

УДК: 615.779.94

**СПЕКТРОСКОПИЯ ОСОБЕННОСТЕЙ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНА
СВОБОДНЫМИ РАДИКАЛАМИ В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ**

М.В. ЛИСТОВ*, А.И. МАМЫКИН**,***, А.А. РАССАДИНА***

*Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова,

ул. Академика Лебедева, 6А, г. Санкт-Петербург, 194044, Россия

** Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ»,

ул. Профессора Попова, д. 5, г. Санкт-Петербург, 197376, Россия, e-mail: alexmamykin@yandex.ru

*** Университет ИТМО, Кронверкский проспект, д.49, г. Санкт-Петербург, 197101, Россия,
e-mail: a.a.rassadina@gmail.com

Аннотация. Рассмотрены основные физико-химические и биологические процессы, связанные с одноэлектронным переносом заряда свободными радикалами через плазмалемму клетки в биологических системах. Одноэлектронный перенос заряда свободными радикалами через плазмалемму клетки является неотъемлемой частью баланса между оксидантной и антиоксидантной системами. Рост концентрации свободных радикалов приводит к нарушению баланса и повреждениям в структуре молекул ДНК и мембран биосистемы. Сформулирована модель ионного переноса и формирования потенциала действия. Показано, что динамика радикальных процессов имеет по меньшей мере три существенно различных временных шкалы, на которых происходят физико-химические и биологические изменения в организме. Первая временная шкала соответствует времени жизни свободного радикала в жидкой среде организма (единицы микросекунд). Процессы, протекающие в течение столь короткого времени невозможно исследовать спектроскопическими методами. Вторая временная шкала лежит в интервале от нескольких секунд до десятков минут и отражает характерные изменения внутренней подвижности молекул после увеличения концентрации свободных радикалов в биологической системе. Процессы, протекающие в данном временном интервале, наблюдались с помощью метода инфракрасной спектроскопии. Третья временная шкала начинается от нескольких часов и далее и отражает изменения в жизнедеятельности организма. Анализ процессов этой временной шкалы выполнен методом электронного парамагнитного резонанса. Результаты показали существование двух связанных радикальными эффектами физиологических механизмов: инактивации свободных радикалов, а именно, ферментативной дисмутации супероксида и энергоемкого изменения структуры жидкокристаллической клеточной мембраны, возбуждающейся и генерирующей электрические потенциалы, распространяющиеся по дипольной сети биосистемы в виде электромагнитных полей.

Ключевые слова: свободный радикал; деполяризация мембраны; электрический дипольный момент; оксидантная система; антиоксидантная система; инфракрасная спектроскопия; спектроскопия электронного парамагнитного резонанса.

**THE SPECTROSCOPY OF ELECTRON TRANSFER FEATURES BY FREE RADICALS
IN NORMAL OR PATHOLOGY CONDITIONS**

M.V. LISTOV*, A.I. MAMYKIN**,***, A.A. RASSADINA***

*S. M. Kirov Military Medical Academy, Akademik Lebedev Str., 6A, St. Petersburg, 194044, Russia

**Saint-Petersburg State Electrotechnical University "LETI",

Professor Popov Str., 5, St. Petersburg, 197376, Russia, alexmamykin@yandex.ru

***ITMO University, Kronverksky Pr., 49, St. Petersburg, 197101, Russia, e-mail: a.a.rassadina@gmail.com

Abstract. The article describes the main physics, chemical and biological processes associated with one-electron charge transfer by free radicals through the plasma membrane of cells in biological systems. It is identified a model for ion transfer and the formation of the action potential. The single electron charge transfer by free radicals through the cell membrane is an integral part of the balance between oxidant and antioxidant systems. The concentration increase of free radicals leads to the imbalance and DNA and biological system membranes damage. It is shown that the dynamics of radical processes has at least three significantly different time scales, where physical, chemical and biological changes take place in the body. The first provisional scale corresponds to the free radical lifetime in body fluids (microseconds). The processes taking place in such short time is not possible to explore by the spectroscopic methods. The second provisional scale is in the range from a few seconds to tens of minutes and represents the typical changes of the intrinsic molecular mobility after increasing the concentration of the free radicals in the biological system. The processes in the real-time were observed by the infrared

spectroscopy. The third provisional scale begins at a few hours and more and reflects changes in the life of the organism. This provisional scale analysis is performed by the electron paramagnetic resonance method. The results showed the existence of the existence of two related radical effects of physiological mechanisms: the inactivation of free radicals, namely, enzyme dismutation of superoxide and energy intensive changes in the structure of the liquid crystal cell membranes, excited and generating electric potentials propagating along the dipole network of biological systems in electromagnetic fields.

Key words: free radical; membrane depolarization; electric dipole moment; oxidative system; antioxidant system; infrared spectroscopy; electron paramagnetic resonance spectroscopy.

