

Շ. Մ. ԱՎԱԿՅԱՆ

ПРИМЕНЕНИЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО МЕТОДА ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Биологическое свечение известно с древнейших времен, однако оно является наименее изученным видом люминесценции. Физик Роберт Бойль еще в 1667 г. наблюдал, что давно лежащий в комнате кусок телятины ярко светится в темноте, и что его свечение зависит от поступления воздуха. Известно также, что врач средневековья Парацельс описал свечение ран в темноте. В конце 50-х годов XVII века немецкий исследователь Беккер установил, что свечение моря связано с микроскопическими живыми организмами, живущими в морской воде. Дальнейшее изучение биолюминесценции связано с именами Рафаэла Дюбуа (1885), затем Гарвея [35], который совместно с сотрудником открыл люциферин-люциферазные реакции у светляков американских *photinus-photinus* и японских *luciola*. Еще в тридцатых годах нашего столетия Лепешкин [36] пытался с помощью несовершенного метода фотографической регистрации уловить излучение при поражающем действии химических веществ на живые клетки. Он описывал, что при подобных воздействиях на живые ткани организмов происходит потемнение фотографических пластинок. Почти одновременно Гурвич [11] на основании дистанционного воздействия одних живых клеток на скорость клеточного деления других клеток выдвинул положение, что клетки излучают слабый ультрафиолетовые лучи, стимулирующие клеточное деление и в силу этого назвал его митогенетическим излучением. Как в свое время нашумевшие работы Лепешкина, так и Гурвича в виду появления противоречивых данных других авторов со временем потеряли интерес к себе. Хотя позднее ультрафиолетовое излучение регистрировалось на некоторых биологических организмах объективными методами [28], однако из-за небольшого эффекта невозможно было прийти к определенным закономерностям.

Как ни странно, но совершенно незамеченным прошло открытие, сделанное в 1954 г. итальянскими физиками Колли и Фаццини [30, 31], которые, сконструировав высокочувствительную установку с фотоумножителем, обнаружили в сине-зеленой части спектра слабое постоянное свечение с поверхности корней проростков растений.

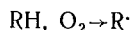
Тарусов [24] высказал мнение, что, получив физический эффект, эти авторы лишь констатировали это явление, но не анализировали причины этого свечения, не развили его дальше в биофизическом направлении. В дальнейшем [21, 23] было обнаружено сверхслабое свечение в некоторых органах млекопитающих. Сверхслабое свечение биоорганизмов по сравнению с классической биолюминесценцией, имеет свои особенности: оно

чрезвычайно слабо и для регистрации нужна фотоэлектронная аппаратура. Сверхслабое свечение распространено в природе широко, а многочисленные эксперименты в настоящее время показали универсальность данного явления для всех живых систем.

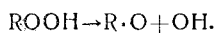
Источником энергии люминесценции является химическая энергия, за счет которой происходят все процессы в живом организме. Поэтому очевидно [12—19], что это излучение является хемилюминесценцией (ХЛ). Изучая ХЛ, можно получить информацию о некоторых звеньях окислительных процессов, развивающихся в клетках, и о влиянии, которое оказывают на эти процессы различные факторы. Хемилюминесценция часто наблюдается в таких реакциях, которые протекают с участием свободных радикалов и возбужденное свечение происходит в элементарных актах рекомбинации радикалов, причем оно имеет место исключительно в реакциях окисления, и происходит с участием или молекулярного кислорода, или соединений, выделяющих кислород (перекиси, озониды) [5].

Как известно, поглощение молекулой энергии в количестве до 8—10 электрон-вольт переводит молекулу в возбужденное состояние, которое длится микросекунды. Обратное возвращение молекулы в исходное состояние с испусканием избытка энергии в виде света представляет собой люминесценцию. Известно также, что при этом не вся энергия затрачивается на выход люминесценции, частично она переходит в теплоту. Однако в ряде экзотермических химических реакций может выделяться энергия в количестве 40—70 ккал/моль. В первой стадии эта энергия концентрируется на продуктах реакции и может перевести их в электронное возбужденное состояние. Освобождение этой энергии в виде света представляет собой хемилюминесценцию [17].

