4], в том числе с процессом старения [38]. Процесс тепловой генерации АФК является новым веским доводом в пользу свободно-радикальной теории старения [6,38], поскольку у пойкилотермных организмов температура окружающей среды является наиболее существенным фактором, определяющим продолжительность жизни. Биорегуляторная, биоэнергетическая и информационная роль АФК в ряде биологических процессов, возникновении и эволюции жизни на Земле, рассмотрена В. Воейковым [39]. Гипертермия вызывает повреждения ДНК и других клеточных структур и процессов, которые опосредуются активными формами кислорода [6,40] и, в частности, гидроксильными радикалами [41].

Представляется актуальным дальнейшее исследование восстановительных свойств анионов, содержащихся в морской воде, биологических жидкостях и внутриклеточном пространстве в связи с их возможной ролью в различных биологически значимых окислительно-восстановительных процессах. На этом пути, возможно, удастся прийти к научно обоснованному пониманию лечебно-оздоровительного действия природных минеральных вод. Полученные в данной работе результаты предсказывают появление при действии тепла в солевых растворах таких молекулярных продуктов, как хлора, гипохлорита, пероксикарбоната, молекул водорода и ряда других. Экспериментальное подтверждение их образования будет предметом дальнейших исследований.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Эрнестова Л.С., Скурлатов Ю.И. // Журн. физ. химии. 1995. Т. 69, № 7. С. 1159–1166.
2. Бондаренко Н.Ф., Гак Е.З. Электромагнитные явления в природных водах. Л.: Гидрометеоздат, 1984. 151 с.
3. Штамм Е.В., Пурмаль А.П., Скурлатов Ю.И. // Успехи химии. 1991. Т. 60, вып. 11. С. 2373–2411.
4. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс. М.: МАИК Наука/Интерпериодика, 2001. 343 с.
5. Брусков В.И., Масалимов Ж.К., Черников А.В. // Докл. РАН. 2001. Т. 381, № 2. С. 262–264.
6. Bruskov V.I., Malakhova L.V., Masalimov Zh.K., Chernikov A.V. // Nucleic Acids Res. 2002. V. 30. P. 1354–1363.
7. Брусков В.И., Масалимов Ж.К., Черников А.В. // Докл. РАН. 2002. Т. 384, № 6. С. 821–824.
8. Черников А.В., Брусков В.И. // Биофизика. 2002. Т. 47, вып. 5. С. 773–781.
9. Фомин Г.В., Блюменфельд Л.А., Сухоруков Б.И. // Докл. АН СССР. 1964. Т. 157, № 5. С. 1199–1201.