Введение. Процессы переноса электрона свободными радикалами через оболочку клетки являются физическим механизмом и осуществляют, как показано в [1, 2], нейрогуморальную регуляцию функций организма, инициируя диффузионное движение ионов Na^+ и K^+ и деполяризацию липопротеиновой клеточной мембраны. Ведущую роль в этих процессах играет анион-радикал кислорода (супероксид), диффузионный поток отрицательно заряженных активных частиц которого из жидкой среды организма на положительно заряженную внешнюю поверхность клеточных мембран вызывает их деполяризацию. Кровь является основной компонентой как *оксидантной системы* (ОС), так и *антиоксидантной системы* (АОС) организма. С током крови и других жидкостей происходит транспорт питательных веществ, кислорода, гормонов и свободных радикалов. Определенную роль [2] в регуляции внутреннего баланса между ОС и АОС играют морфологические особенности строения капилляров, которые обеспечивают дифференцированный поток активных частиц анион-радикалов кислорода из жидкой субстанции организма на поверхность наружной мембраны клеток различных тканей и органов.

В среднем за сутки в крови у человека около 0,5% от общего содержания гемоглобина превращается в метгемоглобин (гем \rightarrow гемин) с образованием супероксида, поэтому, во многих случаях ОС организма играет роль супероксид-генерирующей системы. Один из побочных продуктов синтеза гема – копропорфирин, активированный световыми квантами, или металлом-координатором, генерирует образование супероксида, поток отрицательно заряженных частиц которого, взаимодействуя с активными центрами клеточных мембран, создает условия для модуляции потенциала покоя и включения триггерного механизма потенциала действия [2].

Введение копропорфирина в организм и его активация позволяют моделировать ситуации, связанные с активностью ОС организма [2-5], поскольку концентрация внесенного копропорфирина, а также других ферментзависимых индукторов супероксида и семихинонного радикала (семихинона) [5] напрямую связана с избыточной концентрацией активных форм кислорода в жидкостях организма. При небольших концентрациях активных частиц анион-радикалов в жидкой субстанции межклеточного пространства деполяризация носит, как правило, локальный характер, переходя, по мере нарастания концентрации супероксида и достижения ею критического значения, в тотальную деполяризацию мембраны клетки с возбуждением потенциала действия в нервно-мышечной ткани [2] и включением в работу потенциалзависимых ионных каналов.

Поверхность плазмалеммы, как правило, заряжена отрицательно, вследствие того, что от 10 до 20% мембранных липидов находятся в форме анионов, отрицательным зарядом обладают также и другие мембранные компоненты, например, белки [6]. Отрицательный заряд мембраны нейтрализуется противоионами, образующими двойной электрический слой [7], который с учетом энергетической неоднородности поверхности плазмалеммы формируется в виде кластеров, окружающих отрицательно заряженные участки поверхности [8].

Таким образом, одна из возможных моделей, описывающих поляризованное состояние клеточной мембраны, может рассматривать параллельно ориентированные друг относительно друга микроскопические электрические дипольные моменты (p_i), направленные перпендикулярно поверхности мембраны, таким образом, что эффективный положительный заряд диполя располагается вблизи внешней поверхности плазмалеммы, а отрицательный заряд, соответственно, вблизи ее внутренней поверхности. Тогда суммарный электрический момент микроскопических диполей, приходящийся на единицу объема плазмалеммы, является ничем иным, как макрополяризованностью (вектором поляризации P), которой обладает рассматриваемая клеточная мембрана. Каждый микроскопический диполь, при этом, может быть сопоставлен поверхностному активному центру, взаимодействие которого со свободным радикалом приводит к локальной деполяризации плазмалеммы.

В данном случае основным элементом поверхностного активного центра (его ядром) может служить отрицательно заряженная молекула интегрированного в плазмалемму белка, в которой преобладают карбоксильные группы $[NH_2-R-COO]^-$. Адсорбция гидратированных ионов Na^+ и K^+ на ядре формирует адсорбционную оболочку с положительным зарядом. Вследствие меньшего радиуса ионов Na^+ , гидратная оболочка последнего более плотная (координационное число 6, против 4 у K^+), вследствие чего ионы Na^+ адсорбируются слабее ионов K^+ . В результате возрастает плотность карбоксильных групп вблизи внутренней поверхности мембраны и плотность аминогрупп $[NH_3^+ - R - COOH]^+$ вблизи её на-

ружной поверхности. Нейтральность активного центра в достаточно широких пределах обеспечивается компенсацией заряда интегрированного белка адсорбцией гидратированных ионов Na^+ и K^+ . Эффективный электрический момент активного центра при этом занимает положение, перпендикулярное поверхности плазмалеммы.

Значение вектора поляризации P непосредственно связано с эффективной поверхностной плотностью зарядов $\sigma_{эф}$ на плазмалемме ($P = \sigma_{эф}$), следовательно, отражает поверхностную концентрацию активных центров на мембране. Отрицательно заряженные частицы супероксида и семихинона в процессе адсорбции на активных центрах частично нейтрализуют заряд противоионов, в результате чего происходит локальная деполяризация плазмалеммы, состоящая в изменении значения, или перевероте микроскопических дипольных моментов p_i отдельных активных центров [1, 2, 9-11]. Концентрация супероксидного аниона и соответствующее ей значение вектора поляризации в сбалансированной системе находятся в динамическом равновесии, сопровождающемся хаотической локальной деполяризацией отдельных дипольных моментов. Установившееся в плазмалемме клетки равновесие может смещаться под действием внешних условий, среди которых основную роль играет интенсивность потока анион-радикалов из крови [1, 2, 11, 21], а в наших опытах на нервно-мышечном препарате и сокращающемся миокарде [10, 12] из растворов активированного металлом-координатором копропорфирина. Рост интенсивности потока анион-радикалов увеличивает площадь, занятую деполяризованными активными центрами, по достижении критической величины которой происходит триггерный эффект (закон «все, или ничего» в физиологии) с генерацией потенциала действия.