В Институте химической физики АН СССР изучался механизм хемилюминесценции углеводородов и их производных в жидкофазных окислительных реакциях [5, 6, 29]. Последние представляют собой цепные радикальные реакции, механизм первой стадии которых (образование гидроперекисей ROOH) хорошо изучен и состоит из следующих элементарных процессов. В первый период окисления свободные радикалы образуются при взаимодействии исходного углеводорода с растворенным в нем кислородом

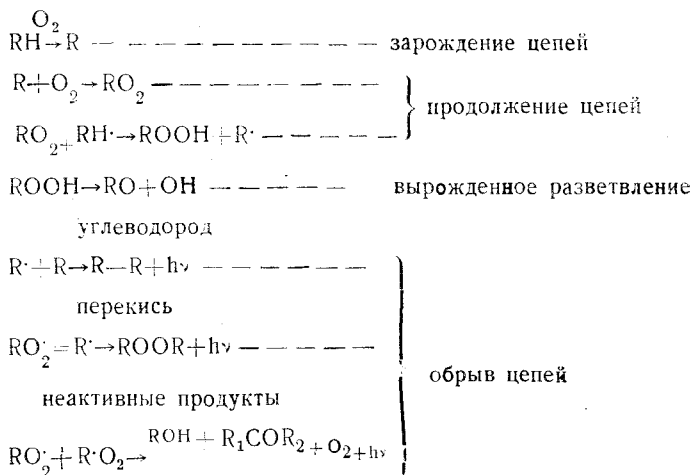


Радикал $\text{R}^\cdot$ присоединяет к себе молекулу кислорода и превращается в перекисный радикал $\text{RO}_2^\cdot$, который далее отрывает атом водорода от молекулы углеводорода и образует гидроперекись и свободный радикал $\text{R}^\cdot$, который продолжает цепь. Обрыв цепей (уничтожение свободных валентностей) происходит в результате взаимодействия двух свободных радикалов. В процессе окисления накапливается гидроперекись, молекулы которой сравнительно медленно распадаются на радикалы, например, по реакции



Это приводит к увеличению скорости образования свободных радикалов.

Процесс распада промежуточных гидроперекисей на радикалы представляет собой реакцию вырожденного разветвления цепей. В целом механизм цепного окисления углеводов может быть представлен следующим образом:



Как видно из реакций, радикалами, ведущими цепь, являются углеводородный радикал R и перекисный радикал RO₂. Радикал R появляется в системе только при чрезвычайно малых, близких к нулю концентрациях O₂, а начинается с определенной концентрации O₂ (10⁻⁶ моль/литр). Радикалы R сразу превращаются в радикалы RO₂ и в системе остаются только последние.

Как известно, реакции, идущие по механизму цепного окисления, широко распространены в природе и технике. Это окислительная переработка углеводов с целью получения цепных кислородосодержащих продуктов, а с другой стороны это также нежелательные процессы—окисление пищевых жиров, смазок и топлива и т. д.

Исследования Васильева, Карпухина и Шляпintoха [8] показывают также, что в жидкой фазе хемилюминесценции интенсивность зависит от температуры и концентрации реагентов, при этом свечение возникает в элементарном акте рекомбинации (соединении) свободных радикалов за счет энергии, освобождающейся в этом процессе. Представление о рекомбинационной радикальной природе возбуждения позволило предложить хемилюминесцентные методы количественного изучения реакций. Оказалось, что по хемилюминесценции можно достаточно точно и быстро измерять энергию активации реакций, абсолютные и относительные константы скорости отдельных стадий реакций, концентрации некоторых реагентов, получать количественные данные об элементарных процессах.

Для решения задач, связанных с механизмом хемилюминесценции, как известно, должны быть проанализированы важнейшие характеристики возбужденной частицы: спектр, время жизни и выход излучения.

1. Спектр свечения тесно связан с расположением энергетических уровней молекулы, которые в свою очередь зависят от ее структуры.