10. Клосс А.И. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 303, № 6. С. 1403–1407.
11. Boyne A.F., Ellman G.L. // Anal. Biochem. 1972. V. 46. P. 639–653.
12. Clancy R.M., Miyazaki Y., Cannon P.J. // Anal. Biochem. 1990. V. 191. P. 138–143.
13. Хорн Р. Морская химия (структура воды и химия гидросферы). М.: Мир, 1972. 400 с.
14. Goss S.P., Singh R.J., Kalyanaraman B. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 28233–28239.
15. Shafirovich V., Dourandin A., Huang W., Geacintov N.E. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 24621–24626.
16. Shirom M., Stein G. // J. Chem. Phys. 1971. V. 55. P. 3372–3378.
17. Swenson G.W., Zwicker E.F., Grossweiner L.I. // Science. 1963. V. 141. P. 1042–1043.
18. Metheson M.S., Mulac W.A., Rabani J. // J. Phys. Chem. 1963. V. 67. P. 2613–2617.
19. Яворский Б.М., Детлаф А.А. Справочник по физике. Гл. 5. Тепловое излучение. М.: ГИФМЛ, 1990. С. 419–427.
20. Dunbar R.C., McMahon T.B. // Science. 1998. V. 279. P. 194–197.
21. Справочник химика Т. 3. М.Л.: Химия, 1965. С. 109.
22. Маргулис М.А. // Успехи физ. наук. 2000. Т. 170, № 3. С. 263–287.
23. Липсон А.Г., Кузнецов В.А. // Журн. физ. химии. 2002. Т. 76, № 1. С. 116–122.
24. Didenko Yu.T., Suslick K.S. // Nature. 2002. V. 418. P. 394–397.
25. Taleyarkhan R.P., West C.D., Cho J.S., Lahey R.T.Jr., Nigmatulin R.I., Block R.C. // Science. 2002. V. 295. P. 1868–1873.
26. Домрачев Г.А., Родыгин Ю.Л., Селивановский Д.А. // Докл. РАН. 1993. Т. 329, № 2. С. 186–188.
27. Поцелуева М.М., Пустовидко А.В., Евтодиенко Ю.В., Храмов Р.Н., Чайлахян Л.М. // Докл. РАН. 1998. Т. 359, № 3. С. 415–418.
28. Ikeda S., Takata T., Kondo T., Hitoki G., Hara M., Kondo J.N., Domen K., Hosono H., Kawazoe H., Tanaka A. // Chem. Commun. 1998. P. 2185–2186.
29. Hodgson E.K., Fridovich I. // Arch. Biochem. Biophys. 1976. V. 172. P. 202–205.
30. Краткая химическая энциклопедия. Т. 3. М.: Сов. энциклопедия, 1964. С. 983.
31. Klimov V.V., Baranov S.V. // Biochim. Biophys. Acta. 2001. V. 1503. P. 187–196.
32. Dismukes G.C., Klimov V.V., Baranov S.V., Kozlov Yu.N., DasGupta J., Tyryshkin A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 2170–2175.
33. Воейков В.Л., Химич М.В. // Биофизика. 2002. Т. 47, вып. 1. С. 5–11.
34. Мирошников А.И. // Биофизика. 1997. Т. 42, вып. 4. С. 979–984.
35. Ward J.F., Kuo I. // Int. J. Radiat. Biol. 1970. V. 18. P. 381–390.
36. Коган А.Х., Грачев С.В., Елисеева С.В. // Докл. РАН. 1998. Т. 362, № 5. С. 705–708.
37. Гончарова Н.В., Ивановский Р.Н., Филатова Л.В. // Биофизика. 2002. Т. 47, вып. 3. С. 490–499.
38. Finkel T., Holbrook N.J. // Nature. 2000. V. 408. P. 239–247.
39. Voeikov V. // Rivista Biol. 2001. V. 94. P. 237–258.
40. Тронов В.А., Константинов Е.М., Крамаренко И.И. // Цитология. 2002. Т. 44, № 11. С. 1079–1087.
41. Flanagan S.W., Moseley P.L., Buettner G.R. // FEBS Lett. 1998. V. 431. P. 285–286.

## Heat-induced Activation of Reducing Properties of Sea-water Anions

V.I. Bruskov, A.V. Chernikov, S.V. Gudkov, and Zh.K. Masalimov

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

It was shown using the Ellman's reagent that chloride and bicarbonate anions are the heat-induced reducing agents of sea-water, and their combined action is more than additive. Sulfate anions do not exhibit these properties. The influence of sea-water anions on the heat-induced production of hydrogen peroxide was studied by enhanced chemiluminescence in a peroxidase-luminol-*p*-iodophenol system. In NaCl and NaHCO<sub>3</sub> solutions, at concentration and pH values equal to those of sea-water, the production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> upon heating increased, as compared with water, whereas sulfate anions depressed its formation. By using coumarin-3-carboxylic acid as a fluorescent detector of OH radicals, a substantial increase in the production of radicals in the presence of chloride and bicarbonate anions upon heating was shown. The effect is due to the electron donor properties of these anions, which lead to the decomposition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with the formation of OH radicals. The results obtained were considered from the viewpoint of the equivalence of heat and electromagnetic radiation of an absolutely black body. It is supposed that the high-energy quanta of its spectrum lead to the dissociation of anions with the formation of a hydrated electron and radicals. Then a recombination of radicals with the formation of various molecular products takes place.

*Key words: water, reducing properties of anions, hyperthermia, hydroxyl radicals, hydrogen peroxide, hydrated electron, thermal electromagnetic radiation, radical formation and recombination*