Происходящее при этом изменение величины, или направления вектора поляризации P представляет собой ток смещения [13], направленный вдоль электрического поля мембраны, то есть перпендикулярно её плоскости. Среднее значение плотности тока смещения (j_p) можно оценить по скорости изменения плотности поляризационных зарядов ($j_p = \Delta\sigma_{эф}/\Delta t$, где $\Delta\sigma_{эф}$ – изменение поляризованности, Δt – время нарастания мембранного потенциала. В соответствии с законом полного тока [13], импульс тока смещения создает в плоскости билипидного слоя круговое импульсное магнитное поле, которое возникает между поверхностями мембраны, и при достаточной интенсивности может достигать активных центров соседних клеток. Ротор вектора напряженности этого поля ($rotH = j_p$) определяется в данном случае плотностью тока смещения. Импульс магнитного поля передает возбуждение деполяризованного активного центра соседним центрам дипольной сети жидкокристаллической матрицы мембраны, в результате чего становится возможной синхронизация локальных деполяризаций с формированием импульса действия, при условии, что пороговые (критические) значения плотности тока смещения и интенсивности потока радикалов превышены.

В отсутствие достаточно мощного воздействия первичного триггера импульсные магнитные поля, распространяясь по дипольной сети мембраны, далеко не всегда возбуждают управляющие потенциалы, но оказывают существенное влияние на внутреннюю подвижность молекул и молекулярных фрагментов, исследование которой возможно методами спектроскопии.

Цель исследования – исследовать динамику взаимодействия свободных радикалов с активными центрами дипольной сети биологических мембран и молекул ДНК методами инфракрасной спектроскопии (ИК-спектроскопии) и спектроскопии *электронного парамагнитного резонанса* (ЭПР).

Материалы и методы исследования. Динамика процессов, вызванных свободными радикалами, как показано в [3, 4, 9, 12, 20, 21], в первую очередь определяется балансом, или нарушением баланса между мощностью (то есть, скоростью генерации радикалов) ОС организма и эффективностью его АОС. Воздействие на баланс ОС и АОС проводилось нами в многочисленных опытах на мышах линии *DBA/2* и нервно-мышечных реоскопических препаратах лягушек. В большинстве случаев использовались инъекции, или аппликации растворов активированной металлом-координатором тетракалиевой соли копропорфирина III (копропорфирина).

Воздействие активированного раствора копропорфирина на организм может служить моделью процессов, происходящих в крови, которая является основой как ОС, так и АОС биосистемы, подтверждением чего является отмеченный нами факт, что у некоторых инъецированных мышей линии *DBA/2* с признаками гемолиза экзофтальм при этом не возникал, а из разрушенных эритроцитов [5] освобождалась супероксиддисмутаза.

В настоящей работе исследование динамики радикальных процессов было выполнено методами ЭПР и ИК-спектроскопии.

ЭПР спектроскопия одноэлектронного переноса. В настоящее время наиболее чувствительным методом изучения свободных радикалов является спектроскопия ЭПР, особенность которой состоит в том, что она позволяет непосредственно наблюдать радиочастотные спектры соединений, в электронных оболочках которых присутствует неспаренный электрон. Взаимодействие спинового магнитного момента неспаренного электрона с внутренним магнитным полем исследуемого вещества дает уникальный спектр, характерный именно для данного исследуемого соединения, что позволяет обнаружить с высокой достоверностью наличие парамагнитного соединения, в том числе свободного радикала.

Непосредственное исследование динамики радикальных процессов в биологических системах затруднено вследствие малого времени жизни радикалов $10^{-7} - 10^{-6}$ с, что соответствует самой короткой временной шкале физико-химических изменений, поэтому участие свободного радикала в том или ином процессе подтверждается косвенно, как правило, по спектру конечного продукта в цепной реакции, или по специально подобранной спиновой ловушке, то есть по более, или менее стабильному радикалу, или молекулярному фрагменту. Таким образом, спектроскопия ЭПР может быть применена на втором, или третьем временном интервале путем исследования биоматериалов, взятых у подопытных животных [5, 9, 16].

Учитывая эти особенности, для каждого конкретного исследования необходимо разрабатывать уникальную методику подготовки образцов и режимы работы прибора, в частности, постоянной времени регистрации усилительного тракта спектрометра, мощности облучения и некоторые другие параметры и условия для исключения эффектов насыщения, существенно искажающих форму и интенсивность сигнала. Важной частью подготовки эксперимента является также выбор так называемых спиновых ловушек – веществ, связывающих исследуемые свободные радикалы с образованием более стабильных радикалов, спектры ЭПР которых, собственно, наблюдаются и регистрируются [5].