2. Время жизни молекулы показывает стабильность внутримолекулярной структуры, а также и взаимодействие возбужденной молекулы со средой.

3. Потеря энергии может происходить разным путем и в этом случае выход излучения показывает, какую долю в общей потере энергии составляет энергия излучения.

Васильевым и др. было найдено, что при окислении углеводов свечение возбуждается при квадратичной рекомбинации перекисных радикалов и его интенсивность пропорциональна скорости этого процесса.

Если считать, что подобные реакции второго порядка, то есть

$$\frac{dc}{dt} = -KC^2,$$

то решение этого уравнения приводит к зависимости

$$\frac{1}{C} = \frac{1}{C_0} + Kt,$$

где $K = \text{tg } \alpha, \frac{dc}{dt}$ — скорость реакции. Другая [5] формула интенсивности реакции выглядит так:

$$I = \eta KC^2 \text{ или}$$

$$I = \eta K (RO_2)^2,$$

где η — квантовый выход свечения, который показывает вероятность превращения энергии, выделившейся при рекомбинации радикалов, в энергию кванта света, или отношение числа испускаемых фотонов к числу актов рекомбинации.

В реакциях окисления органических веществ возбуждаются продукты рекомбинации перекисных радикалов — кетоны. Излучение при этом происходит, когда кетон переходит из возбужденного в основное невозбужденное состояние, то есть из триплетного в синглетное состояние.

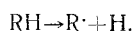
При реакции окисления углеводов, помимо кетонов, излучающих в синей области, образуются и возбужденные молекулы кислорода, излучение которых лежит в красной области [5].

Вышеприведенные работы, которые относятся к области химфизики, в дальнейшем служили основой для объяснения механизма сверхслабого свечения, происходящего в биологических организмах. Тарусов и его сотрудники [22, 23] при исследовании механизма свечения разных органов животных в верхней части гомогената печени, где содержались свободные липиды и небольшое количество белка, наблюдали хемилюминесценцию. Исследования показали, что интенсивность хемилюминесценции в липидных фракциях увеличивается в 5—6 раз по сравнению с

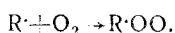
тканями, в которых уменьшение интенсивности объясняется также эффектом самопоглощения. Авторы работы приходят к выводу, что механизм хемилюминесценции липидов, вероятно, близок к механизму, предложенному Васильевым [5—8] для хемилюминесценции, сопровождающей окисление углеводов.

При самоокислении липидов возникают три стадии радикальных рекомбинаций, результатом которых является хемилюминесценция: 1) рекомбинация радикалов, 2) взаимодействие радикалов с кислородом, 3) взаимодействие радикалов с биосубстратами.

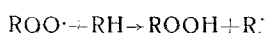
Окисление жиров в организме и вне организма происходит совсем иначе. В организме кислород не присоединяется непосредственно к молекуле жира. Окисление происходит за счет того, что молекула жирной кислоты теряет два атома водорода. Михлин [17, 19], Эмануэль [29] показали, что жиры вне организма окисляются самопроизвольно по принципу цепной химической реакции. На первом этапе происходит распад (диссоциация) молекулы органической жирной кислоты на первичные свободные радикалы



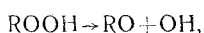
Затем первичный радикал взаимодействует с молекулой кислорода и образует перекисный радикал



Перекисный радикал взаимодействует с молекулой жира и вновь образует активный центр — первичный радикал

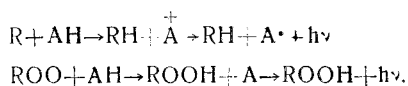


Полученная перекисная молекула жирной кислоты неустойчива, и, самопроизвольно разрушаясь, распадается на два свободных радикала



каждый из них способен начать новую цепь, и скоро процесс окисления охватывает все вещества жира.

Иная картина приведенных реакций в организме. Тарусов [25] показал, что максимальное высвечивание в организме достигается при взаимодействии антиокислителей с промежуточным продуктом окислительных реакций. Природные антиокислители инактивируют свободные радикалы и тормозят реакцию



Эта реакция в нормальных условиях протекает медленно и на постоянном уровне. Основную роль в развитии окислительных цепных реакций в биолипидах играет нарушение стационарного состояния, которое сохранялось за счет постоянного потока антиокислителей.

Взаимодействуя со свободным радикалом, антиокислители (например, α -токоферол), обрывают цепь окислительной реакции, тормозят в организме окислительные процессы, переносят ее на чрезвычайно низкий уровень.

Тарусовым и др. [23] показано, что активные антиоксиданты тормозят автоокисление олеиновой кислоты и снижают выход перекисных соединений. Их антиокислительные действия сначала сопровождаются усилением хемилюминесценции в видимой области спектра, а затем происходит постепенное ее затухание.

Кроме изучения интимных механизмов хемилюминесценции, в последнее время огромное внимание уделяется использованию хемилюминесцентного анализа как нового объективного метода для исследования влияния химических и физических факторов на различные биологические образования [2].

Изучение зависимости интенсивности свечения от парциального давления кислорода показало, что в области низких концентраций кислорода характерна линейная зависимость свечения от парциального давления кислорода. Хотя Журавлевым [12] отмечено, что при концентрации 30% кислорода *интенсивность свечения мало зависит от давления кислорода*, однако в работе [2, 3] наглядно показано, что при давлениях даже до 17 атмосфер интенсивность свечения линейно растет и зависит от концентрации кислорода. По-видимому, при этой концентрации некоторая часть восстановленного субстрата окисляется молекулярным кислородом, а затем в возбужденном состоянии люминесцирует.

В результате исследований последних лет в какой-то мере удалось выявить особенности этого излучения, его природу и характер информации, которую оно несет. Удалось установить также, что интенсивность излучения, испускаемого животными и растительными клетками, колеблется в незначительных пределах, но у каждого типа в состоянии покоя стабильно сохраняется своя интенсивность. Петрусевиц, Иванов [20] обратили внимание, например, на то, что ткани раковых экспериментальных и человеческих опухолей излучают заметно слабее, чем нормальные ткани.

Много исследований было выполнено по влиянию температуры на интенсивность этого свечения на растениях [9, 10] и на животных тканях [21—26]. Было найдено, что с повышением температуры уровень излучения растет, однако в интервале температур биологического оптимума устанавливается стационарное состояние. Было показано, что при повышении температуры наблюдается критическая температурная точка, в которой стационарность уже не устанавливается и излучение начинает возрастать, ускоряясь во времени. Оказалось, что у ряда злаковых растений свечение связано с температурной чувствительностью растений и по этой точке на диаграмме температурной зависимости можно оценить, является ли данный вид или сорт более «теплолюбивым» или «холодолюбивым».

Различные физико-химические воздействия, усиливают, как пра-

вило, интенсивность свечения и их действие аналогично повышению температуры. Были получены интересные информации от клеток при воздействии на них ионизирующих излучений [1—3, 21, 25, 34]. Обычно после облучения излучение тканей животных и растений начинает возрастать. Авакяном и др. [1] было показано на растениях, что при действии только повышенных давлений кислорода до 1 атм. хемилюминесценция усиливается, а затем остается постоянной. Однако при одновременном действии рентгеновских лучей и кислорода в разных парциальных давлениях отмечается нижний и верхний пределы реакций, что говорит о наличии цепных окислительных процессов.

Измерение ХЛ линолевой кислоты непосредственно после рентгеновских лучей [33, 34] интенсивность свечения также резко возрастает, причем эксперименты на циклогексане показали, что после облучения через 20 минут ХЛ становится на прежний уровень.

Было показано также, что сверхслабое свечение закономерно возрастает после прижизненного облучения рентгеновскими лучами как у растений, так и у отдельных органов животных [23]. Эксперименты показали, что интенсивность свечения нарастает во времени, что говорит о корреляции между лучевой патологией и ХЛ облученного органа.