ИК-спектроскопия одноэлектронного переноса. Применение ИК-спектроскопии для исследования одноэлектронного переноса радикалами в биологических мембранах основано на регистрации колебательных спектров молекул. Колебательные спектры молекул чувствительны к изменениям полиморфно-фазовых состояний как липидного бислоя, так и белковых молекул, интегрированных в него. Большим преимуществом этого метода измерений является возможность непосредственного наблюдения динамики изменений параметров биологической системы в результате воздействия радикалов. Особенно важным является тот факт, что метод ИК-спектроскопии дает возможность определять относительные положения молекул в течение достаточно коротких временных интервалов, а также идентифицировать физико-химическую природу межмолекулярных взаимодействий, что является принципиально важным при изучении структурных и динамических свойств водных систем организма (кровь, ликвор и т.д.).

Существенным ограничением ИК методов до недавнего времени являлась невозможность использования водных суспензий. Проблема, в основном, была решена с появлением ИК фурье-спектроскопии.

Перенос электрона свободным радикалом через билипидный слой плазмалеммы является одним из основных физических механизмов, который инициирует формирование многих социально значимых патологий со свободно-радикальной природой патогенеза.

Отражением этого процесса может служить изменение инфракрасных спектров (ИК-спектров) основных биологических жидкостей организма, например, крови или её сыворотки. Типичный ИК-спектр таких образцов состоит из серии полос поглощения, имеющих различную ширину и форму, что делает перспективным использование ИК-спектроскопии низкого разрешения, в качестве инструмента исследования структуры биологической жидкости, в особенности, внутренней подвижности составляющих ее молекулярных фрагментов и степени влияния присутствующих веществ на состояние водной основы исследуемого биологического материала с целью расшифровки физических механизмов, обуславливающих возникновение патологических состояний со свободно-радикальной природой и возможной диагностики этих состояний.

Результаты и их обсуждение. *Результаты исследования динамики радикальных процессов методом ЭПР спектроскопии.* В качестве примера успешного исследования процессов переноса электрона в биологической системе представим методику исследования методом спектроскопии ЭПР взаимодействия ДНК *Escherichia coli* с 1,4-бензохиноном и гидрохиноном в водной среде *in vitro*.

В спектрах водных растворов названных веществ сигналов ЭПР не наблюдается. При добавлении ДНК к раствору гидрохинона в весовом соотношении 1:1 в ЭПР спектре наблюдается квинтет с расщеплением 0,24 мТл и отношением интенсивностей компонент 1:3:5:3:1, что типично для семихионного радикала [17]. Это позволяет идентифицировать акцепторы электрона, которыми в данном случае являются пиримидиновые основания ДНК, характеризующиеся более сильным сродством к электрону, чем пурины. Таким образом, образование анион-радикальных состояний является начальной стадией повреждения ДНК и наблюдается, в частности, также и под действием ионизирующего γ -облучения. При добавлении ДНК к раствору 1,4-бензохинона (также в отношении 1:1) регистрируется слабый сигнал, ширина линии которого 0,13 мТл. Аналогичный спектр наблюдается при взаимодействии гидрохинона с бензохиноном при избытке последнего в растворе. Спектр ЭПР, следовательно, позволяет установить наличие комплекса с переносом заряда между гидрохиноном и бензохиноном.

При взаимодействии 1,4-бензохинона с ДНК промежуточный семихионный радикал не удается зарегистрировать в спектрах ЭПР, однако появление синглетного сигнала ЭПР свидетельствует о том, что в присутствии ДНК идет восстановление токсичного бензохинона до нетоксичного гидрохинона. В этом процессе донорами электрона могут служить пуриновые основания ДНК. Взаимодействие реагентов во всех названных выше сочетаниях сопровождается коричневым окрашиванием их растворов. Таким образом, спектры ЭПР не только позволяют установить, что бензохинон и гидрохинон вступают в окислительно-восстановительные реакции с ДНК [17], но демонстрируют также, что первичными явля-

ются реакции одноэлектронного переноса, приводящие к появлению ион-радикальных состояний ДНК, как начальных этапов её повреждения.

Хиноны, в частности, менадион (2-метил-1,4-нафтохинон) и плумбагин (5-гидрокси-2-метил-1,4-нафтохинон), в определенных условиях также могут подвергаться одноэлектронному восстановлению до семихинонных свободных радикалов, способных самоокисляться с образованием исходных хинонов и отрицательно заряженного анион-радикала кислорода. Хиноны являются токсичными соединениями, легко проникающими в клетку и часто используются как индукторы окислительного стресса в экспериментах на эукариотических организмах. Супероксид, в свою очередь, вызывает в биологических системах цепные реакции свободных радикалов [1, 3, 5, 16], приводящие к перекисному окислению липидов [3, 18] в липопротеиновых мембранах. Важно отметить, что восстановление хинонов *in vivo* идет по двухэлектронному механизму с помощью цитозольного фермента *NADPH*-дегидрогеназы или *DT*-диафоразы [17, 18], для которой хинон служит акцептором электронов, при этом образуется нетоксичный гидрохинон.