О том, что возрастание излучения сигнализирует об образовании активных окислительных агентов именно в липидной фазе говорят исследования Козлова и др. [27]. Они производили сравнительную оценку образования активных радикалов в различных субстратах облученных высших организмов — крыс. Для оценки присутствия радикалов применен прижизненный метод прививки мономеров акрилонитрила и винилпирролидона. Эти мономеры полимеризуются и прививаются по радикальному механизму. Поэтому при введении в живые клетки в нетоксических концентрациях они связывались в клетках только тогда, когда происходило облучение, прививаясь к ее компонентам. Сопоставление радикалообразования с излучением показало, что при облучении образуются радикалы главным образом в липидной фракции и увеличение их концентрации соответствует нарастанию сверхслабого излучения.

Нам кажется, что биофизические исследования по хемилюминесценции как при изучении механизма этого явления, так и при действии различных химико-физических факторов на процесс хемилюминесценции должны идти именно по изучению интенсивности излучения спектра и времени жизни, и только это дает возможность получить объективную информацию о типах и кинетике конкурирующих реакций в живом организме. Однако успех исследований, связанный не только с регистрацией слабых световых потоков, а с измерением спектра и времени жизни возбужденных состояний, в значительной степени определяется уровнем измерительной техники. Применение впервые специальных высокочувствительных фотоумножителей с низким темновым шумом даже при комнатной температуре [1, 4] позволило всем исследователям в этой области отказаться от сложного и менее чувствительного метода, который раньше был основан на замораживании ФЭУ до температуры жидкого

азота. Кроме того, применение универсальных измерительных установок не только значительно расширяет область изучения общих закономерностей сверхслабого свечения биоорганизмов, но также позволяет проводить физико-химический анализ сложных реакций, протекающих в организме в нативном состоянии.

Лаборатория биофизики
Армянского института земледелия

Поступило 13.V 1966 г.

Մ. Մ. ԱՎԱԿՅԱՆ

ԽԵՄԻԼՈՒՄԻՆԵՍԵՆՏԱՅԻՆ ՄԵԹՈԴԻ ԿԻՐԱՌՈՒՄԸ ԲԻՈԼՈԳԻԱԿԱՆ ՊՐՈՑԵՍՆԵՐԸ ԳՐԱՆՑՆԻՈՒ ՀԱՄԱՐ

Ա. մ փ ո փ ո լ լ մ

Բացի բիոլումինեսցենցիային նվիրված պատմական ակնարկից, աշխատության մեջ բերված է բիոլոգիական մարմիններից լույսի առաքման ժամանակակից տեսությունների պարզաբանումը, որտեղ բիոխեմիլումինեսցենցիոն երևույթը կապվում է ազատ ռադիկալային երևույթների հետ: Այդ երևույթները բավական հստակ հետազոտված են ածխաջրածնային միացություններում և կարող են ներկայումս հիմք հանդիսանալ բիոլոգիական մարմինների լույսի թույլ առաքման ձևերը պարզաբանելու համար: Ցույց է տրված նաև, որ խեմիլումինեսցենցիայի հետազոտությունները հարուստ տեղեկություններ են տալիս բջի բնոգործում կատարվող տարբեր երևույթների մասին:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Авакян Ц. М., Тарусов Б. Н., Аджян Н. С. Биоломинесценция, Сб. симпоз. МОИП, М., изд. Знание, 1965.
2. Авакян Ц. М. Биофизика, I, X, 189, 1965.
3. Авакян Ц. М., Аджян Н. С. Биофизика, 2, XI, 717, 1966.
4. Баренбойм Г. М., Доманский А. Н., Туроверов К. К. Люминесценция биополимеров и клеток, М., 1966.
5. Васильев Р. Ф. Люминесценция при химических реакциях в растворах. Автореф. докт. диссерт., ЛГУ им. А. А. Жданова, 1964.
6. Васильев Р. Ф., Вичутинский А. А. ДАН СССР, 142, 3, 1962а, 615—1962б. Ж. физ. химии, 36, 1799—1962в. ДАН СССР, 145, 6, 1301.
7. Васильев Р. Ф., Вичутинский А. А., Карпукхин О. Н., Шляпинтох В. Я. Физические проблемы спектроскопии. Матер. XIII совещ., т. 1, М., Изд-во АН СССР, Л., стр. 320, 1962.
8. Васильев Р. Ф., Карпукхин О. Н., Шляпинтох В. Я. Хемилюминесценция в реакциях термического распада. М., 1959, ДАН СССР, 125; 1, 106—1961. Ж. физ. химии, 35, 2, 462, 1961.
9. Веселовский В. А. В сб. Тезисы симпоз. Биоломинесценция, Сб. симпоз. МОИП, М., изд. Знание, 1965, Автореферат канд. дис., МГУ, 1964.
10. Веселовский В. А., Секамова Е. Н., Тарусов Б. Н. Биофизика, 8, 1, 125, 1963.