В наших экспериментах [3-5, 9, 19, 20] при моделировании полимиозита формы Вагнера-Унферрихта мышам перорально вводился раствор гидрохинона и суспензия ингибитора *DT*-диафоразы. Гемозависимый экзофтальм [1, 5, 14, 15] моделировался нами внутрибрюшинной инъекцией 1% раствора копропорфирина, активированного солью трехвалентного железа. Участие свободных радикалов в моделируемых процессах регистрируется методом прямого детектирования образцов биологических жидкостей с использованием спиновых ловушек на ЭПР-спектрометре *BER418* фирмы «Брукер» (Германия) при комнатной температуре. В качестве спиновой ловушки использовался *N*-трет-бутил- α -фенилнитрон (*PBN*) фирмы «Sigma» (США). Наблюдаемый в плазме крови квинтетный сигнал ЭПР семихинонного радикала обусловлен введением мышам гидрохинона, который окисляется по одноэлектронному пути в условиях системного подавления активности цитозольной *DT*-диафоразы с нарушением баланса ОС и АОС систем организма. Стабилизированный ловушкой *PBN* гидроксильный радикал регистрируется методом ЭПР как триплет дуплетов, являясь конечным звеном цепной реакции взаимопревращения радикалов, начальные звенья которой занимают супероксид и перекись водорода [16,18].

Результаты исследования динамики радикальных процессов методом ИК-спектроскопии. В качестве объекта исследования в наших экспериментах использовались мыши линии *DBA/2*, на которых моделировался гемозависимый экзофтальм в соответствии со схемой, описанной в [5]. Половина подопытных животных использовалась как контрольная группа, остальным проводилась внутрибрюшинная инъекция водного раствора тетракалиевой соли копропорфирина III (копропорфирина) в дозе 35 мг/кг с дальнейшей активацией его металлом-координатором [1, 14, 15].

ИК-спектры образцов крови подопытных животных регистрировались фурье-спектрометром ФСМ 1201 в диапазоне $400\text{ см}^{-1} - 3500\text{ см}^{-1}$. Наиболее, на наш взгляд, информативным является диапазон $1200\text{ см}^{-1} - 3400\text{ см}^{-1}$, лежащий в области основных частот водной основы, в котором отчетливо наблюдаются три характерные полосы поглощения, присутствующие, как в спектрах крови интактных, так и в спектрах крови обработанных копропорфирином животных. Предварительный анализ возможной информативности спектров оценивался сравнением усредненных спектров поглощения по каждой группе мышей.

ИК-спектры поглощения в выбранном для идентификации молекулярных взаимодействий диапазоне представляют слабо разрешенные дублеты 1550 см^{-1} и 1645 см^{-1} , а также синглеты 3195 см^{-1} для интактных мышей и 3160 см^{-1} для мышей, подвергнутых инъекциям копропорфирина. В обоих спектрах наблюдается также широкая полоса поглощения 2125 см^{-1} , интенсивность и положение которой не зависят от состояния подопытного животного. Спектры аналогичной структуры наблюдаются также у других видов млекопитающих, что позволяет до некоторой степени расширить область использования ИК методов на диагностику баланса, или дисбаланса между ОС и АОС.

Идентификация спектров в высокочастотной области позволяет с большой долей вероятности отнести линии 3195 см^{-1} и 3160 см^{-1} к валентным *O-H* и деформационным *H-O-H* колебаниям в олигомерных структурах, которые мы отождествляем с составляющими фрагментами белковых молекул, интегрированных в билипидный слой плазмалеммы. Характер изменения полосы при переходе от спектров интактных мышей к спектрам обработанных копропорфирином животных соответствует ослаблению водородных связей, удерживающих интегрированную в билипидный слой полярную молекулу белка. Разрыхление связей облегчает изменение дипольного момента активного центра при захвате интегрированной молекулой белка отрицательно заряженного радикала.

В низкочастотной области спектра линии дублета 1550 см^{-1} и 1645 см^{-1} отражают большое число разнообразных движений. Типичными для этой области являются деформационные колебания молекул водной основы, тем не менее, довольно большая суммарная ширина дублета указывает также на присутствие таких движений, как колебания групп *CO*, *CH₂*, *CH₃* и альдегидных группировок в олигомерных структурах плазмалеммы и клеточного матрикса. Явно выраженное увеличение интенсивности этих колебаний отражает рост внутренней подвижности таких структур, как интегрированные белковые комплексы и сам билипидный слой плазмалеммы.

Наиболее заметное различие в рассматриваемых спектрах состоит в изменении отношения амплитуд высокочастотного и низкочастотного пиков поглощения в ИК-спектрах подопытных животных, которое достигает 25% в течение опыта. Отношение пикового значения линии 3195 см^{-1} к пиковому значению линии 1645 см^{-1} у интактных мышей в течение всего опыта, у подвергнутых инъекции животных в начале опыта, в среднем по каждой группе составило 2,14. ИК-спектры обработанных копропорфирином мышей в течение опыта демонстрировали уменьшения соответствующего отношения до экстремального значения 1,73 в среднем через 7-10 минут после инъекции. Отношение пиковых значений восстанавливалось у инъецированных мышей к исходному значению 2,14 в течение часа после инъекции.

Исследование динамики процесса позволяет сделать вывод о том, что изменение баланса ОС и АОС, происходящее на втором временном отрезке, возможно, может послужить основой для разработки методов ранней диагностики заболеваний со свободно-радикальной этиологией с использованием ИК-спектроскопии биологических жидкостей.

Заключение. Исследования показали:

1. Динамика радикальных процессов имеет по меньшей мере три существенно различных временных шкалы, на которых происходят физико-химические и биологические изменения в организме:

1.1. На самом коротком временном отрезке, длительность которого сравнима с характерным временем жизни свободного радикала в жидкой среде организма (единицы микросекунд), происходит изменение поляризации активного центра плазмалеммы и формируется потенциал действия. Столь быстрые процессы не доступны для исследования спектроскопическими методами, которые, тем не менее, позволяют наблюдать результаты этих процессов по косвенным признакам на втором и третьем временных отрезках.

1.2. На втором временном отрезке, в диапазоне от нескольких секунд до десятков минут после инъекции или аппликации, возможно наблюдение изменений в спектрах мембранных структур, в электропроводности реоскопов, в изменении частоты сердечных сокращений. На этом временном отрезке у подопытных животных достаточно часто возникают состояния типа опистотонуса. В этом временном диапазоне достаточно надежно (практически *in vivo*) наблюдаются характерные изменения внутренней подвижности молекул и молекулярных фрагментов методами ИК-спектроскопии [14, 15].

1.3. Существенные изменения в жизнедеятельности организма (экзофтальм, полимиозит, ишемия миокарда) наступают через несколько часов, суток и более длительных интервалов времени. На этой временной шкале возможно наблюдение продуктов цепных реакций [16] методами спектроскопии ЭПР.

2. Воздействие диффузионного потока анион-радикалов кислорода на биологические объекты происходит благодаря энергии одноэлектронного переноса свободными радикалами, которая в зависимости от мощности потока способна осуществлять нормальные или повреждающие изменения в структуре молекул ДНК и мембран биосистемы. Методы ЭПР и ИК-спектроскопии выявляют существование двух связанных радикальными эффектами физиологических механизмов инактивации свободных радикалов, а именно, ферментативной дисмутации [5] супероксида и энергоемкого изменения структуры жидкокристаллической клеточной мембраны, генерирующей электрические потенциалы, распространяющиеся по дипольной сети биосистемы в виде электромагнитных полей.

3. Спектроскопические методы изучения особенностей одноэлектронного транспорта в биологических объектах показывают, что нарушение баланса ОС и АОС приводят к возникновению поврежденных ДНК, патологических изменений тканей в зоне микроциркуляторного русла и, наконец, к гибели организма.

4. Железосодержащая кровь, гем которой является главной составляющей ОС хордовых, постоянно воздействует на омываемые жидкостями органы посредством диффузионного потока супероксида на клеточную поверхность, в том числе с участием генетического аппарата и эндотелия [2], адаптированно к выполнению регуляции потока активных частиц свободных радикалов.

Литература

1. Геннис Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функции / пер. с англ. Геннис Р. М.: Мир, 1997. 624 с.
2. Давыдов С.Ю., Ефименко Л.П., Мамыкин А.И., Мошников В.А. Диффузия и адсорбция в гетерогенных системах: учебное пособие. СПб.: СПбГЭТУ, 2001. 48 с.
3. Листов М.В., Гайворонский И.В., Тихонова Л.П. К вопросу об экспериментальном моделировании полимиозита // Анатомия и военная медицина. 2003. № 34. С. 38–41.
4. Листов М.В. Химическая защита у членистоногих и изменчивость организмов. Л.: Наука, 1989. 157 с.
5. Листов М.В., Мамыкин А.И. Концентрация свободных радикалов в организме млекопитающих в условиях изменения активности супероксид-генерирующей и антиоксидантной систем // Вестн. Росс. воен.-мед. акад. 2014. Вып.1 (45). С. 121–126.