11. Гурвич А. А., Гурвич А. Г. Митогенетическое излучение, М., изд. Наркомздрава СССР, 1945.
12. Журавлев А. И. Ж. прикладной химии, 1962, 35, 1153--1965а. В сб. Биолуминесценция МОИП, М., изд. Знание, 1965.
13. Журавлев А. И., Корженко В. С. ДАН СССР, 152, 2, 457, 1963.
14. Журавлев А. И., Поливода А. И., Тарусов Б. Н. Радиобиология, 1, 8, 321, 1961.
15. Журавлев А. И., Тарусов Б. Н., Есакова Т. Д. В сб. Тр. VIII Межд. противорак. конгр., 1962.
16. Журавлев А. И., Филиппов Ю. Н., Симонов В. В. Биофизика, 4, 6, 671, 1964.
17. Журавлев А. И., Веселов, Кошеев Н. Н. Успехи современной биологии, 2(5), 60, стр. 179, 1965.
18. Михлин Д. М. Пероксиды и пероксидазы, Изд. АН СССР, 1947.
19. Михлин Д. М., Колесников П. А. О дыхательных системах растений, Биохимия, 12, 452, 1947.
20. Петрусевиц Ю. М., Иванов И. И., Тарусов Б. Н., Гапоненко В. И., Се Бао-шенъ. Вестник МГУ, серия биол., 5, стр. 12, 1965.
21. Попов Г. А. О применении хемилюминесцентного метода для изучения индуцированных окислительных реакций в биосубстрате в зависимости от степени его повреждения, Автореф. канд. диссерт. АМН СССР, М., 1964.
22. Тарусов Б. Н., Поливода А. И., Журавлев А. И. Радиобиология, 1, 1, 1961а. Биофизика, 6, 4, 490, 1961б.
23. Тарусов Б. Н., Поливода А. И., Журавлев А. И., Секамова Е. Н. Цитология, 4, 696, 1962.
24. Тарусов Б. Н. Природа 2, 1966.
25. Тарусов Б. Н. Первичные процессы лучевого поражения, Госатомиздат, 1962.
26. Тарусов Б. Н., Петрусевиц Ю. М., Иванов И. И., Гапоненко В. И. Симп. Свободнорадикальные процессы в биологических системах, МОИП, Тез. докл., стр. 52, 1964.
27. Козлов Ю. П., Тарусов Б. Н. Сб. трудов МОИП, Свободнорадикальные процессы в биологических системах, М., 1966.
28. Троицкий Н. А., Конев С. В., Катибников М. А. Биофизика, 6, 238, 1961.
29. Эмануэль Н. М., Денисов Е. Т., Майзус З. К. Цепные реакции окисления углеводов в жидкой фазе, М., 1965.
30. Colli L. Facchini. Nuovo cimento, 11, 255, 1954.
31. Colli L., Facchini U., Guidotti G., Dugnani, Lonati R. Orsenigo M. Somnariva O. Experientia 11, 479, 1955.
32. Colli L., Facchini O., Rossi A. Nuovo Cimento 11, 255. 1954.
33. Höfert M. Biophysik 2, 1965.
34. Höfert M. Int. Lumineszenz-Symposium, München 1965.
35. Harvey E. Science, 44, 268, 1916.
36. Lepeschkin W, Protoplasma, 21, 594, 1937.