6. Листов М.В., Мамыкин А.И. Анион-радикал кислорода как фактор деполяризации и возбуждения клеточной мембраны // Клиническая патофизиология. 2014. №3. С. 34–39.
7. Листов М.В., Мамыкин А.И. Интенсивность потока свободных радикалов на плазмалемму при меняющейся концентрации свободных радикалов в биологической системе. Труды всеармейской научно-практической конференции «Инновационная деятельность в вооруженных силах РФ». МО РФ, ЛВО, Военная академия связи, Санкт-Петербург, 2013. С. 209–216.
8. Листов М.В., Мамыкин А.И. Концентрация свободных радикалов в организме млекопитающих в условиях изменения активности супероксид-генерирующей и антиоксидантной систем // Вестн. Росс. воен.-мед. акад. 2014. Вып.1 (45). С. 121–126.
9. Листов М.В., Мамыкин А.И. Продолжительность жизни эукариотической клетки под действием потока свободных радикалов из жидкостей организма // Клиническая патофизиология. 2014. №4. С.33–37.
10. Листов М.В., Мамыкин А.И. Роль анион-радикала кислорода в механизмах возбуждения миокарда и его патогенетическое воздействие в несбалансированных биологических системах // Клиническая патофизиология. 2015. №2. С. 48–52.
11. Листов М.В., Мамыкин А.И. Формирование пористой структуры в жидкокристаллической матрице клеточной оболочки в процессе одноэлектронного переноса свободными радикалами // Клиническая патофизиология. 2014. №1. С. 74–76.
12. Листов М.В., Мамыкин А.И. Экспериментальное моделирование гемозависимого экзофтальма // Вестн. Росс. воен.-мед. акад. 2013. Вып. 2 (42). С. 120–125.
13. Листов М.В., Мамыкин А.И., Кондаков А.Ю., Селезнев А.Б. Динамика формирования патогенерирующей дозы свободных радикалов при моделировании гемозависимого экзофтальма по данным ИК-спектроскопии. Усовершенствование способов и аппаратуры, применяемых в учебном процессе, микробиологических исследованиях и клинической практике. СПб. Изд-во ВМА. 2013. Вып. 44. С.108–110.
14. Листов М.В., Торопов Д.К., Родионов Г.Г. Экспериментальное обоснование свободнорадикальной этиологии системных заболеваний соединительной ткани на моделях полимиозита и гемозависимого экзофтальма // ДАН. Физиология. 2007. Т. 414, № 5. С. 715–717.
15. Листов, М.В., Мамыкин А.И. Организм, как биосистема, адаптированная к использованию квантованной энергии транспорта электрона свободными радикалами // Вестн. Росс. воен.-мед. акад. 2016. № 4 (56). С. 200–204.
16. Листов, М.В., Одинак М.М., Клочков Н.Д., Тихонов Л.П. Ферментзависимая модель полимиозита у мышей линии DBA/2 // ДАН. Физиология. 1999. Т. 366, № 2. С. 269–270.
17. Мамыкин А.И., Листов М.В. Кинетика релаксации свободных радикалов и перенос электрона в жидких субстанциях организма // Известия СПб ГЭТУ «ЛЭТИ». 2010. №3. С. 55–60.
18. Пименов А.Д. Техническая электродинамика. М.: Радио и связь, 2005. 483 с.
19. Родионов Г.Г., Плужников Н.Н., Листов М.В., Мамыкин А.И. Экспериментальное моделирование патологических состояний со свободнорадикальной этиологией и их математическое описание. Труды международной конф. «Высокоинтенсивные физические факторы в биологии, медицине, сельском хозяйстве и экологии». ФГУП Российский федеральный ядерный центр, ВНИИЭФ. Саров. 2009. С. 88–97.
20. Фролов Ю.Г. Курс коллоидной химии. Поверхностные явления и дисперсные системы, учебник для вузов. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Химия, 1988. 464 с.
21. Mamykin A.I. Listov M.V., Rassadina A.A. Mathematical model of free radicals flux action on eukariotic cells lifetime and biomembranes sensitivity. IEEE WORKSHOP Industrial and Medical Measurement and Sensor Technology. Mulheim an der Ruhr. June 16-17. 2016. P. 56–57

References

1. Gennis R. Biomembrany: Molekulyarnaya struktura i funktsii [Biomembranes: Molecular structure and functions]. per. s angl. Gennis R. Moscow: Mir; 1997. Russian.
2. Davydov SY, Efimenko LP, Mamykin AI, Moshnikov VA. Diffuziya i adsorbtsiya v geterogennykh sistemakh: uchebnoe posobie [Diffusion and Adsorption in Heterogeneous Systems: A Training Manual]. Sankt-Peterburg: SPbGETU; 2001. Russian.
3. Listov MV, Gayvoronskiy IV, Tikhonova LP. K voprosu ob eksperimental'nom modelirovanii poli-miozita [On the issue of experimental modeling of polymyositis]. Anatomiya i voennaya meditsina. 2003;34:38-41. Russian.
4. Listov MV. Khimicheskaya zashchita u chlenistonogikh i izmenchivost' organizmov [Chemical protection in arthropods and variability of organisms]. Leningrad: Nauka; 1989. Russian.
5. Listov MV, Mamykin AI. Kонтсентрати́я svobodnykh radikalov v organizme mlekovitayu-shchikh v usloviyakh izmeneniya aktivnosti superoksid-generiruyushchey i antioksidantnoy system [The concentration of free radicals in the mammalian organism under conditions of a change in the activity of superoxide-generating and antioxidant systems]. Vestn. Ross. voen.-med. akad. 2014;1 (45):121-6. Russian.

6. Listov MV, Mamykin AI. Anion-radikal kisloroda kak faktor depolyarizatsii i vzbuzhdeniya kletchnoy membrany [Anion-radical of oxygen as a factor of depolarization and excitation of the cell membrane]. *Klinicheskaya patofiziologiya*. 2014;3:34-9. Russian.
7. Listov MV, Mamykin AI. Intensivnost' potoka svobodnykh radikalov na plazmalemmu pri menyayushcheysya kontsentratsii svobodnykh radikalov v biologicheskoy sisteme [The intensity of the flow of free radicals on the plasmalemma at a changing concentration of free radicals in the biological system]. *Trudy vsereameyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Innovatsionnaya deyatel'nost' v vooruzhennykh silakh RF»*. MO RF, LVO, Voennaya akademiya svyazi, Sankt-Peterburg; 2013. Russian.
8. Listov MV, Mamykin AI. Kontsentratsiya svobodnykh radikalov v organizme mlekoopitayu-shchikh v usloviyakh izmeneniya aktivnosti superoksid-generiruyushchey i antioksidantnoy system [The concentration of free radicals in the mammalian organism under conditions of a change in the activity of superoxide-generating and antioxidant systems]. *Vestn. Ross. voen.-med. akad.* 2014;1 (45):121-6. Russian.
9. Listov MV, Mamykin AI. Prodlzhitel'nost' zhizni eukarioticheskoy kletki pod deystviem potoka svobodnykh radikalov iz zhidkostey organizma [The lifetime of a eukaryotic cell under the action of free radicals from body fluids]. *Klinicheskaya patofiziologiya*. 2014;4:33-7. Russian.
10. Listov MV, Mamykin AI. Rol' anion-radikala kisloroda v mekhanizмах vzbuzhdeniya miokarda i ego patogeneticheskoe vozdeystvie v nesbalansirovannykh biologicheskikh sistemakh [Role of the oxygen radical anion in mechanisms of myocardial excitation and its pathogenetic effect in unbalanced biological systems]. *Klinicheskaya patofiziologiya*. 2015;2:48-52. Russian.
11. Listov MV, Mamykin AI. Formirovanie poristoy struktury v zhidkokristallicheskoy matritse kletchnoy obolochki v protsesse odnoelektronnogo perenosa svobodnymi radikalami [Formation of the porous structure in the liquid crystal matrix of the cell membrane in the process of single-electron transfer by free radicals]. *Klinicheskaya patofiziologiya*. 2014;1:74-6. Russian.
12. Listov MV, Mamykin AI. Eksperimental'noe modelirovanie gemozavisimogo ekzofthal'ma [Experimental modeling of the hemophilic exophthalmos]. *Vestn. Ross. voen.-med. akad.* 2013;2 (42):120-5. Russian.
13. Listov MV, Mamykin AI, Kondakov AY, Seleznev AB. Dinamika formirovaniya patogeneriruyushchey dozy svobodnykh radikalov pri modelirovanii gemozavisimogo ekzofthal'ma po dannym IK-spektroskopii [Dynamics of the formation of a pathogen-free dose of free radicals in the modeling of a hemophilic exophthalm according to IR spectroscopy]. *Uovershenstvovanie sposobov i apparatury, primenyaemykh v uchebno protsesse, mediko-biologicheskikh issledovaniyakh i klinicheskoy praktike*. Sankt-Peterburg: Izd-vo VMA; 2013. Russian.
14. Listov MV, Toropov DK, Rodionov GG. Eksperimental'noe obosnovanie svobodnoradi-kal'noy etiologii sistemnykh zabolevaniy soedinitel'noy tkani na modelyakh polimiozita i gemozavisimogo ekzofthal'ma [Experimental substantiation of the free radical etiology of systemic connective tissue diseases in polymyositis models and hemophilic exophthalmos]. *DAN. Fiziologiya*. 2007;414(5):715-7. Russian.
15. Listov MV, Mamykin AI. Organizm, kak biosistema, adaptirovannaya k ispol'zovaniyu kvantovannoy energii transporta elektrona svobodnymi radikalami [The organism, as a biosystem, adapted to use the quantized energy of electron transport by free radicals]. *Vestn. Ross. voen.-med. akad.* 2016;4 (56):200-4. Russian.
16. Listov MV, Odinak MM, Klochkov ND, Tikhonov LP. Fermentzavisimaya model' polimiozita u myshyey linii DBA/2 [The enzyme-dependent model of a polymocyte in mice of the line DVA / 2]. *DAN. Fiziologiya*. 1999;366(2):269-70. Russian.
17. Mamykin AI, Listov MV. Kinetika relaksatsii svobodnykh radikalov i perenos elektrona v zhidkikh substantsiyakh organizma [Kinetics of free radical relaxation and electron transfer in liquid body substances]. *Izvestiya SPb GETU «LETI»*. 2010;3:55-60. Russian.
18. Pimenov AD. *Tekhnicheskaya elektrodinamika* [Technical electrodynamic]. Moscow: Radio i svyaz'; 2005. Russian.
19. Rodionov GG, Pluzhnikov NN, Listov MV, Mamykin AI. Eksperimental'noe modelirovanie patologicheskikh sostoyaniy so svobodnoradikal'noy etiologiyey i ikh matematicheskoe opisaniye [Experimental modeling of pathological states with free radical etiology and their mathematical description]. *Trudy mezhdunarodnoy konf. «Vysokointensivnyye fizicheskie faktory v biologii, meditsine, sel'skom khozyaystve i ekologii»*. FGUP Rossiyskiy federal'nyy yadernyy tsentr, VNIIEF. Sarov; 2009. Russian.
20. Frolov YG. *Kurs kolloidnoy khimii* [Course of colloid chemistry]. *Poverkhnostnye yavleniya i dispersnyye sistemy, uchebnyk dlya vuzov. 2-e izd., pererab. i dop.* Moscow: Khimiya; 1988. Russian.
21. Mamykin AI, Listov MV, Rassadina AA. Mathematical model of free radicals flux action on eukaryotic cells lifetime and biomembranes sensitivity. *IEEE WORKSHOP Industrial and Medical Measurement and Sensor Technology. Mulheim an der Ruhr*. 2016.

Библиографическая ссылка:

Листов М.В., Мамыкин А.И., Рассадина А.А. Спектроскопия особенностей переноса электрона свободными радикалами в норме и патологии // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2017. №2. Публикация 3-4. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2017-2/3-4.pdf> (дата обращения: 04.05.2017).